



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques

Référence ..... / 2022

# MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**DRISS Lilia et OTMANI Romaiça Narimane**

Le: Mercredi 29 juin 2022

## Etude systématique de l'activité antioxydante de propolis

---

### Jury :

Dr. BELKHARCHOUCH Hafida	MCB	Université de Biskra	Président
Dr. TRABSA Hayat	MCA	Université de Biskra	Rapporteur
Dr. ACHOUR Hanane	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : **2021/2022**

## Remerciements

*Tout d'abord nous tenons à remercier dieu de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre formation de master et pouvoir réaliser ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à notre promotrice, Madame Hayat TRABSA, pour avoir su nous guider dans la construction de ce mémoire et pour avoir dès le début accordé son intérêt au sujet que nous avons choisi.*

*Merci pour ta rigueur et tes connaissances pointues dans le domaine de la biochimie. Merci pour ta patience, ta disponibilité et surtout tes judicieux conseils qui ont contribué à enrichir ce travail.*

*Nous remercions vivement les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude et pour le temps consacré afin de l'évaluer.*

*Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assurée de notre profonde gratitude.*

## **Dédicace**

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que nous dédions ce modeste travail de fin d'étude à nos chers parents, source de vie, de motivation et d'affection, pour tout l'amour dont ils nous ont entouré et pour tout ce qu'ils ont fait pour nous. On fera de notre mieux pour rester un sujet de fierté à vos yeux avec l'espoir de ne jamais vous décevoir. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et de vos prières quotidiennes.*

*Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur*

*Nous dédions aussi ce travail à nos frères et sœurs, nos familles, nos amis et tous nos professeurs qui nous ont enseigné.*

***Romaissa Narimane et Lilia***

# Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des tableaux.....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations.....	IV
Introduction.....	1

## **Partie 1 : Synthèse bibliographique**

### **Chapitre 1 : Propolis et stress oxydatif**

1	Propolis.....	3
1.1	Définition et utilisation par les abeilles.....	3
1.2	Historique d'utilisation pharmacologique par l'homme .....	4
1.3	Origine.....	4
1.4	Collecte.....	5
1.4.1	Par les abeilles.....	5
1.4.2	Par l'apiculteur.....	5
1.5	Propriétés physico-chimiques .....	6
1.6	Composition chimique .....	6
2	Stress oxydatif .....	7
2.1	Radicaux libres.....	7
2.1.1	Types des radicaux libres.....	7
2.1.2	Sources des radicaux libres.....	8
2.1.2.1	Sources endogènes .....	8
2.1.2.2	Sources exogènes .....	9
2.1.3	Rôles des radicaux libres .....	9
2.2	Antioxydants .....	9
2.2.1	Types des systèmes antioxydants.....	10

## **Partie 2 : Partie expérimentale**

### **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

3	Matériel et méthodes.....	11
3.1	Stratégie de recherche .....	11
3.2	Démarche méthodologique .....	11

3.2.1	Sélection des articles .....	11
3.2.2	Critères d'exclusion .....	12
3.2.3	Critères d'inclusion .....	12
3.3	Analyse des données .....	16
3.4	Analyse descriptive et statistique .....	18

### **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

4	Résultats et discussion .....	19
4.1	Description des recherches sélectionnées dans l'axe de valorisation de l'activité antioxydante de propolis .....	19
4.1.1	Année de publication .....	19
4.1.2	Pays de recherche.....	20
4.1.3	Collaboration des chercheurs .....	21
4.1.4	Objectif de l'étude .....	22
4.1.5	Activités biologiques de propolis associées à l'activité antioxydante .....	24
4.1.6	Type d'étude de l'activité antioxydante ( <i>in vivo</i> , <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i> ).....	26
4.2	Echantillonnage et caractéristiques de propolis .....	28
4.2.1	Origine géographique des échantillons de propolis .....	28
4.2.2	Mention de la saison de collecte .....	30
4.2.3	Mention de l'année d'échantillonnage.....	31
4.2.4	Nombre d'échantillons .....	32
4.2.5	Moyen d'obtention des échantillons .....	34
4.2.6	Mention de l'origine botanique des échantillons de propolis .....	35
4.2.7	Mention de l'espèce d'abeille .....	37
4.2.8	Couleur des propolis étudiées .....	39
4.2.9	Aspect des échantillons de propolis testés .....	41
4.3	Extraction et traitement des extraits de propolis .....	42
4.3.1	Préparation des échantillons de propolis avant extraction .....	42
4.3.2	Extraction de propolis .....	44
4.3.2.1	Techniques d'extraction .....	44
4.3.2.2	Solvants d'extraction.....	46
4.3.3	Concentration et séchage des extraits .....	48
4.3.4	Conservation des extraits .....	50
4.3.5	Fractionnement des extraits .....	50
4.4	Techniques d'analyse et de caractérisation .....	51
4.4.1	Analyse spectrophotométrique des extraits de propolis.....	51

4.4.1.1	Classe des molécules dosées .....	52
4.4.1.2	Méthode de dosage des phénols et flavonoïdes totaux .....	54
4.4.2	Analyse chromatographique des extraits de propolis .....	56
4.4.2.1	Type des techniques chromatographiques.....	57
4.4.2.2	Techniques chromatographiques utilisées.....	58
4.5	Composition chimique de la propolis.....	60
4.5.1	Nombre des composés identifiés .....	61
4.5.2	Classes chimiques des composés identifiés .....	62
4.6	Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> des extraits de propolis .....	64
4.6.1	Nombre des tests d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	64
4.6.2	Tests d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	66
4.6.3	Facteurs qui influencent l'activité antioxydante de propolis .....	69
4.6.3.1	Influence du solvant d'extraction.....	69
4.6.3.2	Influence de la technique d'extraction .....	70
4.6.3.3	Influence des caractéristiques phytogéographiques .....	71
4.6.3.4	Influence des variations climatiques .....	71
4.6.3.5	Influence de l'espèce d'abeille.....	72
4.6.3.6	Influence du taux des phénols .....	72
4.6.4	Constituants majeurs responsables de l'effet antioxydant de propolis .....	73
4.7	Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> des extraits de propolis .....	76
4.7.1	Modèle animal utilisé.....	77
4.7.2	Voie d'administration adoptée dans le traitement par la propolis .....	78
4.7.3	Tests d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i> de propolis.....	78
4.7.4	Efficacité antioxydante de la propolis dans les modèles <i>in vivo</i> .....	80
Conclusion .....		81
Bibliographie.....		83
Annexes		
Résumé		

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Propriétés physicochimiques de la propolis.....	6
<b>Tableau 2.</b> Liste des ERO et RNS.....	8
<b>Tableau 3.</b> Sources endogènes des ERO et ERA.....	9
<b>Tableau 4.</b> Double rôle des radicaux libres.....	9
<b>Tableau 5.</b> Systèmes antioxydants.....	10
<b>Tableau 6.</b> Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour chaque mots clé utilisé.....	11
<b>Tableau 7.</b> Caractéristiques des études incluses pour l'analyse systématique.....	14
<b>Tableau 8.</b> Critères de jugement des études incluses dans la revue systématique de la littérature par le logiciel SPSS.....	16
<b>Tableau 9.</b> Nombre des chercheurs.....	21
<b>Tableau 10.</b> Types de collaboration.....	22
<b>Tableau 11.</b> Objectifs des études sélectionnés.....	23
<b>Tableau 12.</b> Rapport année d'échantillonnage-année de publication.....	32
<b>Tableau 13.</b> Répartition du nombre d'échantillons en fonction de l'objectif d'étude.....	34
<b>Tableau 14.</b> Croisement entre l'aspect de propolis et la réalisation d'un traitement avant l'extraction.....	42
<b>Tableau 15.</b> Quelques caractéristiques statistiques des techniques de dosage des phénols et flavonoïdes totaux.....	54
<b>Tableau 16.</b> Taux des phénols quantifiés par les articles sélectionnés.....	56
<b>Tableau 17.</b> Association de l'étape d'identification des composés chimiques de la propolis aux objectifs de la recherche.....	57
<b>Tableau 18.</b> Données statistiques sur le nombre des techniques analytiques employées dans les études sélectionnées.....	58
<b>Tableau 19.</b> Vérification des facteurs influençant le nombre des composés isolés.....	62
<b>Tableau 20.</b> Effet de quelques facteurs sur les classes chimiques identifiées.....	64
<b>Tableau 21.</b> Quelques données statistiques sur le nombre de tests réalisé pour l'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	65
<b>Tableau 22.</b> Croisement entre le nombre de tests d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> et le nombre d'activités biologiques associées à cette activité.....	65
<b>Tableau 23.</b> Caractéristiques des tests les plus employés dans l'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante par les articles sélectionnés.....	67
<b>Tableau 24.</b> Valeurs de l'activité antioxydante obtenus par le test au DPPH.....	68
<b>Tableau 25.</b> Croisement entre technique d'extraction et IC <sub>50</sub> des extraits actifs obtenus par DPPH.....	69
<b>Tableau 26.</b> Valeurs de l'activité antioxydante et le taux des phénols insérés pour la réalisation de corrélation.....	73
<b>Tableau 27.</b> Vérification de la corrélation entre taux des phénols et l'activité antioxydante.....	73
<b>Tableau 28.</b> Etudes <i>in vivo</i> sélectionnées dans notre travail systématique.....	77
<b>Tableau 29.</b> Principes du dosage de quelques paramètres biologiques intervenant dans le processus oxydatif.....	79

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Collecte et fabrication de la propolis par les ouvrières butineuses.....	3
<b>Figure 2.</b> Balance oxydant/antioxydant. ....	7
<b>Figure 3.</b> Diagramme de flux (Flowchart) des différentes étapes de sélection des articles. ...	13
<b>Figure 4.</b> Répartition chronologique des études de l'activité antioxydante de propolis dans PubMed.....	19
<b>Figure 5.</b> Diagramme en bâtons des années de publication des articles sélectionnés. ....	20
<b>Figure 6.</b> Diagramme circulaire représentatif des pays de recherche. ....	21
<b>Figure 7.</b> Histogramme représentatif de l'effectif des activités biologiques associées à l'activité antioxydante.....	24
<b>Figure 8.</b> Histogramme des effectifs des tests d'évaluation de l'activité antioxydante. ....	27
<b>Figure 9.</b> Répartition en pourcentage d'origine géographique des échantillons. ....	28
<b>Figure 10.</b> Diagramme circulaire du pourcentage de mention de la saison de récolte. ....	30
<b>Figure 11.</b> Diagramme circulaire du pourcentage de mention de l'année d'échantillonnage.	31
<b>Figure 12.</b> Diagramme en bâtons du nombre d'échantillons testés par les articles sélectionnés. ....	33
<b>Figure 13.</b> Diagramme circulaire du moyen d'obtention.....	35
<b>Figure 14.</b> Diagramme circulaire du pourcentage de mention de l'origine botanique .....	36
<b>Figure 15.</b> Diagramme circulaire du pourcentage de mention de l'espèce d'abeille .....	38
<b>Figure 16.</b> Diagramme en bâtons représentatif des couleurs de propolis étudiées .....	39
<b>Figure 17.</b> Variation de la couleur de Propolis provenant de différentes régions géographiques. ....	40
<b>Figure 18.</b> Diagramme en bâtons représentatif de l'aspect des échantillons de propolis testés .....	41
<b>Figure 19.</b> Diagramme en bâtons des procédures de préparation des échantillons.....	43
<b>Figure 20.</b> Diagramme en bâtons des techniques d'extraction employées.....	45
<b>Figure 21.</b> Diagramme en bâton des solvants d'extraction utilisés. ....	47
<b>Figure 22.</b> Diagramme circulaire des méthodes de concentration utilisées.....	49
<b>Figure 23.</b> Diagramme circulaire du pourcentage d'utilisation de la lyophilisation. ....	50
<b>Figure 24.</b> Diagramme circulaire des températures de conservation des extraits .....	50
<b>Figure 25.</b> Diagramme circulaire du pourcentage de réalisation du fractionnement. ....	51
<b>Figure 26.</b> Diagramme en bâtons représentant la classe des molécules dosées.....	52
<b>Figure 27.</b> Diagramme en bâtons représentant le pourcentage d'utilisation des techniques d'analyse chimique selon leur type. ....	57
<b>Figure 28.</b> Diagramme en bâtons représentatif du pourcentage d'utilisation des techniques analytiques employées dans les articles sélectionnés.. ....	59
<b>Figure 29.</b> Diagramme en bâtons du pourcentage en fonction du nombre de composés identifiés.....	61
<b>Figure 30.</b> Diagramme circulaire des classes chimiques identifiées.....	63
<b>Figure 31.</b> Diagramme en bâtons des méthodes d'évaluation in vitro de l'activité antioxydante de propolis.....	66
<b>Figure 32.</b> Diagramme circulaire des extraits actifs de propolis.....	70
<b>Figure 33.</b> Diagramme en bâtons récapitulatif des constituants majeurs responsables de l'activité antioxydante de propolis.. ....	74

## Liste des abréviations

<b>ABTS</b>	Acide 2,2'-azino-bis
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure d'aluminium
<b>BHA</b>	Butylhydroxyanisole
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluène
<b>CAPE</b>	Ester phénéthylique de l'acide caféique
<b>CAT</b>	Catalase
<b>COVID-19</b>	Maladie à coronavirus 2019
<b>DAD</b>	Barrette de diodes
<b>DPPH</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque
<b>ERA</b>	Espèces réactives de l'azote
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>ExEP-A</b>	Extrait éthanolique d' <i>Apis mellifera</i>
<b>ExEP-P</b>	Extrait éthanolique d' <i>Plebeia droryana</i>
<b>TPTZ</b>	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
<b>FRAP</b>	Pouvoir antioxydant réducteur du fer ferrique
<b>GAE/g</b>	Equivalent d'acide gallique par gramme
<b>GC-MS</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse
<b>GPx</b>	Glutathion peroxydase
<b>GRx</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GSt</b>	Glutathion-S-transférase
<b>H<sub>0</sub></b>	Hypothèse 0
<b>H<sub>1</sub></b>	Hypothèse 1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HOCL</b>	Acide hypochloreux
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide haute performance
<b>HPLC-DAD</b>	Chromatographie en phase liquide haute performance couplée à barrette de diodes

<b>HPLC-ESI/MS</b>	Chromatographie en phase liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par électro-nébulisation
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentration qui inhibe 50% de l'activité
<b>IMRED</b>	Introduction, Matériel et méthode, Résultat et Discussion
<b>LC-MS</b>	Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>MDA</b>	Malondialdehyde
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NBT</b>	Nitrobluetetrazolium
<b>NO<sup>•</sup></b>	Oxyde nitrique
<b>NO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Dioxyde d'azote
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Superoxyde
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozone
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hydroxyle
<b>ONOO<sup>•-</sup></b>	Peroxynitrite
<b>ONOOH</b>	Acide peroxy-nitrique
<b>ORAC</b>	Capacité d'absorbance des radicaux oxygénés
<b>PRISMA</b>	Preferred Reporting Items for systematic Reviews and Meta-Analysis
<b>Pubmed</b>	Site d'indexation des publications médicales
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Radical peroxy
<b>ROOH</b>	Hydroperoxyde organique
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SPSS</b>	Paquet statistique pour les sciences sociales
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TEAC</b>	Capacité antioxydante en équivalent Trolox
<b>Trolox</b>	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroma-2 carboxylique
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>α</b>	Seuil de risque
<b>σ</b>	Signification asymptotique
<b>χ<sup>2</sup></b>	Khi- deux

## Introduction

L'agriculture a changé le mode de vie traditionnel de chasseurs-cueilleurs que l'homme a suivi depuis son évolution, qui a été balayé au profit d'un approvisionnement alimentaire stable. Elle a donné naissance à des civilisations et comme les animaux pouvaient désormais être élevés, l'homme a appris à récolter les produits que l'abeille et ses ruches pouvaient lui fournir, avant de domestiquer ce petit insecte en inventant l'apiculture. Par conséquent l'homme est entré dans une relation d'échanges avec l'abeille, entretenant les ruches et obtenant en retour de ces services, les précieux produits apicoles qui ont vite séduit sa curiosité pour les utiliser à des fins thérapeutiques donnant naissance à l'apithérapie (Weisdorf, 2005).

L'apithérapie, utilisée de manière empirique depuis des milliers d'années par les égyptiens et les grecques, est une médecine alternative qui exploite les produits de la ruche comme le miel, la gelée royale, le pollen et la propolis qui est actuellement très reconnue avec l'avancée de la chimie moléculaire et fait l'objet de nombreuses études à travers le monde (Weis *et al.*, 2022).

La propolis est une matière résineuse complexe recueillie par les abeilles mellifères sur les bourgeons et les écorces des plantes. Elle se caractérise par une composition chimique très diversifiée qui dépend de la source végétale dont elle est issue et de nombreux autres facteurs. Parmi les nombreux composants de la propolis, on distingue sa richesse en composés phénoliques dont les acides phénoliques, leurs esters et les flavonoïdes (Isla *et al.*, 2005, 2009a). La propolis possède un large éventail d'activités biologiques bénéfiques, notamment l'activité antibactérienne, anti-inflammatoire, antitumorale (Pascoal *et al.*, 2014), antifongique, antiparasitaire, antivirale (Zulhendri *et al.*, 2021), cardioprotectrice et antioxydante (Ahmed *et al.*, 2017).

Le corps humain est le siège d'une élaboration constante d'espèces oxygénées réactives dont la surproduction incontrôlée induit un état de stress oxydatif qui inhibe les fonctions normales des lipides cellulaires, des protéines, des acides nucléiques et du système immunitaire. Les antioxydants jouent un rôle important dans la réduction des altérations liés à ce phénomène (Daenen *et al.*, 2019). Actuellement, une variété d'antioxydants synthétiques sont commercialisés par l'industrie pharmaceutique. Cependant, l'utilisation de ces composés a été restreinte par la législation en raison de leurs effets secondaires toxiques et cancérigènes. L'intérêt croissant des industries alimentaires, pharmacologiques et cosmétiques pour l'identification et l'isolement de nouveaux antioxydants à partir des ressources naturelles est devenu un domaine actif dans la recherche scientifique.

La propolis est considérée comme une source potentielle d'antioxydants naturels capables de diminuer les effets du stress oxydatif à l'origine de nombreuses maladies. En général, les composés possédant un caractère phénolique, qui appartiennent aux substances exprimant la capacité de piéger les radicaux libres, sont principalement responsables de la capacité antioxydante des produits de la ruche (Kocot *et al.*, 2018).

La popularité croissante de la propolis dans le monde entier a attiré l'attention de tous les segments du marché dont les producteurs (apiculteurs qui ont augmenté leurs revenus), les distributeurs qui assurent la commercialisation des produits à base de propolis et les consommateurs. Parce qu'elle est si souvent utilisée pour promouvoir la santé, il est important que la propolis mise à disposition soit de haute qualité. La grande diversité chimique de ce produit a limité son usage médical et malheureusement, il n'existe toujours pas de système certifié de contrôle de la qualité de la propolis et des produits à base de cette résine. Jusqu'à ce qu'une norme de qualité appropriée soit développée, la propolis continuera à être utilisée comme traitement alternatif sans l'acceptation officielle de la médecine moderne (Stan *et al.*, 2011). La standardisation des préparations à base de propolis est possible et nécessite d'assurer la classification des différents types existants et l'identification précise des agents antioxydants avec leur concentration afin d'assurer l'efficacité, l'innocuité et la sécurité de ces produits pour le consommateur.

L'objectif de notre travail s'articule sur l'étude de la propolis en tant que produit riche en agents antioxydants potentiels dans la lutte contre les dommages du stress oxydatif, au moyen d'une analyse systématique, descriptive des publications scientifiques internationales afin d'évaluer les procédures d'analyse et les approches adoptées pour la valorisation de l'activité antioxydante de ce produit en ciblant l'identification des lacunes dans ce domaine et les facteurs négligés qui peuvent influencer la composition chimique de la propolis. Notre travail a été divisé en deux grandes parties ; la première partie a été consacrée à l'étude bibliographique de la propolis et quelques notions de base sur le stress oxydatif et les antioxydants. Dans la deuxième partie qui représente le cœur de ce travail, nous avons réalisé une recherche systématique de la littérature dans la base de données PubMed selon les normes de « *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* » pour identifier les études pertinentes sur l'activité antioxydante de propolis, qui ont été par la suite filtrées selon trois étapes de sélection. Les études ont été incluses si elles répondaient aux critères d'inclusion. Nous avons également décrit les tests statistiques utilisés pour accomplir les objectifs de cette étude qui ont été complétés par les résultats obtenus avec leur discussion.

# **Partie 1**

## **Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Propolis et stress oxydatif**

## 1 Propolis

### 1.1 Définition et utilisation par les abeilles

Le mot « Propolis » est d'origine grec qui signifie 'pro' en avant et 'polis' cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche « devant la cité » (Bankova *et al.*, 2000). Il signifie également "coller" et décrit le rôle de la propolis pour cimenter les ouvertures de la ruche (Figure 1). Un autre nom de la propolis est la colle d'abeille (Bogdanov, 2016). C'est une substance résineuse, gommeuse, balsamique, et aromatique de consistance visqueuse, translucide et très coulante (Wali *et al.*, 2017), recueillie par les abeilles sur certaines parties des végétaux, essentiellement les bourgeons et les écorces de certains arbres (Wagh, 2013).



**Figure 1.** Collecte et fabrication de la propolis par les ouvrières butineuses capturé par (Simone-Finstrom et Spivak, 2011).

C'est une substance essentielle pour le bon fonctionnement de la ruche que les abeilles utilisent à de nombreuses fins, les abeilles appliquent la propolis en une fine couche sur les parois internes de leur ruche ou toute autre cavité qu'elles habitent. Elle est utilisée pour réparer les rayons, pour renforcer les fines bordures des rayons et pour rendre l'entrée de la ruche étanche ou plus facile à défendre. Elle est également utilisée comme substance d'embaumement pour recouvrir les envahisseurs de la ruche que les abeilles ont tués mais ne peuvent pas transporter hors de la ruche (Bankova *et al.*, 2000). Elle est utilisée comme agent antimicrobien et antifongique ce qui réduit l'incidence des infections par les bactéries et les moisissures dans la ruche (Stojanović *et al.*, 2020).

## 1.2 Historique d'utilisation pharmacologique par l'homme

En apprenant des abeilles comment elles utilisent la propolis et à quelles fins, l'homme a utilisé la propolis depuis l'antiquité (Stojanović *et al.*, 2020). Elle a été employée particulièrement par les prêtres de l'Égypte depuis mille années, qui avaient monopolisé la médecine, chimie et l'art des cadavres. Puis, par les Grecs qui l'ont utilisé pour traiter les suppurations et leurs anciens textes disent que les médecins l'utilisaient pour la fabrication des baumes, ainsi que les textes hébreux qui décrivent ses propriétés thérapeutiques (Kuropatnicki *et al.*, 2013). Les Romains l'ont donné aux soldats pour soigner les blessures pendant les guerres et les Européens utilisaient les préparations médicales à base de la propolis pour les traitements des maladies de la bouche et de respiration (Wagh, 2013).

Aristote, Pline et Galen ont décrit certaines des propriétés médicinales de la propolis et son utilisation comme antiseptique et agent anti-inflammatoire. Au cours de la période médiévale, la propolis était principalement utilisée par les médecins arabes. Les civilisations du nouveau monde, comme les Incas, utilisaient la propolis comme un antipyrétique. Depuis le 18<sup>ème</sup> siècle, la pharmacopée de Londres a répertorié la propolis comme un médicament officiel. Entre le 17<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> siècle, la propolis est devenue très populaire en Europe en raison de son activité antibactérienne. Pendant la seconde guerre mondiale, la propolis a été utilisée comme agent antimicrobien et anti-inflammatoire. Cette matrice résineuse est actuellement utilisée dans les formulations de produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques et c'est l'un des produits naturels les plus connus et les plus utilisés. La propolis rentre dans la composition des gélules, des bains de bouche, des lotions, des pastilles pour la gorge, et dans des produits sans cire pour améliorer la manipulation et l'utilisation (Santos *et al.*, 2020).

## 1.3 Origine

L'origine de la propolis est difficile à prédire, elle peut provenir soit de la récolte sur les bourgeons d'arbres : les bourgeons de bouleaux, ormes, aulnes, saules, chênes, marronniers d'inde, frênes et les écorces des épicéas, des pins, des sapins et plusieurs espèces de peupliers, fournissent aux abeilles les meilleures sources de propolis (Ghisalberti, 1979). Soit elle peut avoir une origine interne où la propolis serait un résidu provenant de la première phase de la digestion du pollen régurgité pour l'abeille ou bien des matériaux qui sont introduits pendant l'élaboration de la propolis (Marcucci, 1995).

Les propolis les plus fréquemment étudiées sont la propolis européenne issue majoritairement de peupliers, la propolis verte du Brésil issue de *Baccharis dracunculifolia* et

la propolis rouge dont la source est *Dalbergia ecastophyllum*. À cela s'ajoutent toutes sortes de propolis provenant d'un assemblage complexe de végétaux plus ou moins bien identifiés présents dans la zone géographique au moment de la récolte. La fraction polyphénolique est très différente d'une propolis à une autre et constitue ainsi une sorte d'empreinte spécifique qui permet d'identifier l'origine botanique de cette propolis (Cardinault *et al.*, 2012).

## 1.4 Collecte

### 1.4.1 Par les abeilles

La propolis est produite exclusivement par les abeilles *Apis mellifera* à partir de différents exsudats végétaux principalement des bourgeons mais aussi des feuilles. *A. mellifera Caucasica* est la plus industrielle de toutes les races d'*A. mellifera*. Les abeilles asiatiques *Apis florea* et *Apis cerana* ne récoltent pas de propolis. Les espèces tropicales d'abeilles sans dard récoltent également la propolis et l'incorporent à la cire pour en faire du cérumen. Dans les zones tempérées, la propolis est récoltée à la fin de l'été et en automne, lorsque les abeilles se préparent à l'hivernage (Santos *et al.*, 2020).

Seules quelques ouvrières, âgées de 15 jours au maximum, sont spécialisées dans le butinage de la propolis. Les abeilles récoltent la propolis pendant la période chaude de la journée, lorsque la colle est molle. Les abeilles s'emparent de la colle molle du bourgeon et l'arrachent avec leurs mandibules. Ensuite, elles manipulent cette résine avec leurs pattes antérieures et l'emballent dans les pattes. La propolis est transportée à la ruche comme le pollen sous la forme d'une charge, qui contient également des produits de sécrétion de la glande mandibulaire (Bogdanov, 2016; Meyer et Ulrich, 1956). Une fois dans la ruche, la résine est mélangée à la salive des abeilles et est partiellement hydrolysée par ses enzymes. La propolis est ensuite cimentée dans les ruches et mélangée à de la cire d'abeille pour l'utiliser (Santos *et al.*, 2020). Selon Meyer (1956), une colonie récolte environ 50-150 g de propolis par an, mais les spécialistes de la propolis, les abeilles caucasiennes, peuvent récolter 250 à 1000 g de propolis par an.

### 1.4.2 Par l'apiculteur

La propolis est récupérée par deux méthodes :

La récolte se fait par **grattage** des cadres ou des parois de la ruche, il est préférable de réaliser cette opération à basse température. La propolis issue de cette méthode n'est pas de bonne qualité, car elle contient de la cire, des particules de bois et de métal de plus, elle peut être assez vieille (très sombre) et partiellement dégradée. Ou bien au moyen **des grilles à propolis** placées

sur la tête des cadres, il suffit de diminuer la température ce qui permet le durcissement de la propolis qui devient cassante et facile à racler. Cette méthode permet une récolte systématique et de recueillir une propolis de meilleure qualité (Krell et Nations, 1996).

### 1.5 Propriétés physico-chimiques

Plusieurs conditions influencent les propriétés physico-chimiques de la propolis ce qui expliquent la grande diversité de couleur, d'odeur ainsi que l'effet biologique et thérapeutique de ce produit et qui sont en fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone géographique, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce d'abeille (Maroof et Gan, 2020).

**Tableau 1.** Propriétés physicochimiques de la propolis.

Propriétés	Types de propolis	Facteurs de variabilité	Références
Couleur	Verte, jaune, rouge et brun foncé	Selon l'origine botanique et l'âge de la propolis	(Wagh, 2013)
Odeur	Douce et délicate liée aux résines aromatiques	Selon la végétation disponible	(Wali <i>et al.</i> , 2017)
Saveur	Souvent acre, piquante et amère.		
Consistance	Dure et friable à 15°C Molle aux alentours de 25 à 45°C Point de fusion situé vers 60-70°C et peut atteindre 100°C	En fonction de la température	(Anjum <i>et al.</i> , 2019)
Nature	Lipophile		
Solubilité	Peu soluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques avec des proportions variables	Selon la polarité des solvants	(Irigoiti <i>et al.</i> , 2021)

### 1.6 Composition chimique

La composition chimique de la propolis a fait l'objet de nombreuses études, car ses composants présentent plusieurs propriétés intéressantes pour la communauté scientifique (Dantas Silva *et al.*, 2017).

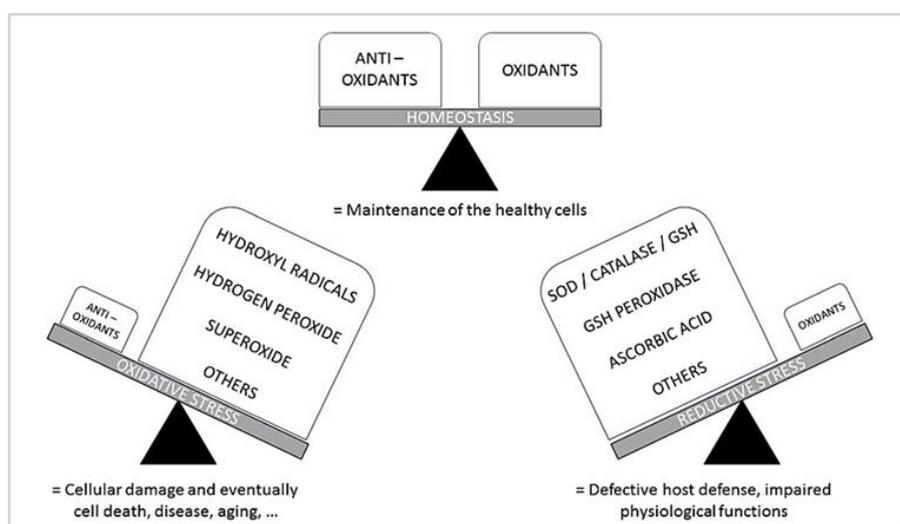
Plus de 300 composants ont été identifiés jusqu'à présent, qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable répartis avec les proportions suivantes : résines et baume végétal (50 %), cire (30 %), huiles essentielles (10 %), pollen (5 %) et autres composés organiques (5 %) (Stojanović *et al.*, 2020).

A l'exception des résines et des cires, les principaux groupes de composés chimiques présents dans la propolis sont : les phénols dont les polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques, autres composés phénoliques et leurs esters), les terpènes et les terpénoïdes, les

stéroïdes, les acides aromatiques, les esters aromatiques, les aldéhydes, les alcools, les sucres, les alcools et les acides de sucre, les acides aminés, les vitamines, les acides gras, les hydrocarbures, les éléments minéraux et les alcools. La classe des flavonoïdes demeure toujours la plus importantes et la plus étudiées grâce à sa contribution aux activités biologiques et pharmacologiques de la propolis telle que l'activité antioxydante (Stojanović *et al.*, 2020).

## 2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un état de déséquilibre entre excès de radicaux oxydants (libres) et une dégradation insuffisante de ces radicaux par les systèmes antioxydants comme mécanisme de défense interne (Figure 2) (Daenen *et al.*, 2019).



**Figure 2.** Balance oxydant/antioxydant (Daenen *et al.*, 2019).

### 2.1 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des groupes d'atomes avec un nombre non apparié d'électrons, ce sont des substances hautement réactives qui peuvent entraîner des réactions en chaîne. Les réactions en chaîne impliquent un certain nombre d'étapes dont chacune forme un radical libre qui déclenche l'étape suivante (Wu *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Types des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être classés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces réactives de l'azote (ERA) (Sharma *et al.*, 2018). Les radicaux libres d'oxygène et d'azote peuvent être convertis en autres espèces réactives non radicalaires (Fang *et al.*, 2002). Le tableau 2 résume la liste des ERO et ERA les plus importants.

**Tableau 2.** Liste des ERO et RNS adapté par (Phaniendra *et al.*, 2015; Rached, 2018).

Espèces réactives	Symbole	Propriété / Lieu
<b>Espèces radicalaires</b>		
<b>Superoxyde</b>	$O_2^{\cdot-}$	Peu réactif avec les biomolécules, se produit généralement dans les mitochondries
<b>Hydroxyle</b>	$OH^{\cdot}$	Très réactif, généré lors d'une réaction de Fenton
<b>Radical Pyroxyde</b>	$ROO^{\cdot}$	Réactif, peut initier la peroxydation des acides gras, formé à partir des lipides, protéines, ADN et sucres, etc.
<b>Espèces non radicalaires</b>		
<b>Peroxyde d'hydrogène</b>	$H_2O_2$	Peut causer des dommages à des concentration faibles, formé dans une réaction de dismutation catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase
<b>Oxygène singulet</b>	$^1O_2$	Très réactif, formé pendant la photosensibilisation, l'activation des neutrophiles et éosinophiles, lors des réactions enzymatiques, etc.
<b>Ozone</b>	$O_3$	Très réactif, peut être produit par voie d'oxydation de l'eau catalysée par les anticorps dans le cas d'inflammation
<b>Hydroperoxyde organique</b>	$ROOH$	Réagit avec les métaux de transition
<b>Acide hypochloreux</b>	$HOCl$	Très réactif, produit par les neutrophiles activés dans le site d'inflammation par le peroxyde d'hydrogène et le chlorure catalysée par l'enzyme myéloperoxydase
<b>Espèces radicalaires</b>		
<b>Oxyde nitrique</b>	$NO^{\cdot}$	Second messager important et régulateur de la pression sanguine, peut produire des oxydants puissants
<b>Dioxyde d'azote</b>	$NO_2^{\cdot}$	Formé pendant une pollution atmosphérique par dioxyde
<b>Espèces non radicalaires</b>		
<b>Peroxynitrite</b>	$ONOO^-$	Hautement réactif, formé de NO et superoxyde
<b>Acide peroxynitrique</b>	$ONOOH$	Protoné à partir de peroxynitrite

### 2.1.2 Sources des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être formés de 3 façons : par le clivage homolytique de la liaison covalente d'une molécule normale, par la perte ou l'ajout d'un électron unique (Atta *et al.*, 2017). Ils peuvent avoir une origine endogène ou exogène.

#### 2.1.2.1 Sources endogènes

Les sources endogènes incluent les différents organites cellulaires comme représenter dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Sources endogènes des ERO et ERA (Hameister *et al.*, 2020).

Compartiment subcellulaire	Source des radicaux libres
Mitochondries	Chaîne de transport d'électrons
Réticulum endoplasmique	Oxydation microsomique, flavoprotéines, les cytochromes P450
Membrane plasmique	Lipoxygénases, prostaglandine synthase, NADPH oxydase
Peroxisomes	Oxydases, flavoprotéines
Cytoplasme	Xanthine oxydase, isoformes d'oxyde nitrique synthase, métaux de transition
Lysosomes	Myéloperoxydase

### 2.1.2.2 Sources exogènes

Ils sont générés par divers stimuli, notamment des facteurs professionnels et environnementaux tels que les rayonnements ionisants, divers produits chimiques, les rayonnements solaires (Hameister *et al.*, 2020), la pollution d'air et de l'eau, les pesticides, l'alcool, le tabagisme, les métaux lourds (Fe, Cu...), les métaux de transition (Pb, Hg...), les médicaments tels que Paracétamol, (Phaniendra *et al.*, 2015), les virus, bactéries et parasites,...etc (Sharma *et al.*, 2018).

### 2.1.3 Rôles des radicaux libres

Les ERO/ERA sont connus pour jouer un double rôle car ils peuvent être nocifs à des concentrations élevées et lorsqu'il y a un déséquilibre entre ERO/ERN et les systèmes antioxydant, comme ils peuvent être bénéfiques lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques (Valko *et al.*, 2006), le tableau 4 résume ces différents rôles.

**Tableau 4.** Effets des radicaux libres.

Effets bénéfiques	Effets nocifs	Références
Signalisation cellulaire. Induction des réponses mitogéniques. Défense contre les agents infectieux.	Endommager les structures cellulaires (les acides nucléiques, les lipides, les membranes, les protéines...etc.	(Valko <i>et al.</i> , 2006)
Impliqués dans les processus métaboliques. Impliqué dans le processus de détoxification du foie. La production de compléments.	Troubles gastro-intestinaux et hépatiques. Perte d'élasticité des artères. Rigidité des articulations et des cartilages. Provoquent le vieillissement. Inflammation.	(Sharma <i>et al.</i> , 2018)

## 2.2 Antioxydants

Un antioxydant désigne toute substance qui présente, à des faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, le pouvoir de retarder ou inhiber significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1995). Les antioxydants bloquent le

processus d'oxydation en neutralisant les radicaux libres par deux voies possibles : briser la réaction en chaîne ou bien l'empêcher. Ce faisant, les antioxydants deviennent eux-mêmes oxydés (Atta *et al.*, 2017).

### 2.2.1 Types des systèmes antioxydants

Les systèmes antioxydants peuvent être classer en : antioxydant endogènes (enzymatiques et non-enzymatiques), antioxydants exogènes naturels et synthétiques (Tableau 5).

**Tableau 5.** Systèmes antioxydants.

Antioxydants	Mécanisme d'action	Références
<b>Antioxydants endogènes enzymatiques</b>		
Superoxyde dismutase	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	(Hameister <i>et al.</i> , 2020)
Glutathion peroxydase	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$	
Glutathion réductase	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$	
Catalase	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	
<b>Antioxydants endogènes non enzymatiques</b>		
Glutathion, NADPH, coenzymes Q, albumine, bilirubine, acide urique	Agents réducteurs	(Rached, 2018)
Lipides		
Hormones : Mélatonine	Piégeage des radicaux libres, stimulation des enzymes antioxydantes	
<b>Antioxydants exogènes</b>		
Vitamine C, E	Piégeage des radicaux libres	(Hameister <i>et al.</i> , 2020)
Caroténoïdes dont la vitamine A		
Polyphénols dont les flavonoïdes		
<b>Antioxydants synthétiques</b>		
Butylhydroxytoluène (BHT), Butylhydroxyanisole (BHA).	Protection	(Sindhi <i>et al.</i> , 2013)

## **Partie 2**

# **Partie expérimentale**

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

### 3 Matériel et méthodes

#### 3.1 Stratégie de recherche

L'analyse a été établie conformément aux directives PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). Le « PRISMA Statement » se compose d'une liste de contrôle de 27 éléments et d'un diagramme de flux en quatre phases. La liste de contrôle comprend des éléments jugés essentiels pour le compte rendu d'une revue systématique. Ces éléments ont été adaptés pour être utilisés par les chercheurs qui effectuent des revues systématiques, ils permettent la démonstration de la qualité de l'analyse, facilitent aux lecteurs d'évaluer la pertinence des études et aux auteurs de structurer la revue en utilisant les rubriques PRISMA (Liberati *et al.*, 2009).

Nous avons effectué la recherche électronique des articles susceptibles d'être utilisés dans cette étude sur la base de données scientifiques PubMed, nous avons ciblé par cette recherche les articles traitants l'activité antioxydante de propolis en combinant les mots clés suivants en anglais pour optimiser la recherche : « Antioxydant activity of propolis » ; « Antioxydant AND propolis » et « Antiradical activity of propolis ». Les différentes combinaisons de mots clés et le nombre des articles obtenus sont représentés dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour chaque mots clé utilisé.

Mots clés utilisés pour la recherche	Nombre d'articles obtenus
Antioxydant AND propolis	1104
Antioxydant activity of propolis	898
Antiradical activity of propolis	25

#### 3.2 Démarche méthodologique

##### 3.2.1 Sélection des articles

Les titres identifiés par la recherche électronique sur PubMed ont été évalués par deux lecteurs. Conformément aux critères de recherche, la recherche électronique a fourni 898 résultats. 898 titres ont été identifiés, l'évaluation initiale basée simplement sur la lecture des titres a abouti à l'élimination de 749 résultats en raison d'être des articles *Review* ou dû à l'absence des mots clés. Les 149 articles restants ont été sélectionnés par la suite pour la lecture du résumé, qui a permis quant à elle de conserver 92 articles dont les textes intégraux ont ensuite été étudiés pour réaliser la troisième sélection et d'exclure 72 articles en raison d'être

hors sujet, ceux qui traitent la toxicité induite par la propolis et les articles qui ne mentionnent pas les valeurs numériques et les tests d'évaluation de l'activité antioxydante.

De la lecture complète des textes intégraux (*Full text*), 20 articles ont répondu aux critères d'inclusions et ont été inclus dans cette étude. Notre tri PRISMA est illustré dans le diagramme de flux comme le montre la figure 3.

### **3.2.2 Critères d'exclusion**

- Les articles *Review*.
- Les articles qui utilisent une langue autre que l'anglais ou le français (langue portugaise).
- Les articles qui ne mentionnent pas les valeurs de l'activité antioxydante.
- Les articles qui ne suivent pas la forme IMRED (Introduction, Méthodes, Résultats Et Discussion).
- Les articles qui parlent sur la toxicité induite par la propolis.

### **3.2.3 Critères d'inclusion**

- Les articles rédigés en anglais ou en français.
- Les études qui mentionnent la concentration de propolis administrée aux animaux dans le cas des études *in vivo*.
- Indication de la valeur de l'activité antioxydante.
- Les études qui utilisent uniquement la propolis ou ses extraits comme agent antioxydant.
- Les études qui mentionnent les solvants d'extraction et les techniques de dosage.

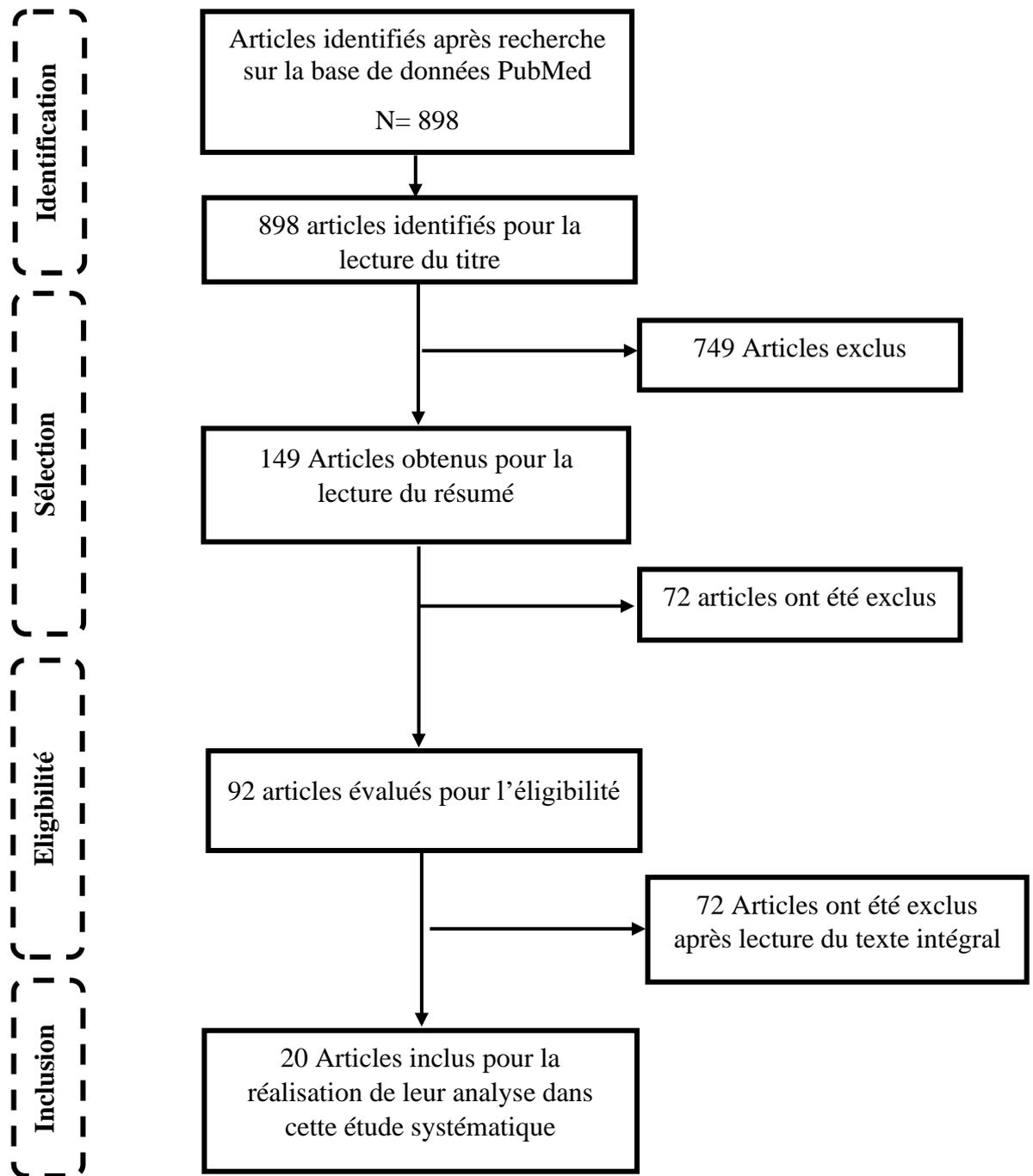


Figure 3. Diagramme de flux (*Flowchart*) des différentes étapes de sélection des articles.

Les 20 articles retenus pour la réalisation de ce travail systématique ont été organisé à l'aide du logiciel EXCEL pour simplifier leur présentation en incluant quelques informations relatives aux articles telles que le journal de publication, le nom du premier auteur, l'année de publication et le titre de l'étude (Tableau 7).

**Tableau 7.** Caractéristiques des études incluses pour l'analyse systématique.

N°	Titre	Premier auteur	Année	Journal
1	Antioxydant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal	Leandro Moreira	2008	<i>Food and Chemical Toxicology</i>
2	Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina	Mari'a I. Isla	2009	<i>An Acad Bras Cienc</i>
3	Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey	Ilhami Gülçin	2010	<i>J Liposome Res</i>
4	Antioxydant compounds from propolis collected in Anhui, China	Haisha Yang	2011	<i>Molecules</i>
5	Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities	Adne A Righi	2011	<i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i>
6	Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials	Ghassan M. Sulaiman	2011	<i>Food and Chemical Toxicology</i>
7	Antioxydant effect of propolis against exposure to chromium in <i>Cyprinus carpio</i>	M. Enis Yonar	2011	<i>Environmental Toxicology</i>
8	Antioxydant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods	Supakit Khachananda	2013	<i>Asian Pacific journal of cancer prevention</i>
9	Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from <i>Melipona orbignyi</i> (Hymenoptera, Apidae)	Jaqueline Ferreira Campos	2014	<i>Food and Chemical Toxicology</i>
10	Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis	Severine Boisard	2014	<i>J Agric Food Chem</i>
11	Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the region del maule, central chile	Nélida Nina	2015	<i>Molecules</i>

<b>12</b>	Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats	Romana Ahmed	2017	<i>Evid Based Complement Alternat Med</i>
<b>13</b>	Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region	Julianna Karla Santana Andrade	2017	<i>PLoS One</i>
<b>14</b>	Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of <i>Plebeia droryana</i> and <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome	Thaliny Bonamigo	2017	<i>PloS One</i>
<b>15</b>	Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts	Rejane Pina Dantas Silva	2017	<i>PloS One</i>
<b>16</b>	Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of propolis from Two Native Bees in Brazil: <i>Scaptotrigona depilis</i> and <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Thaliny Bonamigo	2017	<i>Oxidative Medicine and Cellular Longevity</i>
<b>17</b>	Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	R.S. Veiga	2017	<i>Journal of Applied Microbiology</i>
<b>18</b>	Identification of Resveratrol as Bioactive Compound of Propolis from Western Romania and Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts	Alexandra Duca	2019	<i>Molecules</i>
<b>19</b>	Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis	Tugba Ozdal	2019	<i>Food chem</i>
<b>20</b>	Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts	Marwa Ezz El-Din Ibrahim	2022	<i>International Journal of Food Microbiology</i>

### 3.3 Analyse des données

Les articles inclus ont été par la suite relus afin d'analyser et extraire toutes les données pertinentes en relation avec notre problématique. Cette étape nous a permis de tirer 83 critères. Pour chaque étude, les différents critères, leurs propositions, leur saisie et leur analyse statistique ont été réalisés avec le logiciel SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) version 20. Ce dernier est un outil statistique polyvalent largement utilisé par les chercheurs pour manipuler et gérer les données, il fournit un environnement de visualisation rapide qui va des modèles les plus simples aux plus complexes. SPSS offre également une documentation des données, il permet aux chercheurs de stocker un répertoire de métadonnées, il agit comme un dépôt centralisé d'informations relatives aux données telles que les relations avec d'autres données, leur signification, leur origine, leur format et leur utilisation.

L'analyse des données a été réalisée de manière qualitative, sous forme d'une synthèse descriptive, adaptée à l'objectif de recherche de notre revue systématique (Tableau 8).

**Tableau 8.** Critères de jugement des études incluses dans la revue systématique de la littérature par le logiciel SPSS.

N°	Critère	Objectif du critère	
1	Code de l'article	Organisation	
2	Année de publication		
3	Pays de recherche	Description des recherches sélectionnées dans l'axe de valorisation de l'activité antioxydante de propolis	
4	Nombre de chercheurs		
5	Présence de collaboration		
6	Type de collaboration		
7	Objectif de l'étude		
8	Nombre d'activités biologiques étudiées		
9	Etude de l'activité antioxydante		
10	Etude de l'activité antimicrobienne		
11	Etude de l'activité antiparasitaire		
12	Etude de l'activité anticancéreuse et cytotoxique		
13	Etude de l'activité cardioprotectrice		
14	Type d'étude de l'activité antioxydante		
15	Origine géographique des échantillons de propolis		Echantillonnage, caractéristiques de propolis et préparation des échantillons
16	Nombre des régions étudiées		
17	Mention de la saison de collecte		
18	Mention de l'année d'échantillonnage		
19	Nombre d'échantillons		
20	Moyen d'obtention		
21	Mention de l'origine botanique		
22	Mention de l'espèce d'abeille		
23	Couleur de propolis		
24	Aspect physique de l'échantillon de propolis		

25	Préparation de l'échantillon avant l'extraction	
26	Conservation de l'échantillon	
27	Réalisation d'extraction	
28	Nombre des techniques d'extraction	
29	Nom des techniques d'extraction	
30	Solvant d'extraction	
31	Nombre des extraits	
32	Pourcentage d'éthanol utilisé	
33	Mention de la température d'extraction	
34	Mention de la durée d'extraction	
35	Concentration des extraits	
36	Méthode de concentration des extraits	
37	Utilisation de la lyophilisation	
38	Conservation des extraits	
39	Température de conservation des extraits	
40	Fractionnement	
41	Type de fractionnement	
42	Dosage des molécules	
43	Nature des molécules dosées	
44	Nombre des techniques de dosage des phénols totaux	Extraction et traitement des extraits
45	Nom des techniques de dosage des phénols totaux	
46	Standard utilisé pour le dosage des phénols totaux	
47	Nombre des techniques de dosage des flavonoïdes	
48	Nom des techniques de dosage des flavonoïdes	
49	Standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes	
50	Analyse chimique	
51	Nombre des techniques d'analyse chimique	
52	Types des techniques d'analyse chimique	
53	Utilisation de la technique HPLC	
54	Utilisation de la technique HPLC-ESI/MS	
55	Utilisation de la technique LC-MS	
56	Utilisation de la technique HPLC-DAD	
57	Utilisation de la technique GC-MS	
58	Nombre des molécules identifiées	
59	Classes chimiques des molécules identifiées	
60	Constituants majeurs auxquels l'activité antioxydante est associée	
61	Nombre des tests d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits
62	Utilisation du test au DPPH	
63	Solution de préparation	
64	Longueur d'onde utilisée	
65	Standard utilisé	
66	Extrait actif	
67	Activité antioxydante de l'extrait le plus actif	
68	Utilisation du test de FRAP	

69	Solution de préparation
70	Longueur d'onde utilisée
71	Standard utilisé
72	Utilisation du test ABTS/TEAC
73	Solution de préparation du test ABTS/TEAC
74	Longueur d'onde utilisée
75	Standard utilisé
76	Utilisation du test ORAC
77	Utilisation du test de blanchiment de $\beta$ -carotène
78	Utilisation du modèle d'érythrocytes humaines
79	Modèle animale utilisé dans les tests <i>in vivo</i>
80	Voie d'administration
81	Concentration des extraits administrés
82	Durée du traitement
83	Nature des tests d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vivo</i>

### 3.4 Analyse descriptive et statistique

L'analyse statistique des données des études sélectionnées a été exécuté en fonction des variables traitées :

Le test de corrélation linéaire de Pearson afin de vérifier la liaison statistique entre deux variables quantitatives continues. La valeur de  $r$  obtenue est une estimation de la corrélation entre deux variables dans une population. Sa valeur fluctuera d'un échantillon à l'autre,  $r$  prend une valeur comprise entre -1 (corrélation négative) et 1 (corrélation positive),  $r = 0$  signifie aucune corrélation (les deux variables sont indépendantes).

Le test d'indépendance du Khi-deux ( $\chi^2$ ) afin de vérifier si deux variables qualitatives sont susceptibles d'être liées ou pas. Le seuil de risque ( $\alpha$ ) a été fixé à 5 %. Les valeurs de signification asymptotique bilatérale ( $\sigma$ ) des résultats d'analyse de  $\chi^2$  ont été comparées à  $\alpha$ , dont si :

$\sigma \leq \alpha$  hypothèse 0 ( $H_0$ ) est vrai, les deux variables sont dépendantes.

$\sigma > \alpha$  hypothèse 1 ( $H_1$ ) est vrai, les deux variables sont indépendantes.

Le traitement des graphes a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 8.0.2.

# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussion**

## 4 Résultats et discussion

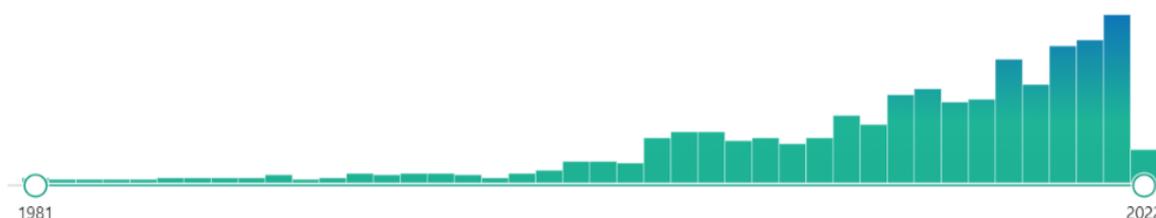
### 4.1 Description des recherches sélectionnées dans l'axe de valorisation de l'activité antioxydante de propolis

Avec le progrès de la science, la nécessité de trouver des médicaments et des alternatives naturels pour prévenir diverses maladies et problèmes de santé publique a considérablement augmentée. Certains de ces traitements incluent l'utilisation des produits apicoles tels que le miel, la cire d'abeille et la propolis.

#### 4.1.1 Année de publication

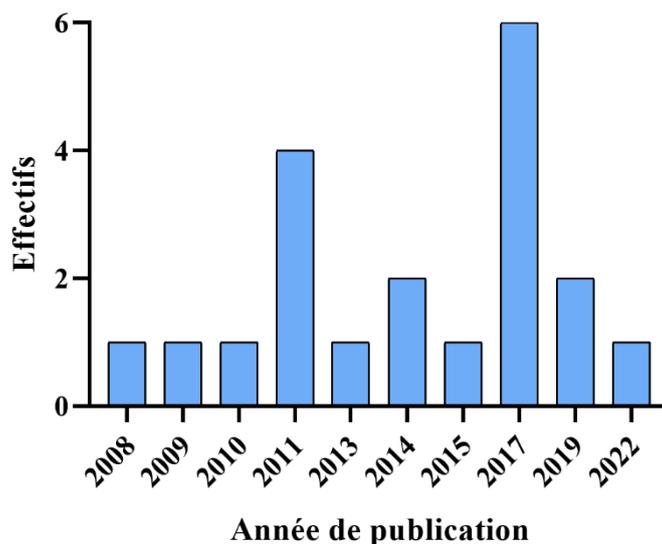
L'intérêt croissant des chercheurs pour les activités biologiques de la propolis, notamment son potentiel antioxydant, est remarquable par la présence de nombreuses publications qui ne cessent de progresser dans diverses bases de données scientifiques. A titre d'exemple, la consultation de la base PubMed (Figure 4) nous a montré que depuis 1981 (une seule publication), de nombreux modèles ont été exploités pour évaluer le pouvoir antioxydant de la propolis. Le nombre des travaux scientifiques sur l'activité antioxydante de la propolis a culminé en 2021 avec 114 publications. On peut clairement voir que malgré la diminution de la production scientifique pendant la pandémie de COVID-19, la propolis a continué d'être une cible d'intérêt pour la communauté scientifique.

Pendant cette pandémie, les chercheurs ont démontré l'efficacité antivirale de propolis contre ce virus. Face à ces résultats, ils ont commencé à tester à travers de nombreux travaux, le potentiel antioxydant de propolis afin de trouver des solutions efficaces pour soulager les symptômes grippaux de la COVID-19 (Miryan *et al.*, 2020) et diminuer l'incidence des dommages cardiovasculaires causés par cette maladie, qui a exposé l'humanité à un risque accru de thrombose veineuse profonde (Zulhendri *et al.*, 2021). La valeur des résultats scientifiques dans cet axe en 2022 (le 16 Mars) laisse à supposer que les recherches sont en cours d'achèvement ou elles n'ont pas encore été publiées.



**Figure 4.** Répartition chronologique des études de l'activité antioxydante de propolis dans PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=antioxydant%20activity%20of%20propolis>)

La figure 5 représente la répartition des articles scientifiques sélectionnés aléatoirement dans cette étude, en fonction de l'année de publication. Selon les études retenues, en partant de 2008 à 2022, on a remarqué que le nombre des recherches publiées concernant la contribution de l'activité antioxydante de la propolis dans le domaine du stress oxydatif, varie d'une à deux jusqu'à quatre études par an, sauf pour l'année 2017, où on a obtenu un effectif plus élevé par rapport aux autres années avec six études publiées.



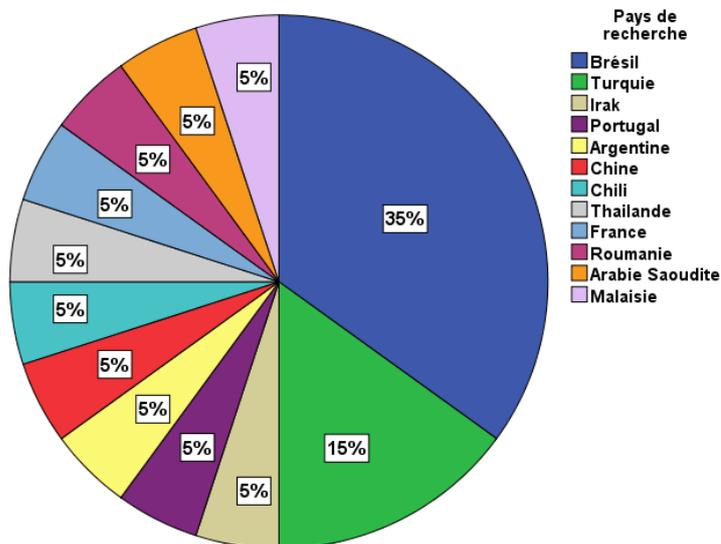
**Figure 5.** Diagramme en bâtons des années de publication des articles sélectionnées.

#### 4.1.2 Pays de recherche

L'analyse de la répartition des 12 pays de recherches des publications sélectionnées (Figure 6), a montré que le Brésil occupe la première place avec un pourcentage de 35% des publications étudiées. En deuxième lieu, on trouve la Turquie avec un pourcentage de 15%. Nos résultats sont conformes aux données rapportées dans la littérature par Katekhaye et son équipe (2019), qui ont constaté à travers une étude statistique de 2095 publications scientifiques sur la propolis, que le Brésil est l'un des grands pays contributeurs dans la recherche sur la propolis.

La propolis brésilienne a suscité l'intérêt de nombreuses études scientifiques, que ce soit par les chercheurs brésiliens ou au niveau mondial puisque ce pays est l'un des producteurs importants de la propolis verte dans le marché mondial, qui est très connu pour sa richesse en agents antioxydants (Sawaya *et al.*, 2011). De plus, son statut développé et sa puissance économique fournissent un environnement favorable à la recherche scientifique, ce qui implique la disposition de laboratoires bien équipés pour répondre aux besoins des chercheurs.

On a observé à travers cette analyse, l'absence des études sur la propolis algérienne. Ceci est peut-être associé au fait que les journaux utilisés par les chercheurs algériens ne sont pas indexés à PubMed.



**Figure 6.** Diagramme circulaire représentatif des pays de recherche.

#### 4.1.3 Collaboration des chercheurs

D'après les articles sélectionnés, on a trouvé que le nombre des chercheurs varie largement entre 2 à 13 chercheurs par article (Tableau 9). L'absence des travaux individuels dans ce domaine est influencée par la nature et le nombre d'objectifs ciblés dans les études intéressées par la valorisation de propolis. L'exploration de plusieurs activités biologiques ainsi que les études qui exploitent différents échantillons de propolis et cherchent à les comparer chimiquement nécessitent un travail de groupe et la distribution des tâches entre les chercheurs.

**Tableau 9.** Nombre des chercheurs.

Nombre des chercheurs	Effectifs	Pourcentage
2	1	5%
4	3	15%
5	2	10%
6	3	15%
8	3	15%
9	5	25%
10	2	10%
13	1	5%

On a également remarqué la présence de collaborations dans toutes les études ciblées dans ce travail, dans lesquelles la collaboration nationale est dominante par rapport à celle internationale par un pourcentage de 75% (Tableau 10).

**Tableau 10.** Types de collaboration.

Type de collaboration	Effectifs	Pourcentage
Nationale	15	75%
Internationale	5	25%

La collaboration dans le domaine de la biologie n'est pas quelque chose de nouveau, elle peut prendre nombreuses formes, y compris les collaborations multidisciplinaires, qui impliquent des coopérations variées entre les chimistes, les physiciens, les médecins et les biologistes, dans un objectif d'échange de connaissances entre les spécialités complémentaires qui mettent les scientifiques en contact avec une diversité d'opinions d'une valeur inestimable et permet d'acquérir de nouveaux points de vue pour satisfaire et enrichir un champ de recherche bien précis.

En outre, le développement d'instruments volumineux et extrêmement coûteux, représente l'une des causes qui poussent les scientifiques vers la collaboration afin de partager les frais de recherche (Vermeulen *et al.*, 2013).

Que ce soit pour avoir accès à l'équipement spécialisé, de nouvelles sources de financement ou pour trouver de nouvelles idées, la science est sans aucun doute un projet qui touche le monde entier et la recherche universitaire se mondialise avec le progrès de la science. Toutefois, les collaborations internationales sont accompagnées par certaines difficultés. Le manque de capacités linguistiques, notamment l'anglais qui est devenu une langue scientifique dominante est la principale cause de l'échec des collaborations internationales vu qu'il rend la communication entre les chercheurs difficiles. En outre, les fuseaux horaires différents peuvent rendre difficile l'organisation des réunions en raison de la répartition des collaborateurs dans le monde entier, ce qui tend à ralentir l'avancement des projets internationaux. L'obtention de visas ralentit aussi parfois le travail. De plus, les délais des procédures de candidature et les calendriers de financement ne correspondent pas toujours, ce qui peut compliquer la collaboration entre des organisations de différents pays.

#### 4.1.4 Objectif de l'étude

L'importance de définir les objectifs de recherche réside dans le conditionnement du choix de la population, de l'unité d'échantillonnage, du type et de la qualité des informations recueillies. L'ensemble des objectifs développés dans un travail scientifique définit la nature

et la source des données requises et garantira que toutes les informations nécessaires soient recueillies et que toute redondance soit éliminée.

D'après notre analyse, 45% des études sélectionnées avaient principalement pour but, l'étude de l'activité antioxydante avec l'investigation du profil chimique des extraits de propolis (Tableau 11). Cette association permet l'enrichissement de l'industrie pharmaceutique qui bénéficie des trouvailles des études de caractérisation chimique des échantillons de propolis et donne une idée sur l'utilisation pharmacologique réelle des molécules bioactives isolées à partir de cette résine miraculeuse.

**Tableau 11.** Objectifs des études sélectionnés.

Objectif	Effectifs	Pourcentage
Caractérisation chimique et étude de l'activité antioxydante de propolis	9	45%
Caractérisation chimique, étude de l'activité antioxydante et d'autres activités biologiques de propolis	7	35%
Etude de l'activité antioxydante et d'autres activités biologiques de propolis	3	15%
Effet de la saison et méthode de récolte sur l'activité antioxydante de propolis	1	5%

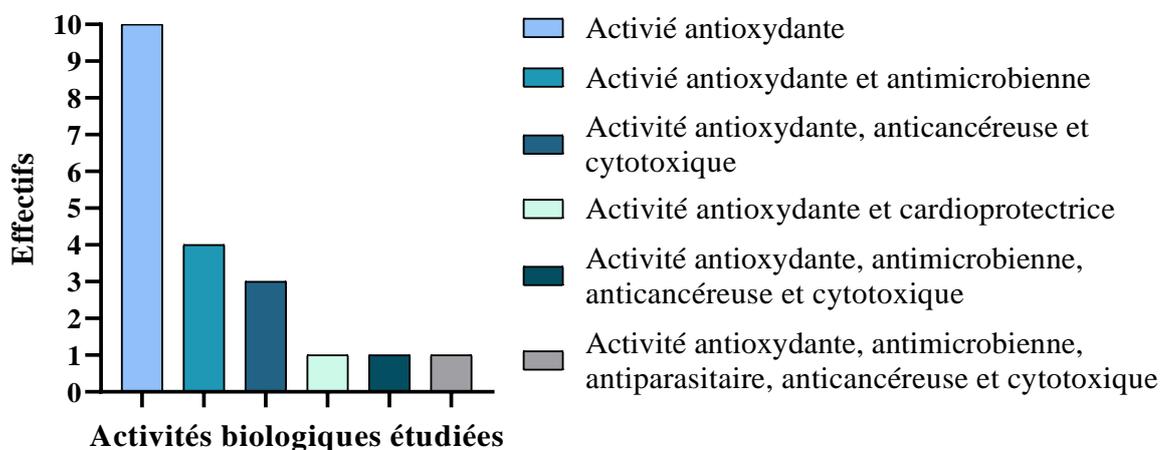
L'analyse d'un grand nombre d'échantillons provenant de différentes origines géographiques a révélé au cours des années que la composition chimique de la propolis est très variable et difficile à standardiser. Cela peut justifier l'importance de lier ces deux objectifs ensemble en raison de l'influence directe de la composition chimique et de la structure des agents thérapeutiques sur le type et l'intensité des activités biologiques de la propolis.

Elle permet également, de rapprocher les chercheurs vers l'identification des marqueurs chimiques pour classer les différents types de propolis. Dans ce contexte, Matsuda et de Almeida-Muradian (2008) ont rapporté dans leur étude qu'un marqueur est une substance trouvée de façon abondante et constante dans un type donné de propolis et que son identification est de grande utilité pour la caractérisation de la source végétale de la propolis. C'est le cas de l'artepilline C, qui a été établie comme un marqueur de la propolis verte brésilienne où sa quantification est devenue un indicateur de la qualité de ce produit.

#### 4.1.5 Activités biologiques de propolis associées à l'activité antioxydante

La science moderne s'est concentrée sur la propolis après les années 60, inspirée par l'intérêt général pour les produits de l'abeille et les produits naturels. La littérature scientifique a rapporté et confirmé la polyvalence des activités pharmacologiques de la propolis, non seulement ceux issues de différents écosystèmes mais ces variabilités ont été prouvées pour des échantillons provenant de la même ruche, ce qui confirme la complexité de sa composition chimique qui influence ses propriétés thérapeutiques, à savoir son effet antimicrobien, anticancéreux, hépato-protecteur, antiparasitaire, anti-inflammatoire, antioxydant et hypoglycémiant qui pourrait avoir un impact positif sur les complications du diabète (Banskota *et al.*, 2001).

D'après les résultats obtenus dans la figure 7, on a constaté que 50% des travaux sélectionnés ont focalisé sur l'étude de l'activité antioxydante séparément des autres activités biologiques mais en association à d'autres objectifs. Cela est probablement dû à l'influence des mots-clés utilisés dans la recherche des articles inclus dans ce travail systématique, vu que notre thématique s'intéresse à cette activité.



**Figure 7.** Histogramme représentatif de l'effectif des activités biologiques associées à l'activité antioxydante.

Cependant, on a trouvé que la moitié des études ciblées ont traité d'autres activités pharmacologiques de la propolis en association avec l'effet antioxydant, dont le nombre a atteint jusqu'à cinq activités par article. L'effectif élevé des activités biologiques associées donne plus de valeur aux échantillons testés et confirme la possibilité d'usage multiple de ce produit. On a également noté que certaines activités biologiques de la propolis sont uniques indépendamment du type de propolis et de son origine, comme l'activité antimicrobienne et antioxydante, tandis que certaines fonctions biologiques comme l'activité anticancéreuse sont

spécifiques et dépendent de la présence de certains composés biologiquement actifs. Ces trouvailles impliquent que la prise en considération de la variabilité des effets thérapeutiques de la propolis est un stimulus pour étudier en profondeur la chimie de ses sources végétales.

Selon les articles ciblés, on a constaté que l'activité antimicrobienne est l'une des activités biologiques de la propolis les plus étudiées en association à l'activité antioxydante. La propolis est un agent antimicrobien par excellence, cette propriété a été inspiré par son usage par les abeilles sur les cadavres des intrus qui ne peuvent pas être évacués, empêchant ainsi leur décomposition (Anjum *et al.*, 2019). Cette activité a suscité l'intérêt du domaine médical ces dernières années, en raison du besoin croissant de trouver de nouveaux traitements pour les maladies infectieuses, surtout avec l'augmentation de la résistance des agents pathogènes aux antibiotiques actuellement utilisés. De nombreuses recherches ont prouvé l'efficacité des extraits de propolis contre un large éventail de bactéries Gram positives et Gram négatives (Przybyłek et Karpiński, 2019) telles que *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. De plus, la propolis agit comme un bactéricide en intervenant dans l'arrêt de la division cellulaire des bactéries, la synthèse des protéines, la destruction de la paroi cellulaire et le cytoplasme bactérien (Anjum *et al.*, 2019; Parolia *et al.*, 2010).

Ota et ses collaborateurs (2001) ont montré le potentiel rôle antifongique de propolis dirigé contre les différentes espèces du genre *Candida* et sur d'autres souches de levures. La propolis intervient également dans la protection contre de nombreux virus dont les myxovirus, les poliovirus, les rotavirus (Siheri *et al.*, 2017), les adénovirus (Schnitzler *et al.*, 2010) et récemment elle a démontré son effet antiviral contre le SARS-CoV-2 (Zulhendri, Chandrasekaran, *et al.*, 2021).

L'activité anticancéreuse et cytotoxique arrivent en deuxième position. La reconnaissance des caractéristiques du cancer a un impact positif sur la recherche et le développement de nouvelles méthodes et de nouveaux agents thérapeutiques offrant une fenêtre thérapeutique suffisamment large pour tuer les cellules tumorales tout en préservant les cellules normales. Ces dernières années, la propolis a suscité un intérêt croissant de la part d'un grand nombre de chercheurs grâce à la variabilité de ses composés phytochimiques qui peuvent agir par le biais de multiples voies pour réduire les développements malins des cellules cancéreuses. L'efficacité des extraits de propolis administrés seuls ou en tant qu'adjuvant, a été démontré contre le cancer du cerveau, de la prostate, des seins, du colon, du pancréas, ... etc. dans diverses études *in vitro* et *in vivo* (Patel, 2016). Il a été également mentionné que la propolis exerce son effet anticancéreux par le biais de l'immuno-modulation principalement en raison de l'augmentation de l'immunité non spécifique par l'activation des macrophages qui, à

leur tour, pourraient secréter des cytokines qui interfèrent directement avec les cellules tumorales ou avec la fonction d'autres cellules immunitaires (Oršolić *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2011). La propolis améliore l'activité lytique des cellules tueuses naturelles contre les cellules tumorales (Sforcin, 2007). Ce produit naturel peut bloquer les voies de signalisation de l'oncogenèse qui, à leur tour, entraînent une diminution de la prolifération et de la croissance cellulaires et peut également agir en diminuant la population de cellules souches cancéreuses, en augmentant l'apoptose, en exerçant des effets antiangiogéniques et en modulant le microenvironnement tumoral (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Des effets significatifs contre différentes espèces de parasites a été démontrée, notamment la *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma cruzi* (qui cause la maladie du Chagas), *Trypanosoma brucei* (qui cause la maladie du sommeil) et *Trypanosoma evansi* (Siheri *et al.*, 2017).

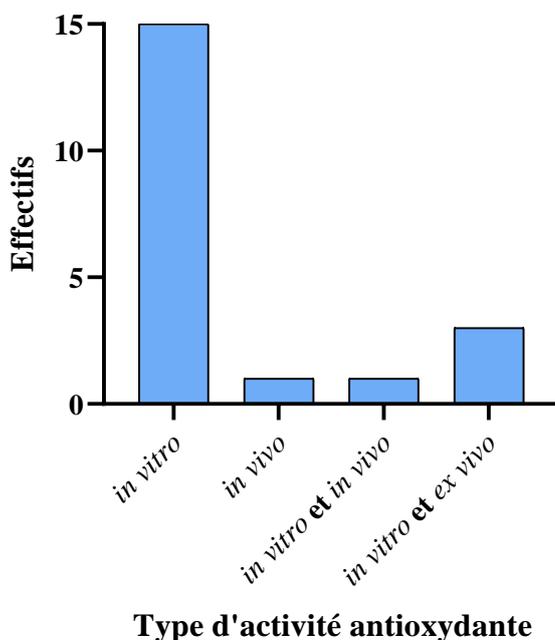
Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, représentant un lourd fardeau économique et affectant profondément la qualité de vie des patients (Silva *et al.*, 2021). La capacité cardioprotectrice de la propolis est attribuée à son activité antioxydante sachant que le stress oxydatif joue un rôle dans le déclenchement des maladies cardiovasculaires à travers l'oxydation des lipoprotéines de faible densité qui déclenchent le processus d'athérogénèse, entraînant l'athérosclérose qui affecte gravement l'état des vaisseaux sanguins (Braakhuis, 2019). La modulation des marqueurs des maladies cardiovasculaires par la propolis a été démontrée dans plusieurs études. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont été développés afin d'élucider les mécanismes moléculaires de cet effet bénéfique dont la régulation du métabolisme et des lipoprotéines, modulation de l'expression des gènes, diminution des cytokines inflammatoires et du stress oxydatif, amélioration de la fonction endothéliale et inhibition de l'agrégation plaquettaire (Daleprane et Abdalla, 2013).

#### **4.1.6 Type d'étude de l'activité antioxydante (*in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*)**

L'un des défis majeurs lors de l'étude de l'activité antioxydante de propolis est le choix des tests et des modèles d'évaluation de cette activité, du fait qu'elle est relayée par une multitude de voies d'action parmi lesquelles figurent : l'inhibition d'enzymes pro-oxydantes, induction de l'expression des gènes qui codes pour les enzymes antioxydantes, la détoxification des ERO par voie enzymatique, la chélation des métaux de transition, ...etc. De plus, la complexité et la diversité des systèmes d'étude ont conduit au développement d'une multitude de tests *in vivo* et *in vitro*, aucun d'entre eux ne permet malheureusement d'évaluer de manière globale le potentiel antioxydant de propolis (Laguerre *et al.*, 2007).

Afin d'analyser la répartition des études sélectionnées selon les modèles expérimentaux utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de propolis, nous avons associé les travaux qui utilisaient des réactions avec des radicaux chimiques aux tests *in vitro*, ceux qui ont effectué des manipulations sur des tissus et lignées cellulaires aux tests *ex vivo* et enfin ceux qui ont travaillé avec un modèle animal aux tests *in vivo*.

À travers cette étude, nous avons remarqué que 75% des études sélectionnées ont utilisé des tests *in vitro* pour l'évaluation de l'activité antioxydante de propolis. Ce type de test est parfois complété par des expériences *ex vivo* (Figure 8) tels que la peroxydation lipidique qui est généralement exploité sur un modèle d'érythrocytes humaines. On a également remarqué que les tests *in vivo* sont moins employés (5%). Cela est peut-être attribué à leur complexité, au coût élevé des expériences, à la facilité d'altération des paramètres biochimiques comme les enzymes et du fait que ces tests soulèvent des problèmes éthiques.



**Figure 8.** Histogramme des effectifs des tests d'évaluation de l'activité antioxydante.

Les essais *in vitro* sont faciles, rapides, moins onéreux et fournissent une compréhension acceptable des modes d'actions en raison de l'évaluation séparée des effets biologiques où les conditions de manipulations peuvent être bien contrôlées. De nombreux tests *in vitro* sont désormais disponibles, qui contrôlent généralement l'effet inhibiteur de l'antioxydant sur la dégradation oxydative d'un substrat dans des conditions d'oxydation naturelles ou artificielles. Globalement, cette mesure nécessite de se concentrer soit sur la perte de substrat oxydable, soit sur la formation de produits d'oxydation.

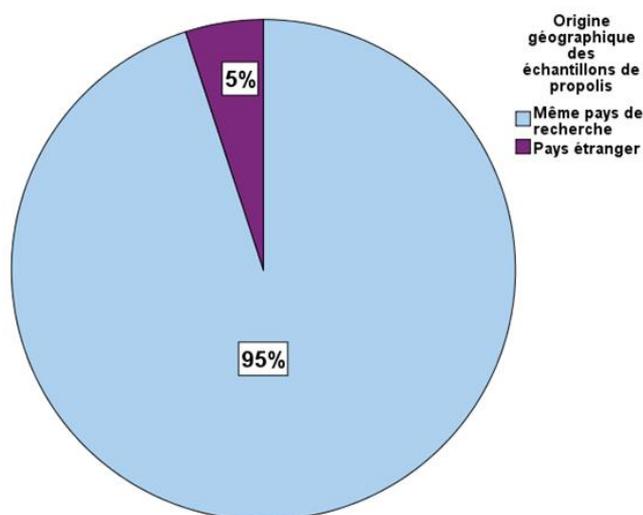
Cependant, les résultats de ce genre de test ne permettent pas de finaliser les décisions sur un phénomène complexe comme le stress oxydatif en raison de manque de la bio-cinétique, ce qui rend difficile l'extrapolation des trouvailles *in vitro* à l'organisme humain et par conséquent les chercheurs nécessitent d'établir le lien entre les résultats des différentes approches méthodologiques afin d'assurer la précision et la fiabilité des résultats.

## 4.2 Echantillonnage et caractéristiques de propolis

Dans cette section, les données des échantillons utilisées dans les articles sélectionnées ont été analysées et regroupées de façon homogène et informative en tenant compte de leur origine géographique, saison de collecte, année d'échantillonnage, moyen d'obtention...etc.

### 4.2.1 Origine géographique des échantillons de propolis

Les résultats d'analyse des articles sélectionnés ont montré que 95% (Figure 9) des travaux ont testés des échantillons qui proviennent de leur pays de recherche correspondant, ce qui implique la volonté des chercheurs à valoriser la qualité de la propolis locale et de découvrir ses propriétés thérapeutiques, surtout avec la grande diversité de cette résine qui est largement influencé par la végétation disponible.



**Figure 9.** Répartition en pourcentage d'origine géographique des échantillons.

En analysant les pays de recherche, on peut clairement comprendre l'intention des scientifiques à donner de l'importance à la propolis locale. Les pays de l'Amérique latine et surtout le Brésil disposent de la plus grande diversité biologique au monde, comme le territoire brésilien est recouvert en grande partie par l'Amazonie, le plus grand bassin forestier de la planète. Donc, la richesse de cette biodiversité floristique est directement liée à l'existence de nombreux types de forêt dont les différences de structure et de composition dépendent en

grande partie des sols et des reliefs. Leur composition peut correspondre à des faciès géographiques caractérisés par la prépondérance de grandes familles botaniques.

La propolis des zones tempérées et surtout celle provenant de l'Europe et des régions non tropicales de l'Asie, est très étudiée et valorisée par les scientifiques du monde entier. L'intérêt pour l'utilisation de la propolis en pharmacologie ne cesse de croître parmi les chercheurs européens, en raison de son efficacité prouvée.

Située entre le monde polaire et le monde tropical, la zone tempérée subit, sur ses marges, les influences de l'un et de l'autre tant pour le climat que pour les modelés (Saur, 2012). Cette région est caractérisée par une mosaïque complexe de végétation dont la structure et la proportion relative des espèces varient en relation avec le large gradient climatique. Cependant, les exsudats des bourgeons de l'espèce *Populus* sont la principale source de résines pour les abeilles (Dezmirean *et al.*, 2020). En raison de la différence de végétation dans les régions tropicales, la composition chimique de la colle d'abeille est très différente de celle des espèces de *Populus* (Ristivojevic *et al.*, 2015).

Il faut signaler que la production excédentaire du secteur apicole ne trouve pas de débouchés suffisants sur le marché et les pertes post récolte demeurent importantes. La faible valorisation des produits locaux et la concurrence des produits apicoles importés font obstacle au développement économique. L'ouverture des marchés aux produits de l'étranger et l'exportation des produits locaux exigent l'établissement d'indicateurs de qualité. Ceci permet à certains produits comme la propolis de se différencier sur les marchés locaux et internationaux et d'orienter le choix du consommateur.

Concernant le nombre des régions étudiées, on a trouvé que 60% des articles sélectionnés ont travaillé sur une seule région, ce qui implique que les différences entre les caractéristiques physicochimiques des échantillons provenant de régions géographiques distinctes ne sont pas suffisamment exploitées.

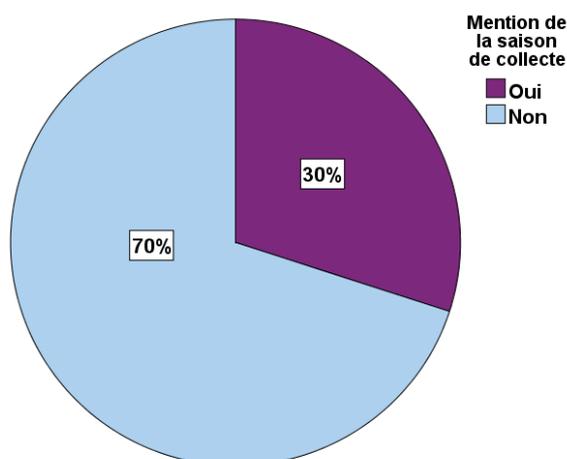
La composition de la propolis provenant de sources situées à de courtes distances les unes des autres dans la même région, peut différer considérablement en raison de la diversité des plantes et de la distance limitée de déplacement des abeilles entre le champ de collecte de la propolis et le lieu de dépôt (Marcucci, 1995).

Sachant que les matériaux disponibles pour la fabrication de la propolis sont des substances activement sécrétées par les plantes, il devient évident que la composition de la source végétale détermine la composition chimique de la colle d'abeille et par conséquent son effet pharmacologique. Donc, la négligence de l'importance des études comparatives traitant

les différents aspects des échantillons de propolis, contribue largement dans l'expansion du problème de standardisation dans ce domaine.

#### 4.2.2 Mention de la saison de collecte

Les résultats illustrés dans la figure 10 montre que 70% des articles n'ont pas mentionné la saison de collecte. Cela est peut-être lié aux choix des recherches sélectionnées dans notre travail (biais de sélection), qui n'ont pas focalisé sur l'influence de saison sur la composition chimique de propolis. Ou simplement dû au manque d'informations fournies par les propriétaires des ruches étudiées qui n'offrent pas aux chercheurs des calendriers de miellées qui sont plus ou moins diversifiées selon les saisons de floraison des plantes mellifères existantes.



**Figure 10.** Diagramme circulaire du pourcentage de mention de la saison de récolte.

L'absence de ce paramètre peut être également associée au fait que dans certains pays comme le Brésil où le climat tropical est dominant (humidité élevée et température chaude), la récolte de propolis par les abeilles peut durer toute l'année, donc ce produit est toujours disponible. Par contre, dans les pays situés dans les zones tempérées de l'hémisphère nord, les conditions climatiques ne permettent aux abeilles de récolter les résines de propolis que pendant une période précise, allant de la fin du printemps jusqu'au début de l'automne, par conséquent, aucune variation saisonnière entre les échantillons n'est attendue (Bankova *et al.*, 1998).

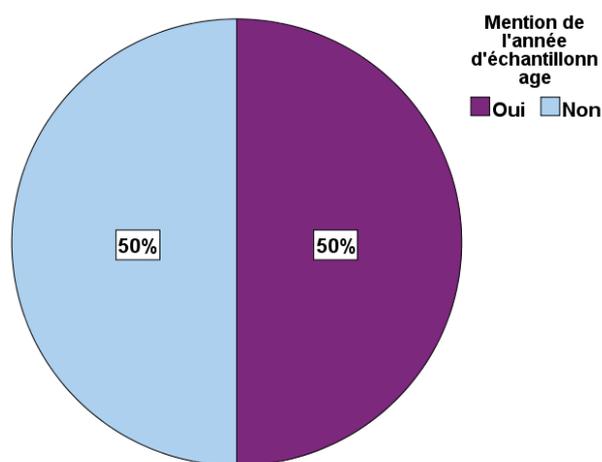
La propolis est récoltée principalement à la fin de l'été et en automne, notamment en septembre. Les abeilles continuent d'utiliser la propolis pour cimenter les ruches tout au long de l'automne, jusqu'à ce que le climat devienne trop froid pour le déplacement des abeilles butineuses. Cela peut se produire au début de novembre (Meyer et Ulrich, 1956). Donc, la saison de collecte est un paramètre à ne pas négliger lors des travaux scientifiques portant sur le profil chimique de la propolis, car elle fournit des données utiles qui permettent l'estimation

de la qualité et l'âge de propolis. Ainsi, elle permet d'évaluer les sources botaniques visitées par les abeilles en fonction des variations climatiques caractéristiques de chaque saison.

Un nombre limité d'études ont été menées pour évaluer l'effet de saison sur la composition chimique et les activités biologiques de la propolis (Valencia *et al.*, 2012). Cependant les résultats de ce genre d'étude se bousculent et se contredisent souvent. Certaines n'ont pas trouvé de différences significatives liées à l'effet de saison de collecte (Sforcin *et al.*, 2000, 2002) mais elle peut influencer quantitativement les composés actifs la propolis (Bueno-Silva *et al.*, 2017; Simões-Ambrosio *et al.*, 2010). D'autre part, certains chercheurs ont constaté d'après une analyse de la propolis brésilienne collectée mensuellement sur une période d'année, que les variations climatiques des saisons avaient une influence considérable sur l'activité antioxydante et le contenu phénolique total (Teixeira *et al.*, 2010).

#### 4.2.3 Mention de l'année d'échantillonnage

Les résultats d'analyse des études incluses dans ce travail systématique, montrent que 50% des articles ont mentionné l'année d'échantillonnage (Figure 11), alors que les articles représentant la moitié restante ont négligé la date de collecte des échantillons testés. En réalité, ce paramètre peut donner un aperçu sur la durée des recherches en faisant le rapport entre l'année d'échantillonnage et la date de publication des travaux.



**Figure 11.** Diagramme circulaire du pourcentage de mention de l'année d'échantillonnage

L'observation du rapport entre l'année d'échantillonnage et l'année de publication nous a montré que la durée moyenne des travaux réalisés sur l'activité antioxydante de propolis est comprise entre trois à quatre ans. On a également remarqué que certains projets peuvent durer jusqu'à neuf ans (Tableau 12).

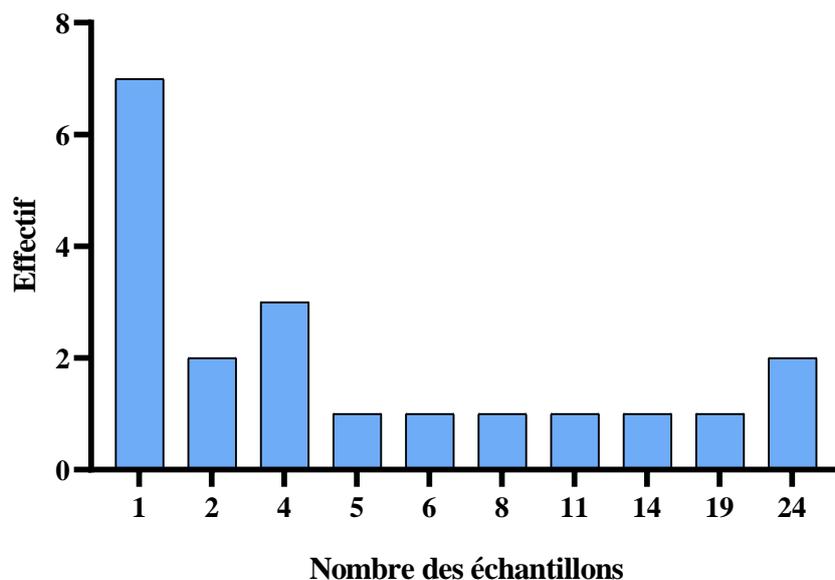
**Tableau 12.** Rapport année d'échantillonnage-année de publication.

		Année de publication										Total
		2008	2009	2010	2011	2013	2014	2015	2017	2019	2022	
Année d'échantillonnage	2000-2001	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2007-2008	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	2008	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	2015	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	2016	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	2013	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	2012-2014	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	2015-2016	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	2014	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	2020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Non mentionnée	1	0	1	2	1	2	0	3	0	0	10
Total	1	1	1	4	1	2	1	6	2	1	20	

La grande différence entre ces deux valeurs dans certains projets, peut donner une idée sur la possibilité de conserver la propolis pendant une longue période sans l'altération de sa composition chimique. Dans ce contexte, Conti et son équipe (2015), ont réalisé en 2012 une analyse chimique sur le même échantillon de propolis qu'ils ont investigué en 1997 par chromatographie en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse. Ils ont constaté à travers cette étude qu'après 15 ans de congélation, aucun changement qualitatif n'a été observé dans la composition de la propolis et seuls quelques composés chimiques ont montré un pourcentage faible en comparaison avec les résultats de la première analyse.

#### 4.2.4 Nombre d'échantillons

Le nombre d'échantillons dans les articles sélectionnés est compris entre 1 et 24 échantillons (Figure 12). Ces données varient selon le but de chaque article et les besoins des chercheurs. Cependant, on a remarqué la tendance des chercheurs à travailler avec un seul échantillon ce qui peut être expliqué par le fait que la plupart des articles choisis ont concentré sur la caractérisation chimique d'échantillons provenant d'une seule région ou pour des raisons de coûts et de délai des projets.



**Figure 12.** Diagramme en bâtons du nombre d'échantillons testés par les articles sélectionnés.

Il est très important d'utiliser une taille correcte pour l'échantillon. S'il est trop grand, ça peut créer des coûts inutiles et des retards de publications des travaux scientifiques. Quand un échantillon est trop petit, le chercheur n'obtiendra pas l'estimation souhaitée et les résultats deviennent statistiquement non significatifs et aucune conclusion fiable ne peut être tirée. La taille de l'échantillon est généralement fixée selon les objectifs de la recherche et par rapport au degré de précision exigé par le phénomène biologique que l'on veut étudier.

L'analyse du croisement entre l'objectif d'étude et le nombre d'échantillon (Tableau 13) a montré la présence d'une dépendance entre ces deux variables, où on a observé que les études comparatives qui ciblent l'effet de la variation de plusieurs facteurs sur la composition chimique de propolis comme la région géographique, la saison et la méthode de collecte, la nature du solvant et des techniques d'extractions et les études qui évaluent plusieurs activités biologiques de la propolis, nécessitent un nombre élevé d'échantillons.

**Tableau 13.** Répartition du nombre d'échantillons en fonction de l'objectif d'étude.

		Nombre d'échantillon										Total
		1	2	4	5	6	8	11	14	19	24	
<b>Objectif de l'étude</b>	Caractérisation chimique et étude de l'activité antioxydante de propolis	3	1	1	1	0	1	1	0	0	1	9
	Effet de la saison et méthode de récolte sur l'activité antioxydante de propolis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Caractérisation chimique, étude de l'activité antioxydante et d'autres activités biologiques de propolis	3	0	2	0	0	0	0	1	1	0	7
	Etude de l'activité antioxydante et d'autres activités biologiques de propolis	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3
<b>Total</b>		7	2	3	1	1	1	1	1	1	2	20

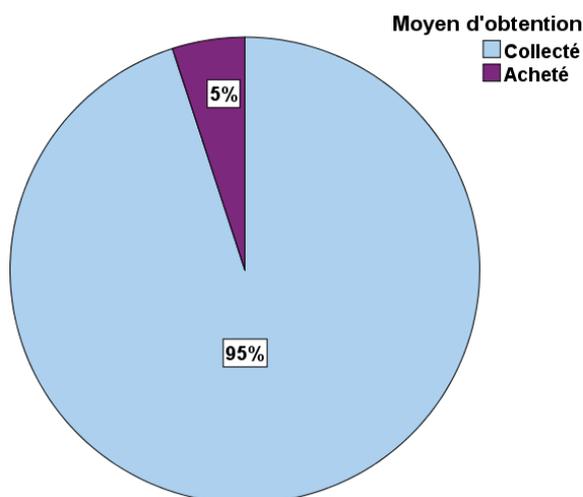
#### 4.2.5 Moyen d'obtention des échantillons

La figure 13 représente le pourcentage des moyens d'obtention des échantillons de propolis par les articles ciblés dans cette étude. Les résultats montrent que 95% des chercheurs ont collecté leur échantillon de propolis, alors que 5% ont l'acheté.

L'échantillonnage est une étape fondamentale dans le domaine de la biologie du fait que la précision des résultats repose sur la qualité d'échantillon. Les chercheurs préfèrent collecter leurs échantillons afin d'englober et contrôler tous les paramètres et les conditions qui peuvent avoir une influence sur la qualité du produit à tester et de limiter les risques d'altération des composés bioactifs ou de contamination associée à une mauvaise conservation, surtout dans le cas des travaux scientifiques réalisés sur la propolis où la qualité de ce produit exige la traçabilité des conditions de production.

Les caractéristiques physicochimiques sont influencées par plusieurs paramètres comme la méthode de collecte, les grilles utilisées par l'apiculteur, la présence d'impureté, la race d'abeille, la source botanique et la situation géographique de la ruche (Sforcin et Bankova, 2011).

Certains chercheurs se tournent vers l'achat des échantillons comme un moyen alternatif, en cas d'absence de propolis dans la région ou le pays de recherche, ou à des fins comparatives.

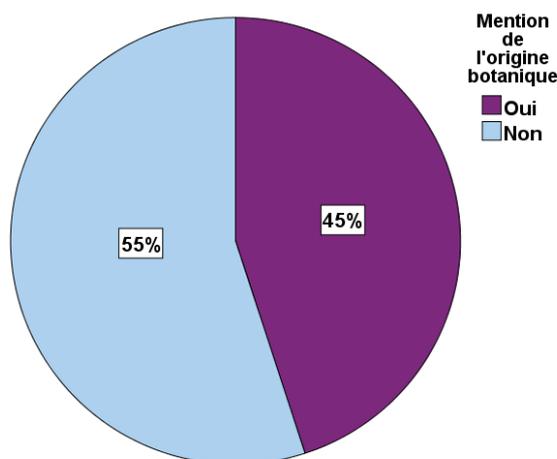


**Figure 13.** Diagramme circulaire du moyen d'obtention

#### 4.2.6 Mention de l'origine botanique des échantillons de propolis

Outre l'activité pharmacologique de la propolis, un point important dans la recherche sur les produits apicoles se réfère à la contribution de l'origine botanique des résines collectées par les abeilles sur la variation de la composition chimique de ce produit (Salatino *et al.*, 2005). Un nombre important d'articles traitant la chimie de la propolis ont conclu que sa composition est très influencée par la flore locale disponible sur le site de collecte (Bankova, 2005b; Conti *et al.*, 2015).

D'après notre analyse, on a observé que 55% des travaux sélectionnés dans ce travail n'ont pas mentionné la source végétale des échantillons de propolis (Figure 14). On a également remarqué que la majorité des études ne tentent pas à investiguer simultanément et de manière comparative les profils chimiques des végétaux suspectés et des extraits de propolis. Par contre, elles se contentent de citer uniquement le nom des espèces disponibles à proximité des ruches étudiées. Ceci peut être expliqué par le fait que l'attribution des échantillons de propolis à leur source botanique appropriée est une procédure très difficile, coûteuse et qui demande beaucoup de temps et de matériel sophistiqué, surtout dans les terrains qui disposent d'une variété d'espèces végétales.



**Figure 14.** Diagramme circulaire du pourcentage de mention de l'origine botanique

La connaissance des sources végétales de la propolis n'est pas seulement d'intérêt académique. Elle pourrait être utilisée comme support pour la standardisation chimique des types de propolis (Bankova *et al.*, 2000; Popravko, 1978).

Les plantes représentent une source riche en composés naturels bénéfiques, qui peuvent être utilisés à de nombreuses fins. Elles fournissent aux insectes une source de nourriture et de matières premières pour élaborer différents produits naturels, qui peuvent avoir un usage thérapeutique chez l'homme. Cette affirmation fait principalement référence aux insectes pollinisateurs comme les abeilles, qui utilisent des matières d'origine végétales comme le nectar, le pollen et les résines pour produire du miel et de la propolis. Les résines végétales, en particulier, renferment une large gamme de métabolites secondaires dont la fonction principale est de protéger les plantes contre différents agents pathogènes (Dezmirean *et al.*, 2020) et par conséquent, La composition de la source végétale détermine la composition chimique des produits de la ruche dont la propolis (Vardar-Ünlü *et al.*, 2008).

On distingue trois grandes catégories de propolis : celle des zones tempérées, des zones tropicales et subtropicales. Les premières études portant sur l'analyse chimique de la propolis sont apparues dans les années 70, dans lesquelles, les deux chercheurs Lavie (1975) en France et Popravko (1976) en Russie ont analysé la composition en flavonoïde de la propolis et l'ont comparée aux exsudats de bourgeons de peuplier et de bouleau (Bankova *et al.*, 2000). Plusieurs publications ont confirmé les résultats de ces chercheurs et maintenant il est chimiquement démontré que dans les zones tempérées (Europe, Amérique du nord et les régions non tropicales de l'Asie), les exsudats des espèces de *Populus* et leurs hybrides sont la principale source de propolis (Salatino *et al.*, 2005). D'autres sources importantes de propolis

européenne sont *Pinus sp.*, *Fraxinus sp.*, *Betula veruucosa* (Russie), *Betula pendula*, ... etc (Dezmirean *et al.*, 2020).

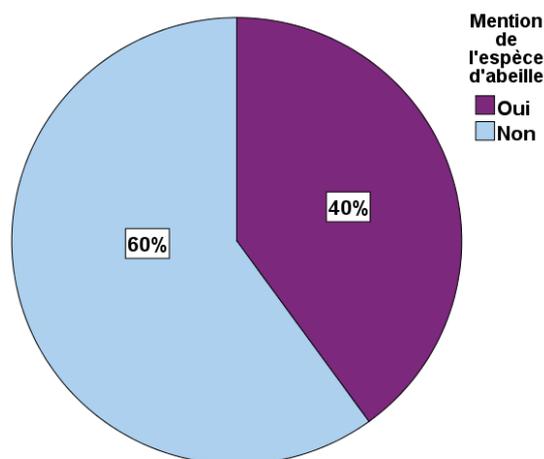
Dans les régions tropicales (Brésil, Cuba, Venezuela...) et subtropicales (Australie, Afrique du Nord...), il n'y a pas de peupliers et les abeilles récoltent la propolis d'autres sources végétales, c'est pour cette raison que la propolis provenant de ces régions possède un aspect, une composition chimique et des propriétés pharmacologiques différentes. Les principales sources de propolis brésilienne sont *Baccharis dracunculifolia*, *Dalbergia ecastophyllum*, *Araucaria angustifolia* et *Eucalyptus citriodora*. Les propolis du Venezuela et de Cuba sont caractérisées par les espèces *Clusia*, tandis que la propolis rouge mexicaine est attribuée au genre *Albergia* (Moise et Bobiş, 2020). L'un des types de propolis subtropicaux les plus importants s'est avéré être la propolis dite méditerranéenne qui est souvent issue du genre *Cupressus* (Bankova *et al.*, 2006).

La Propolis la plus souvent étudiée est la propolis verte brésilienne issue de *Baccharis dracunculifolia*, la propolis rouge provenant de *Dalbergia ecastophyllum* et la propolis européenne provenant essentiellement de peuplier (Cardinault *et al.*, 2012).

Il est important de signaler que ce domaine a connu quelques tentatives d'identification des sources botaniques de la propolis, au moyen de l'analyse du pollen. Selon Bankova et ses collaborateurs (2006), cette approche fournit souvent des résultats erronés. Avec cette analyse, il est impossible de savoir avec certitude si la présence d'un pollen spécifique est le résultat d'une visite ciblant à collecter la résine ou simplement qu'il s'agit d'une contamination par d'autres matériaux obtenus par les abeilles (Salatino *et al.*, 2005). L'analyse du pollen peut être utilisée pour l'identification de l'origine géographique, mais pas de la source végétale des résines de la propolis.

#### **4.2.7 Mention de l'espèce d'abeille**

L'analyse des articles sélectionnés a montré que 60% des études n'ont pas mentionné l'espèce d'abeille (Figure 15) malgré que la plupart des échantillons testés ont été collectés. Ceci est peut-être lié à la nature des objectifs ciblés par les recherches sélectionnées dans cette revue, ou en raison de manque d'informations fournies par les apiculteurs sur les ruchers.



**Figure 15.** Diagramme circulaire du pourcentage de mention de l'espèce d'abeille

Il est bien connu que la propolis est essentiellement utilisée par les abeilles à des fins hygiéniques contre les agressions des pathogènes et pour prévenir les infections bactériennes et fongiques. La connaissance des races d'abeilles qui fabriquent la propolis a une grande utilité pour la recherche, du fait que les abeilles effectuent le « screening » préliminaire des résines qui leur permet de connaître les sources végétales qui possèdent des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes élevées. Les chercheurs n'ont plus qu'à suivre et observer le comportement des abeilles pour identifier les sources régulièrement visitées par les butineuses et étudier en détail leur bioactivité et leurs principes actifs (Bankova *et al.*, 2006).

On note que la récolte de cette résine est sous l'influence de plusieurs facteurs. Les abeilles récoltent la propolis soit au début de printemps, soit à la fin de la miellée ou à l'approche de l'automne, au moment où la colonie commence les préparatifs pour l'hivernage en réponse aux conditions environnementales défavorables pour les abeilles. D'autre part, les ruches des régions boisées favorisent la fabrication de propolis. De plus, la race d'abeille exerce une influence sur ce critère.

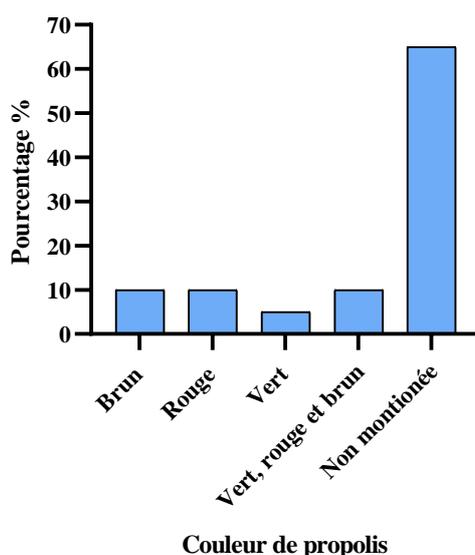
Il existe aujourd'hui une multitude de races d'abeilles domestiques destinées à l'élevage, certaines pures et d'autres issues de croisements. Les abeilles domestiques *Apis mellifera* sont les plus connues et les plus étudiées. L'adaptation de ces espèces aux conditions écologiques a donné lieu à des races d'écotypes locaux. Les races communes comprennent les abeilles caucasiennes (*A. mellifera caucasica*), les abeilles carnioliennes (*A. mellifera carnica*), les abeilles italiennes (*A. mellifera ligustica*), les abeilles anatoliennes (*A. mellifera anatoliaca*), les abeilles noires allemandes (*A. mellifera mellifera*) et les abeilles africanisées (*A. mellifera scutellata*).

Les abeilles qui fabriquent en générale d'avantage sont les abeilles grises ou également appelées abeilles noires *Apis mellifera* et certaines autres races d'Asie. Les abeilles caucasiennes (*A. mellifera cucasica*) utilisent de grandes quantités de propolis, rendant la modification des ruches commerciales difficile. La race carnolienne (*A. mellifera carnica*) utilise des quantités minimales de propolis et est donc largement utilisée dans l'apiculture commerciale (Mountford-McAuley *et al.*, 2021; Silici et Kutluca, 2005).

Il est important de signaler que la composition chimique de propolis ce défère d'une espèce a une autre à cause des sécrétions mandibulaires des abeilles récolteuses, et des substances ajoutées, par exemple la propolis des abeilles méliponines des régions tropicales (abeilles sans dard) se distingue de celle d'*Apis mellifera* par l'ajout de l'argile ou de la boue, ce type est connu sous le nom de géopropolis (Bogdanov, 2016).

#### 4.2.8 Couleur des propolis étudiées

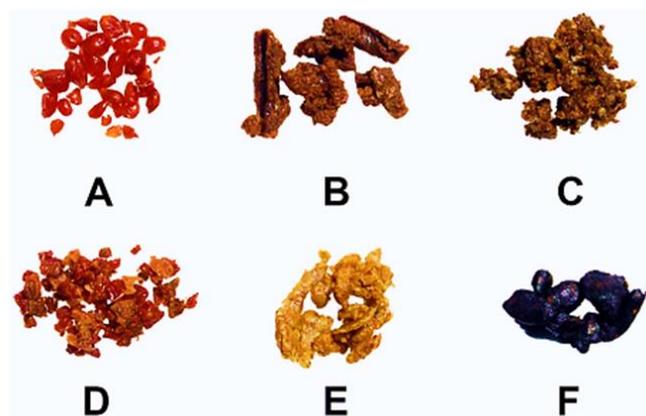
Les résultats d'analyse des articles sélectionnés, ont montré que 65% (Figure 16) des études n'ont pas mentionné la couleur de leurs échantillons de propolis, ceci peut s'expliquer par l'utilisation d'un mélange d'échantillons différents. En revanche, 35% des études ont indiqué la couleur de cette résine, dont la propolis verte brésilienne a été investigué dans 5% des études, alors que l'exploitation de la propolis rouge, brune (issu du peuplier), ainsi que les travaux qui ont focalisé sur la comparaison de propolis ayant différentes couleurs (brune, rouge et verte) ont été répartis de manière homogène (10%). Ces résultats sont influencés par le biais de sélection et représentent uniquement les études incluses dans ce travail systématique.



**Figure 16.** Diagramme en bâtons représentatif des couleurs de propolis étudiées

Les échantillons de propolis peuvent être classés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (couleur, texture et composition chimique) (Duru, 2021). La couleur de la propolis varie du jaune, vert, rouge au brun foncé (Cardinault *et al.*, 2012; Ghisalberti, 1979) jusqu'au noir (Duru, 2021).

La présence de plusieurs couleurs de propolis est souvent associée à l'influence de la flore locale autour la ruche, qui varie en fonction de la zone géographique et la saison. Cette information fournit un appui scientifique sur la possibilité d'employer la couleur de propolis comme critère dans la future standardisation des différents types de propolis (Duru, 2021). Dans une étude réalisée par Papachristoforou et son équipe (2019), les échantillons de propolis collectés dans différentes régions de Samothraki en Grèce, ont présenté une variation de couleur remarquable (Figure 17) allant du jaune clair, à toutes les nuances de brun, des mélanges de brun et de rouge jusqu'au brun foncé/noir.



**Figure 17.** Variation de la couleur de Propolis provenant de différentes régions géographiques. A) propolis rouge, B,C) propolis brune, D) propolis brune-rouge, E) propolis jaune, F) propolis noir (Papachristoforou *et al.*, 2019).

La couleur est également influencée par les préférences des abeilles envers des plantes ou des matières végétales particulières (Duru, 2021), l'espèce et l'âge de la plante utilisée par l'abeille (Ghedira *et al.*, 2009) et l'espèce d'abeille (Cardinault *et al.*, 2012; Ghisalberti, 1979).

Ali et ses collaborateurs (2012), trouvent que les flavonoïdes et les composés polyphénoliques qui forment environ 45 à 50 % de la composition de propolis en général, exercent une influence sur l'intensité de la couleur de propolis. La présence des anthocyanines dans les plantes joue un rôle dans l'attraction des insectes pollinisateurs qui est bien connue comme l'une des principales fonctions des flavonoïdes (Samanta *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, les résultats de Revilla et ses collaborateurs (2017) ont montré la présence d'une corrélation entre la couleur, la teneur en composés phénoliques et l'activité

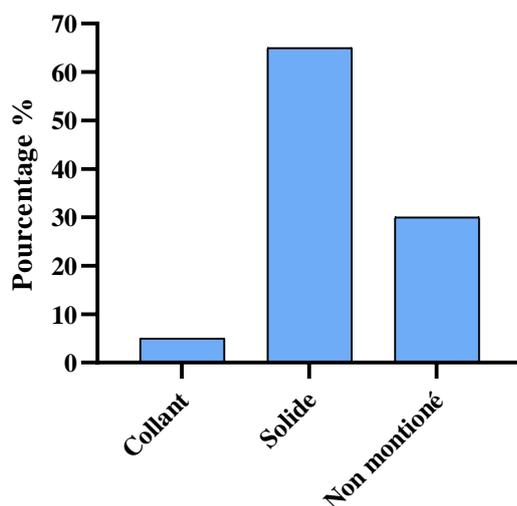
antioxydante de la propolis. Plus la propolis tend vers le jaune et les couleurs pâles, plus le contenu phénolique et l'activité antioxydante sont faibles.

Différents types de propolis sont disponibles dans le monde entier, les plus étudiés sont la propolis verte brésilienne dérivée de *Baccharis dracunculifolia*, la propolis brésilienne rouge issue de *Dalbergia ecastophyllum*, la propolis européenne brune issue principalement de *Populus nigra L.* et la propolis rouge cubaine et vénézuélienne qui provient de *Clusia spp.* (Moise et Bobiş, 2020).

#### 4.2.9 Aspect des échantillons de propolis testés

Les résultats d'analyse des articles sélectionnés, ont révélé que 65% des échantillons utilisés avaient une consistance rigide (Figure 18). Alors que 5% des études ont travaillé avec une propolis collante. La propolis est une matière qui possède généralement une texture semi-solide ou résineuse. Le changement de l'état de cette colle est influencé par les conditions de récolte comme la température.

La propolis est plus ou moins solide à température ambiante, cependant sa récupération est difficile, c'est pour cette raison que les apiculteurs préfèrent de mettre les grilles retirées au congélateur pour durcir la propolis et faciliter son détachement (Krell et Nations, 1996). La texture de la propolis est également influencée par la quantité de la cire d'abeille introduite, qui augmente sa viscosité. Généralement la propolis contient 30% de cire (Ali *et al.*, 2012).



Aspect des échantillons de propolis

**Figure 18.** Diagramme en bâtons représentatif de l'aspect des échantillons de propolis testés

### 4.3 Extraction et traitement des extraits de propolis

#### 4.3.1 Préparation des échantillons de propolis avant extraction

Toutes les étapes qui précèdent ou suivent l'extraction doivent être maîtriser afin d'obtenir un produit final de qualité optimale. Le choix de tous traitement pré-extraction dépend de l'objectif d'étude, de l'aspect et la texture d'échantillon et de la sensibilité des molécules d'intérêt. Les différents procédés de préparation des échantillons comme le broyage, le séchage, les conditions de stockage... ont un effet significatif sur les constituants phytochimiques (Azwanida, 2015).

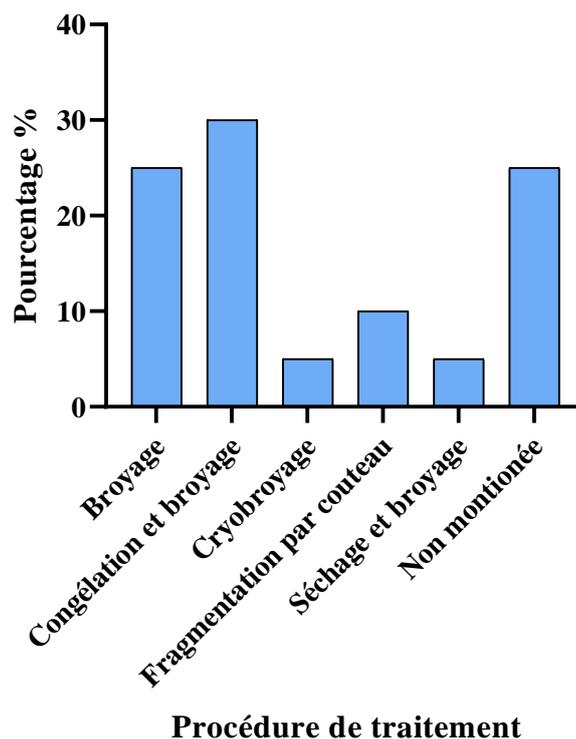
L'analyse des articles sélectionnés a montré que 75% des échantillons de propolis n'ont pas été directement extrait après leur récolte. Le croisement entre l'aspect de propolis et la réalisation d'un traitement avant extraction (Tableau 14) a montré que la consistance collante et parfois semi-solide de ce produit rend nécessaire le passage par des étapes de transformation afin de faciliter son extraction.

**Tableau 14.** Croisement entre l'aspect de propolis et la réalisation d'un traitement avant l'extraction.

		Aspect physique de l'échantillon			Total
		Solide	Collant	Non identifié	
Réalisation d'un traitement avant l'extraction	Oui	12	1	2	15
	Non	1	0	4	5
Total		13	1	6	20

Avant l'extraction, la propolis est généralement maintenue au congélateur ou à température ambiante, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur (Boisard, 2014; Bouaroura, 2020).

Selon les études incluses dans ce travail, 75% (Figure 19) des chercheurs ont effectué le broyage de propolis, dont le but est de réduire la taille d'échantillon pour augmenter la surface spécifique et faciliter la diffusion du solvant au sein de la matière solide. Trente pourcents des études ont congelé les échantillons de propolis avant d'effectuer un broyage. Selon Azwanida (2015), la congélation permet de durcir et fragiliser la propolis ce qui facilite son broyage et permet une meilleure conservation des biomolécules actives thermosensibles. D'autre part, 25% des études ont effectué un broyage classique de la propolis sans avoir la congelé, 10% ont la fragmenté à l'aide d'un couteau et 5% ont utilisé le cryobroyage sous nitrogène liquides (-196°C).



**Figure 19.** Diagramme en bâtons des procédures de préparation des échantillons.

La propolis est un réservoir de nombreuses substances actives. Pour obtenir une qualité optimale des constituants actifs de cette résine, il faut la conserver et la protéger tout au long de la chaîne de transformation. Les résultats d'Arruda et ses collaborateurs (2020), sur l'effet de la lumière, l'oxygène et la température sur la stabilité de l'artepillin C et l'acide paracoumarique isolés à partir de la propolis verte brésilienne, ont montré que les conditions de stockage influencent significativement le contenu en molécules bioactives. Après 30 jours d'exposition à la lumière et à une température élevée (40°C), environ 15 % du contenu en acide p-coumarique s'est dégradé. Après sept jours d'exposition à la lumière 22,5 % de la teneur en artepiline C a subi une dégradation et après 14, 21 et 30 jours, elle a atteint 52,9, 54,9 et 86,5 %, respectivement. De la même manière, la présence de lumière à 40°C a provoqué la dégradation de 98.1 % de l'artepillin C après 30 jours.

Il est important de signaler que le broyage peut entraîner dans certains cas une élévation de la température allant jusqu'à 60°C, ce qui peut provoquer l'altération des éléments thermolabiles. Le cryobroyage est une technique récente qui utilise le plus souvent de l'azote liquide, une molécule inerte chimiquement, afin de diminuer les risques d'échauffement et d'oxydation des particules généralement rencontrés avec le broyage classique. Il permet également une bonne homogénéisation de l'échantillon qui devient une poudre fine qui ne

s'agglomère pas avec un rendement élevé et une conservation des principes actifs surtout les molécules volatiles (Létard *et al.*, 2015).

### 4.3.2 Extraction de propolis

L'extraction est une procédure qui cible à séparer par solubilisation les éléments actifs d'un matériel végétal à l'aide de solvants sélectifs (Azwanida, 2015).

Le traitement des articles sélectionnés a montré que toutes les études (100%) ont réalisé l'extraction de propolis. La nature résineuse de ce produit à l'état brute rend nécessaire le passage par cette étape afin d'éliminer les cires et faciliter son analyse chimique (Bankova *et al.*, 2019).

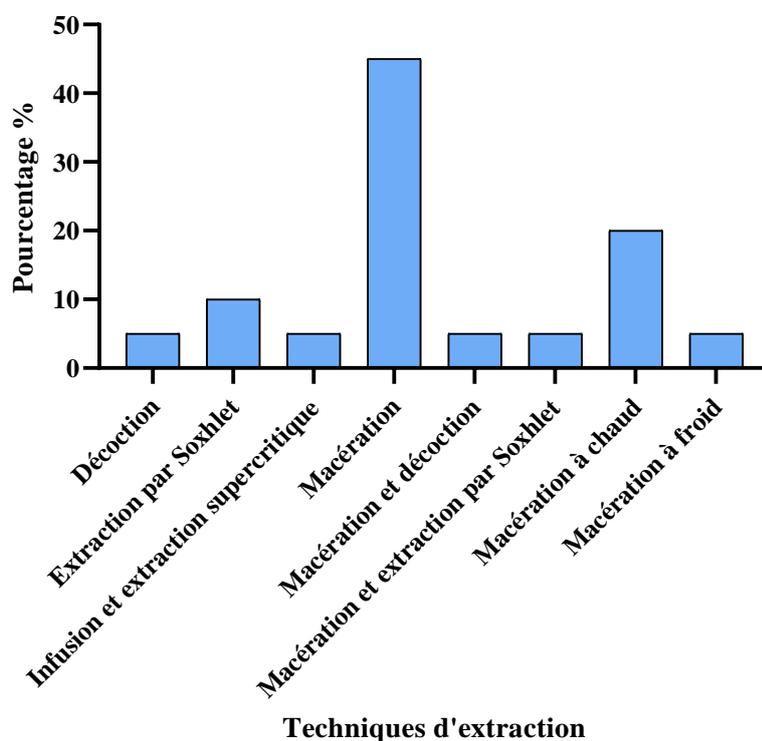
#### 4.3.2.1 Techniques d'extraction

Les résultats d'analyse des articles sélectionnés ont montré que 90% des chercheurs ont utilisé une seule technique d'extraction, alors que 10% des études ont utilisé deux techniques afin de comparer le contenu et l'activité antioxydante des extraits obtenus.

L'observation des études ciblées dans ce travail a montré l'emploi de plusieurs techniques d'extraction conventionnelles comme la macération et nouvelles comme l'extraction avec des fluides supercritiques. La figure 20 représente les techniques d'extraction utilisées par les articles sélectionnés. Selon les résultats illustrés dans cette figure, la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés bioactifs de la propolis est la macération (80%). En effet cette technique conventionnelle a été suggérée par plusieurs chercheurs comme une méthode plus applicable, pratique et moins coûteuse par rapport à d'autres techniques (Bankova *et al.*, 2021; Oroian, 2020; Vongsak *et al.*, 2013). Cependant, les déchets organiques posent l'un des problèmes rencontrés lors de l'emploi de cette technique car un grand volume de solvant est utilisé et une gestion adéquate des déchets est nécessaire (Azwanida, 2015). Vint pourcents des chercheurs qui ont utilisé cette technique ont la réalisé à chaud (70°C). Cette opération a l'avantage d'être plus rapide que la macération à température ambiante (25°C). La température 70°C a été avérée d'être la température optimale pour un temps d'extraction court et un rendement élevé de constituants actifs (Bankova *et al.*, 2021).

On a également remarqué l'emploi d'autres techniques comme l'extraction à chaud en continu par l'extracteur de Soxhlet (10%). Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport à la macération en terme d'utilisation de faible quantité et de la possibilité de recyclage du solvant, elle raccourci le temps d'extraction et augmente le rendement (Bankova *et al.*, 2021; Cunha *et al.*, 2004). Cependant, elle doit être utilisée avec prudence car l'exposition prolongée

de la propolis à des températures élevées pourrait être nocive pour ses composés thermolabiles et peut augmenter la solubilité des substances cireuses (Bankova *et al.*, 2021).



**Figure 20.** Diagramme en bâtons des techniques d'extraction employées.

Certains travaux sélectionnés ont utilisé l'extraction assistée par les ultrasons, également appelée la sonication en association à la macération. Elle est considérée comme un procédé vert qui utilise des protocoles permettant l'augmentation du rendement en réduisant l'impact lourd des déchets générés sur l'écosystème. Son efficacité a été prouvée dans l'extraction de différents composés antioxydants grâce au rendement élevé par rapport aux méthodes conventionnelles. Elle économise du temps et de l'énergie et fournit une bonne sélectivité des composés ciblés (Oroian, 2020). En effet, les cavitations générées par les ultrasons créent des conditions à forte densité d'énergie de pression et de température élevées ce qui permet l'augmentation de la surface de contact entre les solvants et les échantillons de propolis (Azwanida, 2015).

Dans les produits pharmacologiques commercialisés, la propolis est ajoutée sous forme d'extraits, qui sont souvent obtenus par extraction du produit broyé à l'aide d'un solvant organique ou dans l'eau. En raison des réglementations environnementales plus strictes, l'extraction par les fluides supercritiques a connu une forte croissance ces dernières années en tant qu'alternative aux procédés conventionnels d'extraction végétale (Galeotti *et al.*, 2018). C'est une biotechnique non polluante qui permet, des extractions sélectives sans dénaturation

des molécules thermosensibles grâce aux conditions de température modérées. Ainsi, le produit obtenu ne contient pas de résidus de solvant, ce qui représente un avantage réglementaire important.

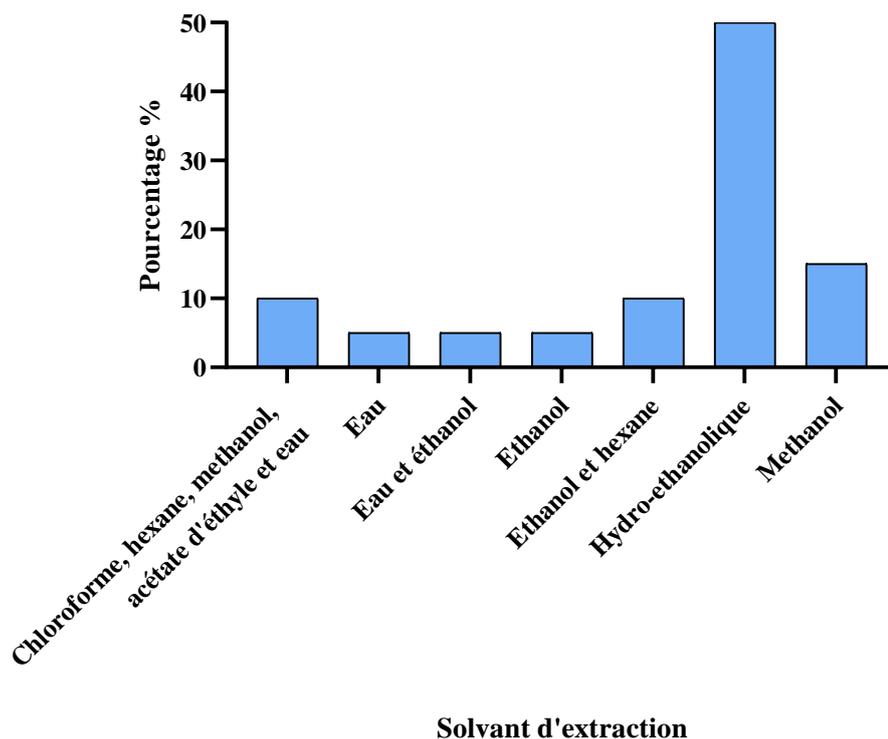
Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est le fluide supercritique le plus employé grâce à son avantage qui réside dans ses propriétés physico-chimiques (inodore, non-toxique et non inflammable). L'inconvénient majeur de cette méthode est le coût initial de l'équipement qui est très élevé (Naude *et al.*, 1998). De plus, le CO<sub>2</sub> possède une faible solubilité pour les composés polaires comme les phénols qui sont largement attribués au potentiel antioxydant de la propolis. Cependant, il peut être utilisé comme un excellent solvant extracteur de composés non polaires (Azwanida, 2015).

Dantas et ses collaborateurs (2017) ont évalué l'activité antioxydante de différents échantillons de propolis brésilienne issus de deux techniques d'extraction. Les résultats de leur étude ont montré que les extraits éthanoliques obtenus par macération avaient une activité antioxydante supérieure à celle des extraits supercritiques malgré l'addition de l'éthanol comme un co-solvant, ces résultats impliquent que la macération a permis d'obtenir de plus grandes quantités de polyphénols et de flavonoïdes et par conséquent, une capacité antioxydante plus élevée.

#### 4.3.2.2 Solvants d'extraction

L'analyse des articles sélectionnés a montré que l'éthanol (Figure 21) est le solvant d'extraction le plus utilisé (50%) en raison de sa polarité et non toxicité. De plus, il présente une grande efficacité qui a été prouvée sur l'extraction des polyphénols de la propolis (Oroian *et al.*, 2020).

L'un des facteurs qui affecte le rendement et la composition des extraits éthanoliques et hydro-éthanoliques de la propolis est la concentration d'éthanol utilisée (Sawaya *et al.*, 2011). Ce solvant est utilisé à différents pourcentages. Nos résultats ont montré que les solvants hydro-éthanoliques (éthanol à 70 et 80%) sont les plus employés (33,3%). L'influence de pourcentage d'éthanol sur l'extraction a été étudiée par plusieurs chercheurs, la concentration optimale d'éthanol est comprise entre 70 à 95%, le plus souvent de 70 à 80% (Bankova *et al.*, 2021). Les résultats de l'étude de Cunha et ses collaborateurs (2004), sur l'influence de plusieurs facteurs sur le rendement et la teneur de propolis en composés phénoliques, ont indiqué que le rendement le plus élevé des extraits de propolis a été obtenu par macération, en utilisant de l'éthanol à 70% ou plus comme solvant.



**Figure 21.** Diagramme en bâton des solvants d'extraction utilisés.

D'autres solvants ont été utilisés dans l'extraction comme l'eau (5%), la propolis est peu soluble dans ce solvant, par contre elle est partiellement soluble dans l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, ...etc. Un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Krell, 1996).

Les extraits hydro-éthanoliques de propolis sont les plus étudiés dans la recherche sur la propolis (Mello *et al.*, 2010; Segueni *et al.*, 2017). L'addition d'éthanol dans les milieux d'extraction aqueux augmente la solubilité de certains composés phénoliques, tandis que l'eau facilite le mouillage de la matrice solide (Jovanović *et al.*, 2021). Selon Mello et ses collaborateurs (2010), l'utilisation des solvants hydro-éthanoliques est plus efficace pour extraire les composés phénoliques et fournit des extraits avec une activité antioxydante plus élevée que les extraits aqueux.

Cependant, les extraits aqueux de propolis et leurs principaux constituants y compris les acides caféoylquiniques ont également démontré des effets antioxydants importants. Les constituants des extraits aqueux de propolis sont principalement regroupés en deux classes, à savoir les dérivés de l'acide caféoylquinique et les dérivés de l'acide cinnamique. Les deux classes ont démontré qu'elles exerçaient une variété d'actions biologiques, telles que des propriétés antimicrobiennes, antitumorales, antioxydantes, inductrices d'apoptose et immunomodulatrices (Moura *et al.*, 2011).

Ces résultats contradictoires impliquent que le choix de solvant d'extraction peut affecter la composition phénolique et les propriétés antioxydantes de l'extrait de propolis (Sun *et al.*, 2015).

A travers cette analyse, nous avons également observé un faible usage des solvants apolaires, sachant que la propolis est un produit riche en composés aromatiques de nature apolaire comme les huiles essentielles qui sont douées d'un fort pouvoir antioxydant. Ghisalberti (1979), a insisté dans son étude sur l'exploration des fractions apolaires de propolis, du fait que les composés isolés à partir des fractions solubles dans les solvants polaires ne représentent qu'une faible proportion de la composition totale de la propolis. La grande partie de la propolis qui n'est pas facilement soluble dans l'eau ou les solvants organiques polaires est susceptible d'être constituée de composés hautement bioactifs.

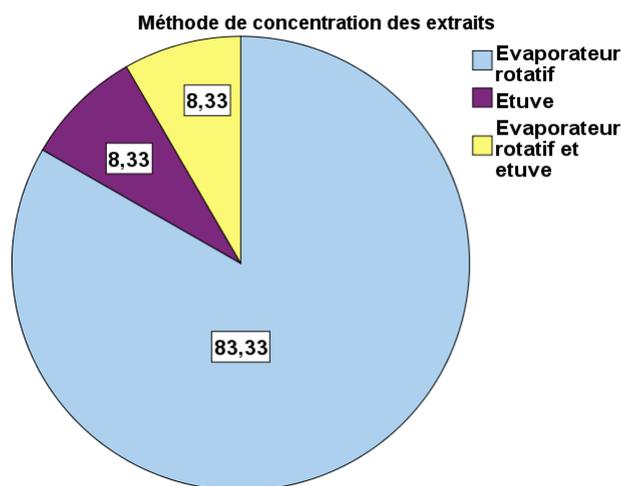
L'analyse des données collectées à partir des articles sélectionnés par le test de Khi-deux a montré la dépendance statistique entre le type du solvant et la technique d'extraction utilisée du fait que le degré de signification ( $\text{sig} = 0.003$ ) est inférieur au seuil de risque ( $\alpha = 0.05$ ). L'observation de la répartition des solvants en fonction de la technique d'extraction à l'aide d'un croisement sur SPSS, nous a permis de confirmer la présence de cette relation. On a remarqué que les solvants hydro-éthanoliques (éthanol 60, 70 et 80%) sont les plus utilisés pour réaliser la macération, l'eau est réservée pour la décoction, tandis que l'extraction par Soxhlet est souvent réalisée par des solvants de polarité croissante. Ce croisement nous a permis d'observer l'absence de l'utilisation des additifs d'extraction qui facilitent la solubilisation des matières cireuses.

### 4.3.3 Concentration et séchage des extraits

Les résultats d'analyse des articles sélectionnés ont montré que 60% des chercheurs ont effectué la concentration des extraits après l'extraction. C'est une étape qui permet l'élimination totale ou partielle du solvant d'extraction afin d'obtenir des extraits chargés et concentrés en molécules bioactives. Cette étape est également importante pour la conservation, la stabilisation et la préparation des extraits aux analyses chimiques (Broeckx *et al.*, 2016).

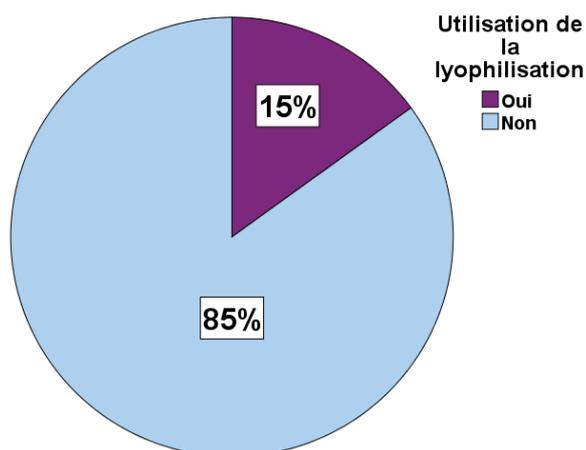
L'introduction de la propolis dans les préparations alimentaires et pharmacologiques destinées aux consommateurs nécessite également la réduction et l'élimination des solvants d'extraction, en particulier les solvants organiques, comme l'éthanol qui est largement utilisé pour l'extraction de propolis. Ce solvant présente certains inconvénients tels que sa forte saveur résiduelle et l'intolérance à l'alcool chez certaines personnes (Konishi *et al.*, 2004; Mello *et al.*, 2010).

Selon les articles ciblés dans cette étude, la concentration (Figure 22) est généralement réalisée par deux méthodes : soit à l'aide d'un évaporateur rotatif (83,33), soit à l'étuve (8,33). L'évaporateur rotatif est le plus utilisé car la force produite par la rotation supprime le point d'ébullition d'échantillon ce qui permet l'évaporation rapide d'un solvant à une température relativement basse et diminue le risque de perdre les composés bioactifs thermolabiles (Craig *et al.*, 1950).



**Figure 22.** Diagramme circulaire des méthodes de concentration utilisées.

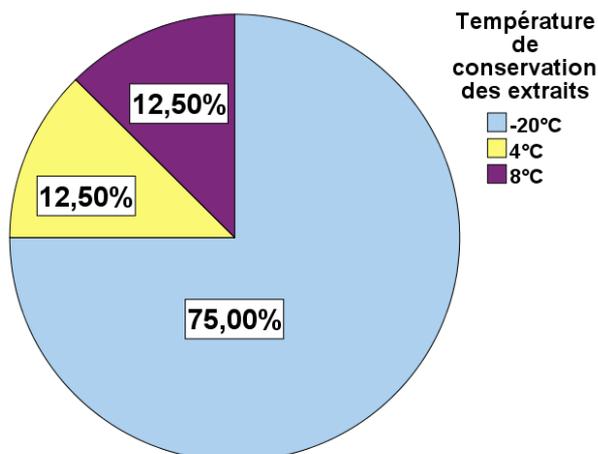
On a également remarqué que 15% des travaux sélectionnés ont employé la lyophilisation comme procédure complémentaire après passage au rotavapeur pour éliminer les résidus de solvants (Figure 23). Elle permet le séchage proprement dit des extraits de propolis. Cette technique présente plusieurs avantages comme : l'élimination du solvant sans chauffage excessif, opération stérile ce qui minimise le risque de contamination, la possibilité de conserver l'échantillon a longue durée, elle permet aussi de conserver la plupart des composés phytochimiques et donne un niveau plus élevé de teneur en phénols par rapport aux autres techniques. Cependant, la lyophilisation est une méthode de séchage complexe et coûteuse, son utilisation reste limitée à certains matériaux biologiques délicats et thermosensibles (Azwanida, 2015; Jadhav et Moon, 2015), ce qui explique son utilisation restreinte par rapport aux autres méthodes.



**Figure 23.** Diagramme circulaire du pourcentage d'utilisation de la lyophilisation.

#### 4.3.4 Conservation des extraits

L'examen des articles sélectionnés a montré que 40% des études ont réalisé la conservation des extraits avant d'évaluer l'activité antioxydante. Généralement après la concentration des extraits ou l'obtention du lyophilisat, ces derniers sont conservés à basse température (Figure 24) 4°C, 8°C, le plus souvent à -20 °C (75%), à l'abri de la lumière.



**Figure 24.** Diagramme circulaire des températures de conservation des extraits.

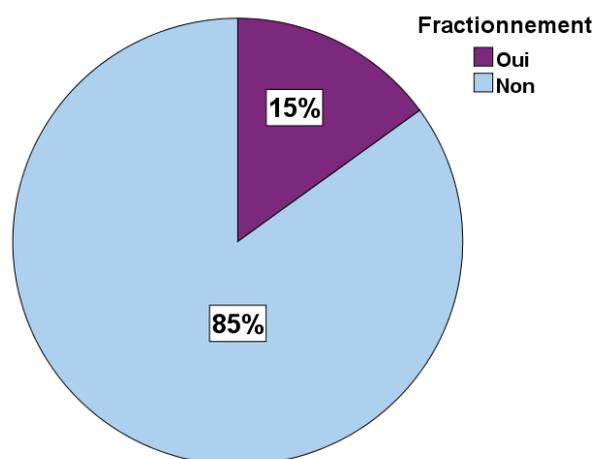
#### 4.3.5 Fractionnement des extraits

Le procédé général de caractérisation de nouveaux principes bioactifs issus de matrices complexes comme la propolis, se compose de trois étapes principales, qui sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, le tout guidé par des analyses phytochimiques et des tests biologiques (Hostettmann et Wolfender, 2000).

Le fractionnement est une étape visant à réduire la complexité des extraits bruts par séparation des molécules actives en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, ce qui

facilite l'étape d'identification. L'examen des articles ciblés dans ce travail nous a montré que 85% des études ont ciblé l'investigation des profils chimiques de propolis et ses propriétés antioxydantes dans les extraits bruts, alors que seulement 15% (Figure 25) des études ont été intéressées par l'exploitation des fractions isolées.

On a remarqué que les chercheurs qui ont réalisé l'étape de fractionnement se contentaient d'un simple fractionnement par des solvants de gradient de polarité croissante comme le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le n-butanol (Yang *et al.*, 2011), l'hexane et l'eau (Bonamigo *et al.*, 2017; Bonamigo *et al.*, 2017) dont le but est d'isoler des principes actifs de polarité variable.



**Figure 25.** Diagramme circulaire du pourcentage de réalisation du fractionnement.

#### 4.4 Techniques d'analyse et de caractérisation

##### 4.4.1 Analyse spectrophotométrique des extraits de propolis

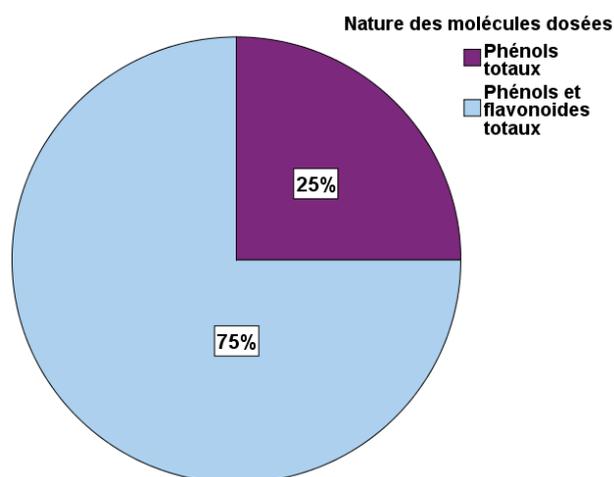
Les résultats prometteurs des recherches scientifiques sur la propolis ont créé un environnement de confiance pour les produits de la ruche. L'utilisation croissante des préparations à base de propolis dans le domaine médical nécessite le développement de techniques d'analyses pertinentes permettant la détermination quantitative des constituants bioactifs.

Les dosages spectrophotométriques connus pour leur simplicité et rapidité à mettre en œuvre, sont spécialement adaptés pour le contrôle de routine de la propolis. De plus, ils offrent une bonne répétabilité et présentent une précision acceptable. Ils concernent les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux et dans certaines études les deux classes de flavonoïdes suivantes : les flavones/ flavonols et les flavanones/ dihydroflavonols (Popova *et al.*, 2004).

#### 4.4.1.1 Classe des molécules dosées

L'analyse des études sélectionnées a montré que 80% des articles ont effectué le dosage des classes chimiques des constituants de propolis. Alors que 20% des articles se contentaient de l'étude de l'activité antioxydante de propolis sans établir le lien avec sa composition chimique. Les résultats d'analyse obtenus montrent que le dosage moléculaire, en particulier celui des composés phénoliques, est une pratique commune qui précède tout travail d'identification moléculaire et qui oriente chaque étude vers la quantification et l'estimation de la richesse des extraits de propolis en ces composés actifs connus pour leur potentiel antioxydant.

On peut clairement voir la tendance des chercheurs vers la valorisation de cette classe chimique, malgré la richesse de propolis en d'autres composés doués d'activité antioxydante. Ceci est peut-être associé à l'influence des recherches scientifiques dans le domaine de phytothérapie qui attribuent généralement les propriétés antioxydantes des végétaux à leur teneur en flavonoïdes. Dans le présent travail, 12 études ont réalisé à la fois la quantification des phénols et des flavonoïdes totaux en raison d'être l'un des principaux constituants pharmacologiquement actifs de la propolis alors que 4 études ont établi le dosage des phénols totaux seulement (Figure 26).



**Figure 26.** Diagramme en bâtons représentant la classe des molécules dosées.

Bien que la propolis soit un mélange complexe qui contient une variété de composés chimiques, ses activités biologiques sont rapportées en raison de la présence des composés phénoliques en fortes concentrations, considérés comme une empreinte pour chaque type de propolis et un élément clé pour évaluer sa qualité. C'est pour cette raison que la teneur des extraits en ces composés est devenue un des éléments analytiques qui guident les chercheurs

dans la conduite d'un bon contrôle de la propolis afin de faire le lien entre sa composition chimique et son effet thérapeutique.

Certains paramètres chimiques, tels que le dosage des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes, fournissent des données précieuses pour la caractérisation générale des échantillons de propolis vu que les substances phénoliques totales varient largement entre les types de propolis et même entre des échantillons d'un même type (Righi *et al.*, 2011). Il était donc raisonnable de déterminer leur quantité totale dans les extraits de plantes ou de propolis sélectionnés afin d'avoir une idée sur l'activité antioxydante totale de l'échantillon en question.

Selon Popova et ses collaborateurs (2004), l'approche la plus correcte et efficace pour la caractérisation et la standardisation des préparations de propolis nécessite une quantification globale des classes de composés actifs en groupes ayant une structure chimique identique ou proche. Elle fournit ainsi plus d'informations que la quantification individuelle de composés et corrélait mieux avec les activités pharmacologiques observées.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils partagent la même structure générale composée d'un noyau hydroxyle aromatique et existent au nombre approximatif de 8000 dans la nature. Ils présentent une large gamme de structures et sont responsables des principales caractéristiques organoleptiques des aliments et boissons d'origine végétale, notamment la couleur et le goût (Tapas *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, les composés phénoliques des plantes constituent l'un des principaux groupes de métabolites agissant comme des antioxydants primaires impliqués dans le piégeage des radicaux libres. L'intérêt récent pour ces composés provient de leur rôle protecteur potentiel, par l'ingestion de fruits et légumes, contre les maladies liées au stress oxydatif (maladies coronariennes, accidents vasculaires cérébraux et cancers) (Gülçin *et al.*, 2010).

La classe phénolique la plus divers et la plus ubiquitaire est représentée par les flavonoïdes, avec plus de 5000 composés (Spulber *et al.*, 2017). Les flavonoïdes sont des pigments végétaux synthétisés à partir de la phénylalanine qui sont à l'origine des couleurs merveilleuses connues des pétales de fleurs, émettent surtout une fluorescence brillante lorsqu'ils sont excités par les rayonnements ultraviolets (UV) et sont omniprésents dans les végétaux (Havsteen, 2002). Ces produits naturels sont désormais considérés comme des composants indispensables dans une variété d'applications nutraceutiques, pharmaceutiques, médicinales et cosmétiques grâce à leurs diverses propriétés thérapeutiques antioxydantes, anti-inflammatoires, antimutagènes et anticancérigènes, ainsi que leur capacité à moduler les fonctions enzymatiques cellulaires clés (Panche *et al.*, 2016).

#### 4.4.1.2 Méthode de dosage des phénols et flavonoïdes totaux

D'après l'analyse des études ciblées, la méthode la plus utilisée pour la détermination du taux des phénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu avec un pourcentage de 100%. Alors que 83.3% des études ont opté pour la méthode du chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) pour le dosage des flavonoïdes totaux et 16.7% des travaux avec un effectif de deux études seulement, ont préféré d'utiliser la méthode du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNP) comme technique complémentaire avec le  $\text{AlCl}_3$  (Tableau 15).

**Tableau 15.** Quelques caractéristiques statistiques des techniques de dosage des phénols et flavonoïdes totaux.

Description des techniques	Technique de dosage	
	Folin-Ciocalteu	Chlorure d'aluminium
Fréquence d'utilisation	16	10
Pourcentage d'utilisation	100%	83.3%
Nombre de standard	1	1
Le standard le plus utilisé	Acide gallique	Quercétine

Un certain nombre de méthodes spectrophotométriques ont été mises au point pour la quantification des composés phénoliques des végétaux. Ces essais sont basés sur des principes différents et sont utilisés pour déterminer les différents groupes structurels présents dans les composés phénoliques. Jusqu'à présent l'essai de Folin-Ciocalteu est largement utilisé par les chercheurs pour déterminer le taux des phénols totaux, non seulement pour les échantillons de propolis mais il couvre l'analyse d'un large éventail de matériel biologique du règne végétal, particulièrement pour sa simplicité, sa sensibilité et son faible cout. En plus, il fournit des informations qualitatives et quantitatives très utiles malgré son inconvénient qui réside dans le fait que la majorité des tests spectrophotométriques ne donnent qu'une estimation des composés phénoliques totaux, ne sont pas utilisés pour la séparation et ne donnent pas de mesure quantitative des composés individuels, ce qui nécessite le passage par d'autres techniques d'analyse chimique (Ignat *et al.*, 2011).

D'autre part, cette technique n'est pas strictement spécifique des polyphénols. En effet, le réactif de Folin-Ciocalteu évalue la capacité réductrice totale de l'échantillon, et pas seulement celle des polyphénols. Il peut réagir également avec des protéines et composés aminés, des sucres réducteurs ou encore l'acide ascorbique. Il est donc essentiel de savoir globalement quelles sont les classes de molécules présentes dans l'échantillon à analyser pour une bonne estimation des phénols totaux par cette méthode (Singleton *et al.*, 1999).

Brièvement, le principe de la méthode de Folin-Ciocalteu repose sur l'oxydation de l'ensemble des composés phénoliques contenu dans l'échantillon à tester par le réactif de Folin. Ce dernier est constitué par un mélange d'acides (phosphotungstique et phosphomolybdique) qui sont réduits en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène dans le cas de présence de composés phénoliques. La coloration bleue produite est proportionnelle à la concentration de phénols et possède une absorption aux environs de 765 nm (Ojeil *et al.*, 2010; Singleton et Rossi, 1965; Waterhouse, 2002).

Selon notre analyse la droite d'étalonnage est généralement réalisée avec un standard comme l'acide gallique car il est rapidement oxydé en milieu basique (Gülçin *et al.*, 2010 ; Moreira *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2011). Mais peut également l'être avec la galangine (Isla *et al.*, 2009b), l'acide caféique (Sulaiman *et al.*, 2011) et l'acide para-coumarique (Righi *et al.*, 2011).

La teneur en flavonoïdes est considérée comme un indice important pour évaluer la qualité de la propolis et les méthodes colorimétriques ciblant cette classe chimique de structure similaire sont pratiques et appropriées pour les analyses de routine (Chang *et al.*, 2002). Selon les travaux analysés dans notre travail systématique, la méthode la plus utilisée pour le dosage des flavonoïdes totaux est celle du  $\text{AlCl}_3$  en raison de sa simplicité car elle peut être effectuée dans des laboratoires ne disposant pas d'instruments sophistiqués. De plus, cette méthode est rapide, peu chère et ne requière pas l'utilisation de nombreux standards analytiques.

Woisky et Salatino (1998), décrivaient le principe de la méthode colorimétrique au  $\text{AlCl}_3$ , qui repose sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes chromogènes de couleur jaune avec le  $\text{AlCl}_3$  en mesurant l'absorbance à 420 nm, généralement en utilisant la quercétine comme standard.

Cependant, les flavonoïdes ne réagissant pas de la même façon avec l' $\text{AlCl}_3$ , cette méthode semble peu adaptée à l'évaluation du taux de flavonoïdes totaux. Seuls les flavones et les flavonols forment des complexes stables avec le chlorure d'aluminium, tandis que les flavanones et les flavanonols réagissent mieux avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine et pour cette raison, il est suggéré que ces deux analyses complémentaires soient effectuées ensemble afin que la somme des résultats représente mieux la teneur réelle en flavonoïdes totaux (Chang *et al.*, 2002).

Les taux des phénols quantifiés par les articles sélectionnés dans ce travail systématique ont été collectés et synthétisés dans le tableau 16.

**Tableau 16.** Taux des phénols quantifiés par les articles sélectionnés.

Taux des phénols totaux	Références
329 - 151 mg EAG/g	(Moreira <i>et al.</i> , 2008)
2,5 - 40 µg EG/g	(Isla <i>et al.</i> , 2009b)
124,3 µg EAG/g	(Gülçin <i>et al.</i> , 2010)
174.7 - 235.6 µg EAG/mg	(Yang <i>et al.</i> , 2011)
416.31 mg EAPC/g	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
700 - 9333 µg EAC/g	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2011)
17.17 - 18.27 mg EAG/g	(Khacha-ananda <i>et al.</i> , 2013)
211 mg EAG/100g	(Campos <i>et al.</i> , 2014)
238.6 - 292.1 mg EAG/g	(Boisard <i>et al.</i> , 2014)
11.49 - 20.84 g EAG/100g	(Nina <i>et al.</i> , 2015)
0.02 - 10 mg EAG/ml	(Veiga <i>et al.</i> , 2017)
55.74 - 91.32 mg EAG/g	(Andrade <i>et al.</i> , 2017)
15.93 mg EAG/g	(Ahmed <i>et al.</i> , 2017)
170.24 - 333.83 mg EAG/g	(Duca <i>et al.</i> , 2019)
2748.6 - 19969.9 mg EAG/100g	(Ozidal <i>et al.</i> , 2019)
210.33 - 321 mg EAG/g	(Ibrahim et Alqurashi, 2022)

EAG : Equivalent en acide gallique; EG : Equivalent en galangine; EAPC : Equivalent en acide paracoumarique; EAC : Equivalent en acide caféique.

#### 4.4.2 Analyse chromatographique des extraits de propolis

L'analyse chimique des composants individuels de la propolis est souvent une procédure fastidieuse, longue et coûteuse à cause de la complexité de sa composition chimique, mais elle est considérée comme étape importante et cruciale dans la détermination des agents biologiques responsables de son effet pharmacologique. Elle est également utilisée comme un moyen d'investigation de la source végétale de propolis qui représente jusqu'à présent un obstacle dans ce domaine qui est toujours à la recherche d'une standardisation afin de lier chaque type de propolis avec son origine botanique et ses propres composants chimiques caractéristiques.

Les résultats obtenus après l'analyse des articles sélectionnés, ont montré que 16/20 travaux (80%) ont réalisé l'analyse chimique des extraits, alors que 4/20 (20%) études n'ont pas exploré le profil chimique des éléments individuels de leur extraits et ont juste quantifier les phénols et les flavonoïdes totaux.

Le test de  $\chi^2$  (Tableau 17) a montré que l'identification chimique des composés bioactifs de la propolis par les techniques chromatographiques est statistiquement dépendante des objectifs ciblés par les chercheurs ( $\text{sig} = 0.002 < \alpha = 0.05$ ). Ces résultats impliquent que

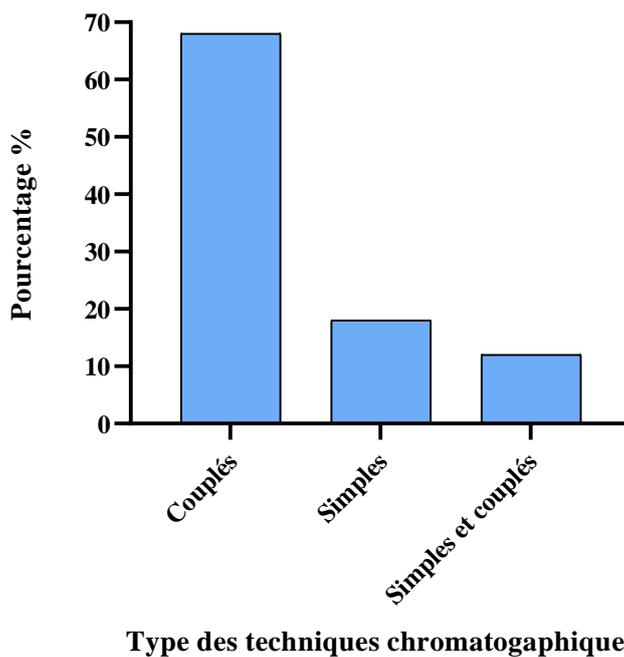
l'exploration du profil chimique de la propolis ne figure pas de manière régulière dans tous les travaux.

**Tableau 17.** Association de l'étape d'identification des composés chimiques de la propolis aux objectifs de la recherche.

Variables	Relation	Sig
Relations entre la réalisation d'identification chimique des composés bioactifs de propolis et les objectifs de recherche.	Dépendante	0.002

#### 4.4.2.1 Type des techniques chromatographiques

Plusieurs techniques chromatographiques sur colonne sont utilisées pour l'identification des composés contenus dans la propolis. Selon les résultats obtenus, 68.8% des études sélectionnées utilisaient des techniques couplées (Figure 27) qui lient à la fois entre des techniques séparatives et d'autres d'identification, le plus souvent à un spectromètre de masse mais également à un détecteur ultraviolet (UV) ou barrette de diodes (DAD).



**Figure 27.** Diagramme en bâtons représentant le pourcentage d'utilisation des techniques d'analyse chimique selon leur type.

Le but du couplage est d'améliorer l'analyse qualitative et quantitative des extraits de propolis, vu que la réalisation de la séparation et la quantification devient simultanée et sur le même échantillon ce qui permet une réduction des contaminants grâce au système fermé. D'autre part, il permet de réaliser une analyse plus rapide et plus précise avec un degré d'automatisation élevé et donc une meilleure reproductibilité. Les moyens couplés permettent

aussi de cibler l'efficacité des extraits de propolis par la prédiction des interactions entre les molécules bioactives *in silico*.

L'investigation portée sur le nombre des techniques d'analyse utilisées par les études sélectionnées a montré que 68.8% des composés séparés et identifiés ont été obtenu par l'emploi d'une seule technique analytique (Tableau 18) vu que la plupart des travaux sélectionnés sur la propolis sont récents et utilisaient des systèmes de couplage à divers types de détecteurs au lieu de réaliser l'isolement et l'identification de manière séparée. Mais ça n'empêche pas que certaines études utilisent plusieurs méthodes dont le but est de comparer l'efficacité de chacune individuellement, ou simplement en raison de manque d'appareillage convenable.

**Tableau 18.** Données statistiques sur le nombre des techniques analytiques employées dans les études sélectionnées.

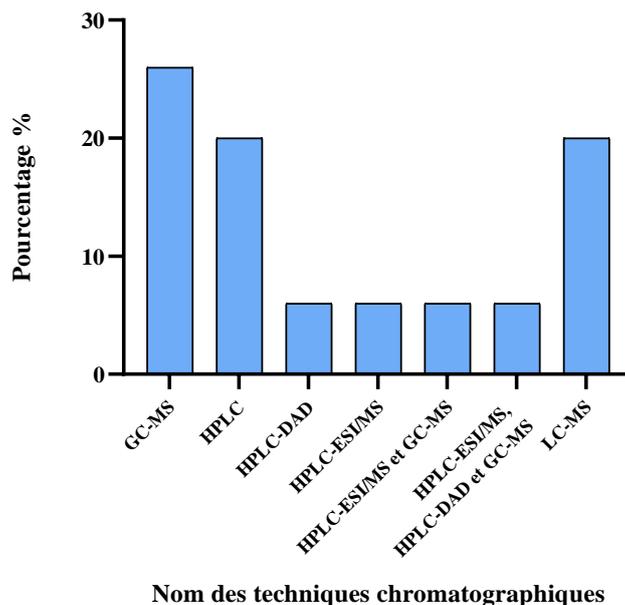
Nombre de techniques	Fréquence d'utilisation	Pourcentage d'utilisation
1	11	68.8%
2	4	25%
6	1	6.3%

#### 4.4.2.2 Techniques chromatographiques utilisées

L'analyse statistique des techniques analytiques les plus employées par les articles ciblés dans notre étude, a montré que la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CPG-MS) ainsi que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sont largement utilisées dans le processus d'identification (Figure 28).

Les extraits de propolis étant le plus souvent préparés par des solvants hydroalcooliques, la chromatographie en phase liquide à haute performance est devenue la méthode chromatographique la plus utilisée pour l'analyse des composés phénoliques dans la propolis en raison de sa grande précision qui permet la recherche des composés en traces et la possibilité de la coupler aux différents systèmes de détection assurant une analyse précise.

Dans un système HPLC, le détecteur est le composant chargé de transformer un attribut physique ou chimique en un signal mesurable correspondant à sa concentration ou à son identité. Au début, la détection était souvent effectuée en recueillant des fractions et en les analysant hors ligne mais avec le temps les systèmes de détection ont été introduit avec succès permettant la réduction du problème de sensibilité de cette technique.



**Figure 28.** Diagramme en bâtons représentatif du pourcentage d'utilisation des techniques analytiques employées dans les articles sélectionnés. High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Diode Array Detector (DAD), Electrospray Ionization (ESI), Mass Spectrometry (MS), Gas Chromatography (GC).

Les phénols et les flavonoïdes sont des composés qui émettent dans l'UV et sont donc facilement détectables avec un détecteur à barrettes de diodes afin d'obtenir leurs profils d'absorption. Ce détecteur est composé d'une rangée de diodes, chacune indique l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde. Les détecteurs UV sont généralement considérés spécifiques, ne réagissant qu'aux composés avec des chromophores, mais à de faibles longueurs d'onde UV (<210 nm), où presque tous les composés organiques absorbent, ils deviennent en quelque sorte universels (Swartz, 2010). En revanche, les terpènes ont une faible absorption et sont parfois indétectables, il faudra donc utiliser une autre méthode de détection, comme la spectrométrie (Sawaya *et al.*, 2011).

La recherche de méthodes d'identification plus rapides, capables de caractériser des échantillons de propolis de différentes régions géographiques et de compositions différentes, a conduit à l'utilisation de techniques d'empreintes digitales par spectrométrie de masse. L'HPLC couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par électro-nébulisation (ESI/MS) est devenu très utile dans ce domaine. Elle est considérée comme l'outil le plus efficace et le plus rapide pour l'étude détaillée des substances séparées et pour leur identification. En plus des analyses sélectives, il est possible d'appliquer la spectrométrie de masse à l'analyse structurale des composés phénoliques (Vacek *et al.*, 2008).

L'HPLC-ESI/MS a été employé dans de nombreuses études et a montré son efficacité qui a touché différents paramètres étudiés sur la propolis. Cette technique était de grande utilité dans la différenciation des composants des échantillons de propolis récoltée par *Apis mellifera* provenant de différentes régions géographiques du Brésil (Sawaya *et al.*, 2004). Elle a été également employée dans l'analyse de l'effet du temps de macération sur le rendement d'extraction, montrant que les échantillons avaient qualitativement la même composition chimique (da Silva Cunha *et al.*, 2006). Grâce à cette technique, une autre étude réalisée avec différents solvants d'extraction sur le même échantillon de propolis a permis de fournir une évidence de la similitude de la composition qualitative des composés recueillis par extraction à l'éthanol et à l'huile (Buriol *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, Swartz (2010) a proposé dans son étude qui a porté sur la technique HPLC, une liste de critères à considérer lors du choix du détecteur : haute sensibilité et réponse reproductible et prévisible ; répond à tous les solutés, ou possède une spécificité prévisible ; large gamme dynamique linéaire ; réponse qui augmente linéairement avec la quantité de soluté ; les résultats ne doivent pas être affectés par les changements de température et de débit de la phase mobile ; fiable et pratique à utiliser ; non destructif du soluté ; fournit des informations qualitatives et quantitatives sur le pic détecté ; résultat rapide.

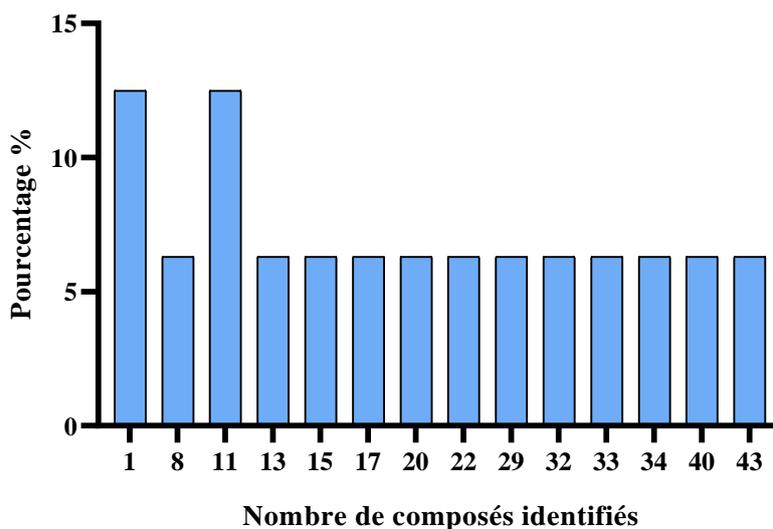
La chromatographie en phase gazeuse est une technique particulièrement adaptée à l'analyse des huiles essentielles ou composés volatils contenus dans la propolis. Elle offre une grande capacité de séparation, de la sensibilité et sélectivité élevées lorsqu'elle est associée à la spectrométrie de masse. Cependant, la préparation des échantillons pour la CPG est très difficile pour les composés qui ne peuvent être directement analysés par cette technique, notamment l'élimination des lipides de l'extrait, la libération des phénols des liaisons ester et glycosidiques et la dérivatisation des polyphénols peu volatils (Alvarez-Suarez *et al.*, 2009 ; Ignat *et al.*, 2011).

#### **4.5 Composition chimique de la propolis**

De nombreuses études phytochimiques ont été publiées sur la composition chimique de la propolis qui a attiré l'attention des scientifiques depuis la fin des années 60 (Bankova *et al.*, 2000), dont le but a été l'exploration de ses utilisations biologiques afin de l'incorporer dans les préparations pharmacologiques.

#### 4.5.1 Nombre des composés identifiés

D'après l'analyse des articles sélectionnés, le nombre des composés identifiés par les chercheurs a varié de 1 jusqu'à 43 composés (Figure 29). Cette variabilité peut être attribuée aux nombres d'instruments analytiques utilisés par les chercheurs dans chaque étude, en raison de différence de sensibilité de détection et d'identification qui est en relation étroite avec la nature des composés.



**Figure 29.** Diagramme en bâtons du pourcentage en fonction du nombre de composés identifiés.

Le solvant d'extraction est lui-même un facteur important qui influence à la fois le nombre et le type de composés obtenus. Dans ce contexte, Usman et ses collaborateurs (2016), ont effectué une analyse phytochimique comparative des composés isolés à partir de deux extraits (éthanolique et aqueux). Douze composés ont été identifiés dans l'extrait aqueux alors que l'extrait éthanolique a fourni un nombre plus élevé ( $n=25$ ).

D'autre part, certains travaux avaient pour but la détermination d'un composé bien précis. C'est le cas de la galangine identifiée de la propolis collectée de la région de San Juan en Argentine (Isla et al., 2009b) et l'artepilline C identifiée de la propolis verte brésilienne (Veiga et al., 2017). D'autres, ont travaillé sur des échantillons de propolis de différentes régions géographiques ce qui a permis d'identifier plusieurs composés actifs.

Ainsi la technique d'échantillonnage de propolis joue un rôle très important dans la détermination de la qualité des résultats. Dans une étude réalisée sur l'effet de deux techniques d'échantillonnage, Sales et ses collaborateurs (2006), ont conclu que l'utilisation des grilles

fournit des échantillons de propolis de bonne qualité et avec des contenus mineurs de contaminants que celle du raclage.

Dans le but de vérifier l'influence de quelques facteurs sur le nombre des composés chimiques identifiés dans les extraits de propolis, on a réalisé le test de corrélation de Pearson entre le nombre de composés isolés et le nombre de techniques d'analyse utilisées ainsi qu'avec le nombre des régions étudiées, l'année de publication et le nombre des chercheurs. Les résultats obtenus (Tableau 19) ont montré que le nombre des composés identifiés dépend du nombre des régions étudiées, nombre des techniques d'analyse chimiques, nombre d'échantillons et du nombre des extraits en raison de la corrélation positive entre ce critère et ces variables.

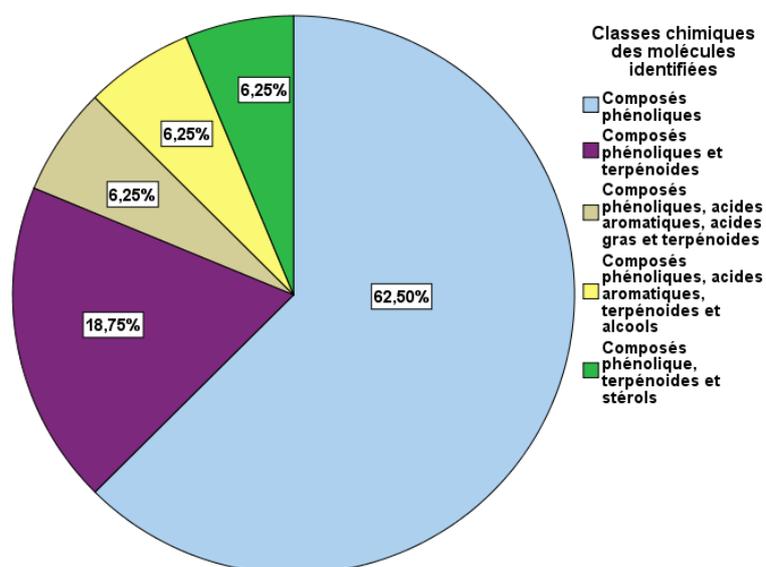
**Tableau 19.** Vérification des facteurs influençant le nombre des composés isolés.

<b>Variabes</b>	<b>Relation</b>	<b>Coefficient de corrélation</b>
<b>Influence</b> du nombre des techniques d'analyse <b>sur</b> le nombre de composés chimiques identifiés	Dépendance	0.153
<b>Influence</b> du nombre des régions étudiées <b>sur</b> le nombre de composés chimiques identifiés	Dépendance	0.555
<b>Influence</b> du nombre des chercheurs <b>sur</b> le nombre des composés chimiques identifiés	Indépendance	-0.198
<b>Influence</b> de l'année de publication <b>sur</b> le nombre des composés chimiques identifiés	Indépendance	-0.021
<b>Influence</b> du nombre d'échantillons <b>sur</b> le nombre des composés chimiques identifiés	Dépendance	0.172
<b>Influence</b> du nombre des techniques d'extraction <b>sur</b> le nombre des composés chimiques identifiés	Indépendance	-0.004
<b>Influence</b> de la concentration d'éthanol <b>sur</b> le nombre des composés chimiques identifiés	Indépendance	-0.142
<b>Influence</b> du nombre des extraits <b>sur</b> le nombre des composés chimiques identifiés	Dépendance	0.231

#### 4.5.2 Classes chimiques des composés identifiés

L'analyse statistique des données extraites à partir des articles ciblés, a montré que 65.5% des composés identifiés appartenaient à la classe des phénols en raison de l'utilisation des standards phénoliques, ce qui oriente vers la valorisation de cette classe. On a remarqué l'abondance des acides phénoliques et leurs esters (acide caféique, acide cinnamique, acide

férulique, l'ester phénéthylique de l'acide caféique (CAPE), ...etc.) et des flavonoïdes (la chrysin à l'origine de la couleur jaune de la propolis, la pinocembrine, la galangine, le kaempferol, le kaempféride, la pinobanksine, la lutéoline, la rutine ...etc). On a également observé la présence des composés terpéniques parmi les substances volatiles dont les diterpénoides de clérodane et les triterpénoides comme la  $\beta$ -amyrine, la  $\alpha$ -amyrine et le taraxastérol, qui sont considérées comme des marqueurs de propolis de qualité supérieure. Ainsi, les acides aromatiques comme l'acide benzoïque, et les stérols (le campestérol, le stigmastérol, le  $\beta$ -sitostérol). La figure 30 montre le pourcentage des classes chimiques des composés actifs isolés par le total des 20 études sélectionnés dans cette revue.



**Figure 30.** Diagramme circulaire des classes chimiques identifiées.

L'utilisation du test de khi-deux (Tableau 20) pour déduire la relation entre les classes chimiques identifiées et le solvant d'extraction, les techniques d'analyse utilisées et la technique d'extraction, nous a montré l'absence d'une dépendance statistique entre ces variables. En réalité, le choix du solvant et des outils de manipulation influence sur la classe chimique des composés identifiés, cependant, l'utilisation des mêmes solvants et des mêmes techniques d'extraction et d'identification par les chercheurs n'a pas permis de détecter la variabilité statistique.

**Tableau 20.** Effet de quelques facteurs sur les classes chimiques identifiées.

<b>Variables</b>	<b>Relation</b>	<b>Sig</b>
<b>Influence</b> du solvant d'extraction <b>sur</b> les classes chimiques identifiées	Indépendance	0.863
<b>Influence</b> de la technique d'extraction <b>sur</b> les classes chimiques identifiées	Indépendance	0.986
<b>Influence</b> des techniques d'analyse chimique <b>sur</b> les classes chimiques identifiées	Indépendance	0.628

#### 4.6 Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits de propolis

L'organisme possède son propre système de défense contre les espèces réactives de l'oxygène. Cependant, ce système n'est pas assez efficace pour assurer la réparation complète des dommages oxydatifs. D'où vient l'importance de la valorisation du potentiel antioxydant des produits naturels. Parmi ces produits, la propolis a suscité l'intérêt des chercheurs de l'industrie pharmaceutique en raison des résultats fascinants sur sa capacité puissante à protéger le corps contre les effets nocifs du stress oxydatif.

##### 4.6.1 Nombre des tests d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'analyse des articles sélectionnés dans ce travail, a montré la disponibilité de nombreux tests pour l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de la propolis. Les résultats statistiques ont également montré que 68.4% des recherches ciblées (Tableau 21) ont basé sur la comparaison des résultats de plusieurs méthodes analytiques (>1 test) pour déduire l'efficacité antioxydante des extraits testés. Cela est peut-être lié à la complexité du processus d'oxydation qui peut avoir différents mécanismes. Il n'existe pas un dosage unique qui permet de prendre une décision correcte et précise sur la capacité antioxydante totale, car chaque agent antioxydant réagit de manière spécifique à différentes sources de radicaux ou d'oxydants utilisés dans les techniques analytiques.

Bonamigo et ses collaborateurs (2017), ont utilisé deux techniques distinguées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de propolis (ExEP) provenant d'*Apis mellifera* (ExEP-A) et de *Plebeia droryana* (ExEP-P). Les deux extraits ont présenté une activité antioxydante significative contre le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), les activités maximales étant de 500 µg/mL (ExEP-P) et 300 µg/mL (ExEP-A). Cependant, seule l'ExEP-A a été capable d'inhiber la peroxydation lipidique induite par l'agent oxydant 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH).

**Tableau 21.** Quelques données statistiques sur le nombre de tests réalisé pour l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante.

Nombre de tests	Fréquence d'utilisation	Pourcentage d'utilisation %
1	6	31.6
2	7	36.7
3	4	21.1
4	1	5.3
9	1	5.3

L'observation du croisement entre le nombre d'activités biologiques étudiées et le nombre des tests réalisés *in vitro* par les études sélectionnées (Tableau 22), a montré la présence d'une dépendance entre ces deux variables. On a remarqué que les études qui exploitent plusieurs activités biologiques en association à l'activité antioxydante de la propolis (3 à 4 activité associées) tendent à utiliser deux à savoir un seul test *in vitro*, le plus souvent le test au DPPH, pour évaluer l'activité antioxydante. Alors que dans les études qui ont investigué l'activité antioxydante seule, le nombre des tests qui ont été employé a atteint jusqu'à neuf tests.

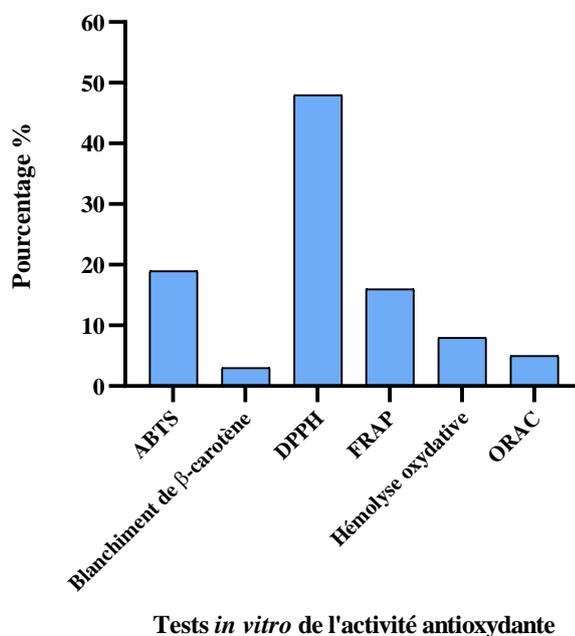
Ces observations impliquent que les chercheurs qui ciblent plusieurs activités biologiques de propolis, privilégient la quantité par rapport à la qualité des résultats publiés. L'emploi d'un seul test ne permet pas l'exploitation réelle et la validation du potentiel antioxydant de propolis, car même si l'étude de plusieurs activités de ce produit permet d'apprécier la polyvalence de ses vertus thérapeutiques, la négligence de l'importance du nombre des tests utilisés influence en revanche la qualité des décisions sur son potentiel antioxydant.

**Tableau 22.** Croisement entre le nombre de tests d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* et le nombre d'activités biologiques associées à cette activité.

		Nombre des tests <i>in vitro</i>					Total
		1	2	3	4	9	
Nombre d'activités biologiques associées	1	1	4	2	1	1	9
	2	4	2	2	0	0	8
	3	0	1	0	0	0	1
	4	1	0	0	0	0	1
Total		6	7	4	1	1	19

#### 4.6.2 Tests d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'analyse des tests *in vitro* utilisés par les études ciblées (Figure 31), a montré que la méthode de 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl (DPPH) est la plus employée (48.6%) pour l'évaluation de l'activité antioxydante de propolis avec un effectif de 18/20 études.



**Figure 31.** Diagramme en bâtons des méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de propolis. 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS); Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP); Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC).

Cette méthode est fréquemment utilisée en raison de sa rapidité et simplicité, car sa réalisation ne demande pas plusieurs étapes ou réactifs et a seulement besoin d'un spectrophotomètre ultraviolet-visible. Elle est peu coûteuse par rapport aux autres modèles d'essai (Alam *et al.*, 2013). Ainsi, elle permet d'effectuer l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Fukumoto et Mazza, 2000). Un autre avantage est la stabilité de la molécule de DPPH (Ahmad *et al.*, 2014).

Dans la deuxième place, on distingue le test de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), largement rencontré dans les études de l'activité antioxydante de la propolis. Contrairement au DPPH qui ne peut être dissous que dans les milieux alcooliques, l'ABTS peut être solubilisé dans les milieux aqueux et organiques de sorte que la capacité antioxydante peut être mesurée grâce à la nature des composés contenus dans les échantillons (Arnao, 2000).

L'essai de la capacité de réduction ferrique (FRAP) est simple, rapide, peu coûteux et robuste et ne nécessite pas d'équipement spécialisé. Il peut être réalisé par des méthodes automatisées, semi-automatiques ou manuelles (Prior *et al.*, 2005).

Le tableau 23 résume quelques caractéristiques des tests les plus employés selon notre analyse. Il est bien évident que le standard le plus employé par ces méthodes est le Trolox, qui est un dérivé hydrosoluble de la vitamine E. L'activité antioxydante de Trolox a été documentée dans plusieurs modèles expérimentaux. Le mécanisme de son effet a été attribué à sa forte capacité de piégeage des radicaux peroxy et à une synergie avec d'autres antioxydants, comme l'acide ascorbique (Davies *et al.*, 1988; Penn *et al.*, 1997). Il présente l'avantage d'être soluble à la fois dans l'eau ce qui permet la facilité d'atteindre les cibles et dans les lipides ce qui assure sa pénétration dans les membranes cellulaires (Zeng *et al.*, 1991).

**Tableau 23.** Caractéristiques des tests les plus employés dans l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par les articles sélectionnés.

Test	DPPH	FRAP	ABTS/TEAC
<b>Principe du test</b>	La décoloration du radical chromogène de couleur violette suite à sa réduction par les composés antioxydants donneurs d'atomes d'hydrogène en produit jaune pâle.	Le test FRAP est basé sur la capacité des antioxydants à réduire le complexe ferrique jaune de la tripyridyltriazine (Fe <sup>+3</sup> -TPTZ) en complexe ferreux bleu (Fe <sup>+2</sup> -TPTZ) par un transfert d'électrons.	Cette méthode mesure la perte de couleur lorsqu'un antioxydant est ajouté au chromophore bleu-vert ABTS + L'antioxydant réduit l'ABTS+ en ABTS et le décolore.
<b>Références</b>	(Karadag <i>et al.</i> , 2009)	(Benzie <i>et al.</i> , 1999)	(Seeram <i>et al.</i> , 2006)
<b>Fréquence d'utilisation</b>	18	6	7
<b>Solution de préparation</b>	Ethanol et méthanol	Tampon d'acétate et le sodium phosphate	Persulfate de potassium
<b>Longueur d'onde d'absorbance</b>	515-517 nm	593-700 nm	734 nm
<b>Nombre de standards</b>	9	6	6
<b>Standards les plus utilisés</b>	Trolox et acide ascorbique	Trolox	Trolox

Les différentes valeurs de l'activité antioxydante obtenus par le test au DPPH par les articles sélectionnés dans notre étude ont été synthétisées dans le tableau 24.

**Tableau 24.** Valeurs de l'activité antioxydante obtenus par le test au DPPH.

Valeur de DPPH	Mode d'évaluation	Références
0.006 - 0.052 mg/ml	IC <sub>50</sub>	(Moreira <i>et al.</i> , 2008)
25 - 30 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Isla <i>et al.</i> , 2009b)
31.81 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Gülçin <i>et al.</i> , 2010)
15 - 37.5 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Yang <i>et al.</i> , 2011)
30.62 %	Activité antioxydante %	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
20 - 63.3 %	Activité antioxydante %	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2011)
2,69 - 3.30 mg EAG/g	IC <sub>50</sub>	(Khacha-ananda <i>et al.</i> , 2013)
40 µg AA/ml	IC <sub>50</sub>	(Campos <i>et al.</i> , 2014)
1386 - 1964 µmol ET/g	Equivalent de Trolox	(Boisard <i>et al.</i> , 2014)
10.29 - 91.84 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Nina <i>et al.</i> , 2015)
49.8 - 182.4 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Bonamigo <i>et al.</i> , 2017)
60.91 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Bonamigo <i>et al.</i> , 2017)
13.09 - 95.86 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Veiga <i>et al.</i> , 2017)
86 - 90.7 %	Pourcentage d'inhibition	(Andrade <i>et al.</i> , 2017)
1.08 µg/ml	IC <sub>50</sub>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2017)
0.07 - 0.932 mg/ml	IC <sub>50</sub>	(Duca <i>et al.</i> , 2019)
798 - 6332.9 mg ET/100g	Activité antioxydante	(Ozdal <i>et al.</i> , 2019)
90.01 - 94.45 %	Activité antioxydante %	(Ibrahim et Alqurashi, 2022)

IC<sub>50</sub> : Concentration qui provoque 50% d'inhibitrice ; ET : Equivalent en Trolox.

L'observation du croisement entre les valeurs de IC<sub>50</sub> des extraits les plus actifs et la technique d'extraction utilisée nous a permis de confirmer la présence d'une dépendance entre ces deux critères. On peut clairement voir à travers le tableau 25 que les extraits de propolis doué d'un pouvoir antioxydant élevé sont obtenus par macération.

**Tableau 25.** Croisement entre technique d'extraction et IC<sub>50</sub> des extraits actifs obtenus par DPPH.

		Technique d'extraction					Total
		Macération	Extraction par Soxhlet	Décoction	Macération chaude	Macération et extraction par Soxhlet	
IC <sub>50</sub> des extraits actifs obtenus par le test au DPPH (µg/ml)	1.08	1	0	0	0	0	1
	6	1	0	0	0	0	1
	10.29	1	0	0	0	0	1
	13.09	0	0	0	0	1	1
	15	1	0	0	0	0	1
	25	0	1	0	0	0	1
	31.81	0	0	1	0	0	1
	40	0	0	0	1	0	1
	49.80	0	0	0	1	0	1
	60.91	0	0	0	1	0	1
70	1	0	0	0	0	1	
Total		5	1	1	3	1	11

### 4.6.3 Facteurs qui influencent l'activité antioxydante de propolis

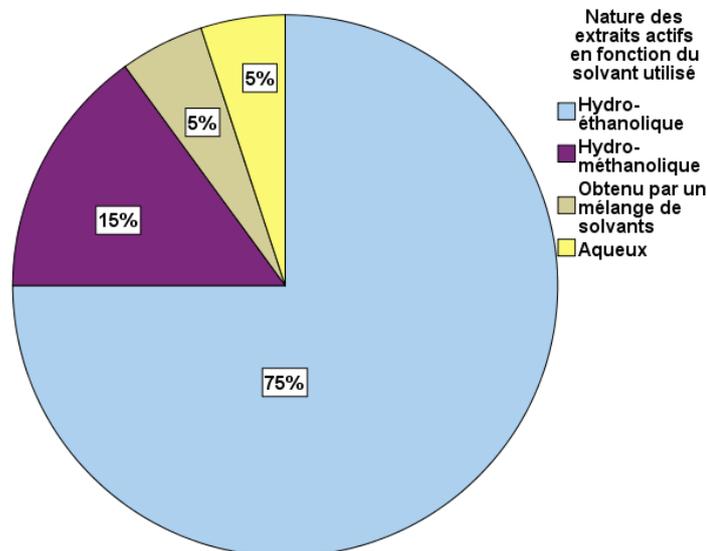
Dans le but d'investiguer l'efficacité des extraits de propolis utilisés dans les études sélectionnées, on a utilisé le test de DPPH comme modèle type pour analyser les extraits qui démontraient une activité antioxydante élevée en association avec les différents paramètres dont la région d'étude, l'espèce d'abeille, le solvant et la technique d'extraction et la saison de collecte. Le choix de ce test a été associé au manque d'homogénéité entre les méthodes employées dans les études sélectionnées dans lesquels le test au DPPH a été le plus utilisé.

#### 4.6.3.1 Influence du solvant d'extraction

Le pouvoir antioxydant est généralement lié au contenu phénolique et le pouvoir d'extraction du solvant est le facteur le plus important qui affecte la capacité antioxydante. La nature du solvant, la température et la durée d'extraction, ainsi que les caractéristiques chimiques des composants contenus dans les échantillons de propolis, influencent fortement la qualité antioxydante du produit final (Machado *et al.*, 2016).

Les résultats de cette analyse (Figure 32) ont montré que les extraits hydro-éthanoliques de propolis sont les plus actifs (75%) par rapport à d'autres extraits issus de solvants différents (eau, méthanol ou un mélange de solvants). Cela est dû à la polarité de l'éthanol qui est efficace pour la récupération des polyphénols.

Les composés phénoliques sont généralement plus hydrophiles que lipophiles en raison de leur nature phénolique. Par conséquent, les polyphénols libres peuvent être facilement extraits par des solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone, ou par leurs mélanges avec de l'eau (Brglez Mojzer *et al.*, 2016; Tsao, 2010).



**Figure 32.** Diagramme circulaire des extraits les plus actifs de propolis.

#### 4.6.3.2 Influence de la technique d'extraction

La technique d'extraction est un autre point déterminant de l'efficacité antioxydante des extraits de propolis. La macération et l'extraction par Soxhlet sont les techniques conventionnelles les plus utilisées pour extraire les principes actifs de la propolis. Cependant, l'extraction par Soxhlet s'est avérée diminuer considérablement la teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques malgré le temps réduit de l'extraction. Cette technique doit être utilisée avec prudence car l'exposition prolongée à de températures élevées pourrait être nuisible aux composés phénoliques ce qui provoque l'obtention de valeurs minimales du pouvoir antioxydant (Archaina *et al.*, 2015). Des rendements d'extraction élevés mais une faible teneur en phénols/flavonoïdes totaux et un pouvoir antioxydant réduit ont été rapportés pour la propolis d'abeilles sans dard de Malaisie (6 h d'extraction avec l'appareil de Soxhlet) (Zin *et al.*, 2018).

Notre analyse a montré que les extraits de propolis obtenus par sonication possédaient une activité antioxydante supérieure à ceux obtenus par macération simple. Dans ce contexte, Bayram *et al.* (2020), ont constaté que l'extraction assistée par ultrasons conduit à un pourcentage plus élevé de flavonoïdes dans l'extrait de propolis. Kacha-ananda et ses collaborateurs (2013), ont constaté que l'extrait de propolis provenant de la sonication a montré

une activité antioxydante plus élevée que celui de la technique de macération avec des valeurs d'activité antioxydante 2.69 mg EAG/g d'extrait et 3.30 mg EAG/g d'extrait respectivement.

#### **4.6.3.3 Influence des caractéristiques phytogéographiques**

La composition de la source végétale détermine la composition chimique de la colle d'abeille et dépend de sa localisation géographique et par conséquent, son activité biologique est étroitement liée à la végétation disponible dans le site de collecte (Bankova, 2009; Toreti *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, Nina et ses collaborateurs (2015), ont effectué l'analyse de l'activité antioxydante de 19 échantillons de propolis provenant de six localisations dans la région del Maule en Chili. Parmi ces régions, les échantillons de propolis les plus actifs étaient ceux provenant des pentes occidentales des Andes. Cette zone est caractérisée par la coexistence de la flore indigène, y compris l'espèce *Nothofagus antarctica*, les pins et l'eucalyptus. D'après ces résultats, ils ont conclu que la variabilité de l'activité antioxydante peut être attribuée à la composition des échantillons, qui est liée aux sources botaniques de la propolis.

#### **4.6.3.4 Influence des variations climatiques**

D'après l'analyse des études sélectionnées, on a constaté que les variations climatiques peuvent affecter les concentrations de certains composés phénoliques de la propolis et leurs relations avec son activité antioxydante. Les plantes peuvent être beaucoup plus complexes sur le plan métabolique en comparaison avec les indications des analyses chimiques. Il a été suggéré l'existence d'un "métabolisme silencieux" chez les plantes, dans lequel les enzymes peuvent être activées par le changement des facteurs environnementaux, ce qui permet à la plante de s'adapter à de nouvelles situations (Salatino *et al.*, 2011)

Kekeçoğlu *et al.* (2021) ont constaté que les capacités antioxydantes supérieures des échantillons de propolis observées au printemps ont été réduites en été, puis augmentées à nouveau en automne. Dans une autre étude réalisée par Isla et son équipe (2009), les échantillons collectés en novembre présentaient une grande capacité antioxydante en comparaison avec d'autres mois.

Il a été démontré que dans les saisons de pluie, quelques modifications dans l'habitat de la plante se produisent comme la disponibilité élevée d'eau, l'humidité relative élevée, l'incidence de pathogènes dans les plantes (fongique, bactéries) et l'attaque d'insecte en raison de la basse nourriture. Un mécanisme de régulation se produit qui assure la protection de la

plante contre les différents stress biotiques et abiotiques en favorisant l'augmentation de la concentration de flavonoïdes (do Nascimento *et al.*, 2019).

#### 4.6.3.5 Influence de l'espèce d'abeille

L'activité antioxydante de propolis est également influencé par l'espèce d'abeille. Les résultats obtenus par Bonamigo et ses collaborateurs (2017), ont montré que l'extrait éthanolique de *Melipona quadrifasciata* a donné une activité antioxydante plus élevée que celle de l'extrait éthanolique de *Scaptotrigona depilis*, ces différences ont été associées aux différentes concentrations de tocophérol dans les extraits. Dans une approche similaire par les mêmes chercheurs, l'extrait éthanolique d'*Apis mellifera* (ExEP-A) a présenté une activité antioxydante supérieure à celle de *Plebeia droryana* (ExEP-P). Ces résultats ont été liés à la composition chimique de la propolis, car l'ExEP-A présentait des quantités plus élevées d'acide cinnamique que l'ExEP-P.

Les différences de la capacité antioxydante observées en fonction de la race d'abeille sont particulièrement liées aux différences génétiques entre ces insectes ce qui conduit à une composition variable de propolis en raison de préférences distinctes pour la source végétale des résines collectées. En outre, l'adaptation des abeilles aux conditions climatiques et à la structure florale des régions où elles se sont répandues exerce un effet sur leurs structures morphologiques et physiologiques et peut donner lieu à des races et des écotypes différents. Ces adaptations peuvent également affecter la taille des glandes et les sécrétions, ainsi que la composition et l'activité de la propolis qui est mélangée aux sécrétions des abeilles (Kekeçoğlu *et al.*, 2021).

Une autre cause possible de la variabilité de la composition de la propolis est la réduction de la disponibilité des principales sources végétales de résine, de sorte que les abeilles commencent à collecter le matériel provenant d'autres fournisseurs (Salatino *et al.*, 2011).

#### 4.6.3.6 Influence du taux des phénols

On a également vérifié la possibilité d'association entre le taux des phénols totaux et l'activité antioxydante de propolis par le test de corrélation de Pearson (Tableau 26). Les pourcentages de l'activité antioxydante insérés dans SPSS ont été obtenus à partir des études sélectionnées qui ont présenté les valeurs de l'activité antioxydante (par le test au DPPH) de leurs échantillons sous forme d'un pourcentage.

**Tableau 26.** Valeurs de l'activité antioxydante et le taux des phénols insérés pour la réalisation de corrélation.

Activité antioxydante (%)	Taux de phénols totaux (mg/g)	Références
30,62	416,31	(Righi <i>et al.</i> , 2011)
20,00	0,70	
43,00	6,93	
56,60	9,03	(Sulaiman <i>et al.</i> , 2011)
63,30	9,33	
33,30	1,40	
86,06	55,74	
88,53	90,55	(Andrade <i>et al.</i> , 2017)
90,72	91,32	
90,01	210,33	
94,45	321,00	(Ibrahim et Alqurashi, 2022)

D'après les résultats obtenus dans le tableau 27, la corrélation est positive ce qui implique la dépendance de ces deux variables. L'influence du taux des phénols sur l'activité antioxydante a été confirmée par plusieurs travaux (Mihai *et al.*, 2011; Segueni *et al.*, 2017; Socha *et al.*, 2015).

**Tableau 27.** Vérification de la corrélation entre taux des phénols et l'activité antioxydante.

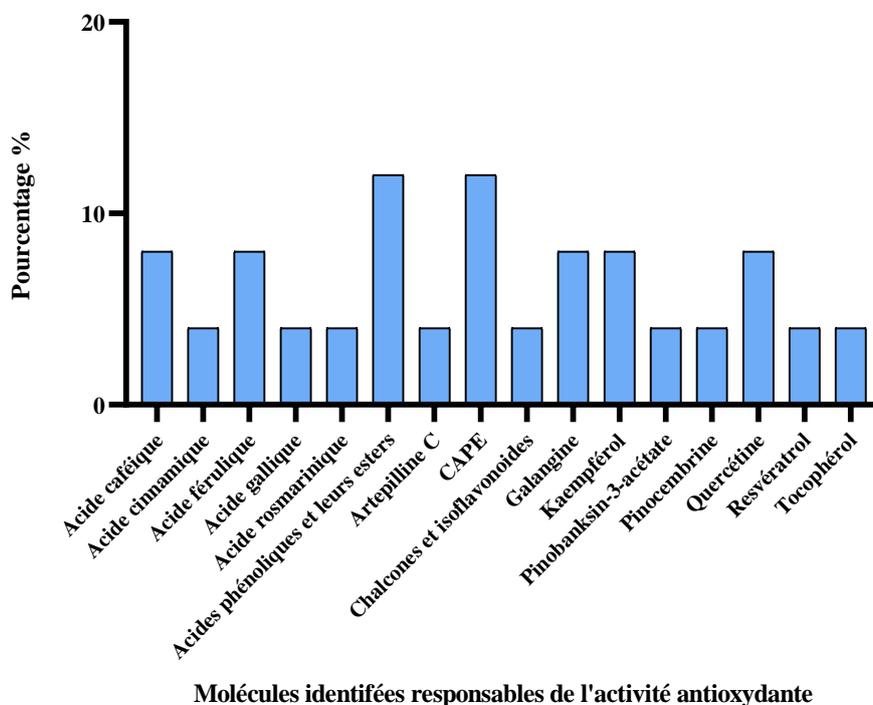
Variables	Relation	Coefficient de corrélation
Influence du taux des phénols totaux sur l'activité antioxydante	Dépendance	0.192

#### 4.6.4 Constituants majeurs responsables de l'effet antioxydant de propolis

Afin de mieux comprendre la cause de la grande variabilité rencontrée avec la composition chimique de la propolis, il est primordial de connaître son origine végétale et de prendre en considération les différentes modifications qu'elle subit par les abeilles. Pour la production de propolis, les abeilles collectent les sécrétions actives issues des différentes parties des plantes, ainsi que de substances exsudées à partir de blessures de ces dernières : il s'agit des matières lipophiles provenant des feuilles et des bourgeons, les gommes et les résines, auxquelles s'ajoutent les différentes sécrétions enzymatiques de leur salive. Cette variabilité chimique dépend également de la spécificité de la flore locale du site de collecte et donc des caractéristiques géographiques et climatiques de ce site (Bankova, 2005a).

Le traitement des articles sélectionnés nous a permis de distinguer deux types de travaux : d'une part, ceux qui ont été capables de cibler le constituant majeur responsable de l'activité antioxydante de leur échantillon de propolis et d'autre part, ceux qui ont attribué l'effet thérapeutique à la synergie et la complémentarité entre les composés actifs qui partagent la

même classe chimique. Dans les deux cas, les résultats obtenus (Figure 33) ont montré que les composés phénoliques dont les flavonoïdes, les acides phénoliques et leurs esters particulièrement le CAPE et les dérivés de l'acide cinnamique (acide férulique, artepiline C) sont responsables de l'effet protecteur de propolis contre les dommages du stress oxydatif.



**Figure 33.** Diagramme en bâtons récapitulatif des constituants majeurs responsables de l'activité antioxydante de propolis. Ester phénéthylique de l'acide caféique (CAPE).

Les acides phénoliques sont des composés constitués d'un noyau benzénique et de groupes carboxyle et hydroxyle dont le nombre, la position ainsi que le type de substitution sur leur cycle aromatique influencent directement la capacité antioxydante de cette classe chimique (Leja *et al.*, 2007). Ils sont multifonctionnels dans le sens où ils peuvent agir comme agents réducteurs et piègeurs d'oxygène. Certains d'entre eux sont également efficaces en tant que chélateurs des ions de métaux de transition (Gülçin *et al.*, 2010; Karaman *et al.*, 2010).

Les résultats d'une étude réalisée par Izuta et ses collaborateurs (2009) dans le but d'investiguer le potentiel antioxydant de certains constituants de la propolis rouge de la Chine et la propolis verte de Brésil, ont montré que l'acide caféique, un métabolite de l'acide caféoylquinique, présente une activité de piégeage des radicaux DPPH plus élevée en comparaison avec l'acide quinique (un autre métabolite de l'acide caféoylquinique). Cependant, les dérivés de l'acide caféique semblent être de puissants antioxydants naturels.

Le succès ultime d'un composé bioactif isolé de la propolis est, sans aucun doute, celui de l'ester phénéthylique de l'acide caféique (CAPE). Ce composé relativement simple a attiré

l'attention des chercheurs depuis la fin des années 70, lorsqu'il a été identifié comme le principal agent antimicrobien de la propolis européenne par Metzner et ses collaborateurs en 1979 (Bankova, 2009). Il est considéré comme l'un des effecteurs antioxydants importants de la propolis de type peuplier (Russo *et al.*, 2002 ; Velazquez *et al.*, 2007).

Il existe de nombreuses preuves *in vivo* et *in vitro* sur la capacité antioxydante du CAPE ; Sa capacité neuroprotectrice a été investiguée dans de nombreux cas pathologiques liés au stress oxydatif tels que les lésions provoquées par l'ischémie cérébrale. Dans ce contexte, la propolis verte brésilienne a prouvé son efficacité dans la prévention contre ces lésions par ses propriétés anti-oxydatives (Shimazawa *et al.*, 2005). Dans une autre étude publiée sur l'effet de propolis indienne sur le déficit de mémoire induit par la  $\beta$ -amyloïde, il a été démontré que la présence du CAPE dans l'extrait éthanolique administré a significativement amélioré les capacités de mémorisation chez les rats testés ce qui implique son potentiel effet anti-Alzheimer (Nanaware *et al.*, 2017). Une autre expérience a prouvé l'effet antioxydant bénéfique du CAPE isolé de la propolis sur le tissu cérébral de rats exposés à des rayonnements ionisants (Alkis *et al.*, 2015). Il a été démontré que le CAPE contenu dans la propolis représente un agent antiplaquettaire très efficace pour le traitement de la thrombo-embolie artérielle (Chen *et al.*, 2007).

L'acide férulique présente un large éventail d'effets thérapeutiques qui sont attribués à sa puissante capacité antioxydante. C'est un piègeur de radicaux libres caractérisé par sa faible toxicité, qui assure à la fois l'inhibition des enzymes qui catalysent la génération des espèces réactives oxygénées et un stimulateur des enzymes impliquées dans la prévention contre le stress oxydatif. Ce composé peut également agir comme donneur d'hydrogène, ceci est particulièrement important pour la protection des acides lipidiques de la membrane (Kiewlicz *et al.*, 2015; Zduńska *et al.*, 2018). Il a été approuvé au Japon comme additif alimentaire pour prévenir l'oxydation (Itagaki *et al.*, 2009).

Cependant, ces propriétés n'ont pas été élucidées en détails dans les études faites sur la propolis et les preuves *in vivo* et *in vitro* sont limitées. Les résultats de notre analyse systématique montrent que l'effet de l'acide férulique autant qu'agent antioxydant présent dans la propolis est complémentaire et que ce composé agit en synergie avec d'autres acides phénoliques. Gülçin et ses collaborateurs (2010), ont attribué le pouvoir antioxydant de leur extrait aqueux lyophilisé de propolis à la présence des composés phénoliques dont l'acide férulique était parmi les constituants majeurs isolés.

La propolis verte brésilienne, recueillie à partir de résines de *B. dracunculifolia*, a suscité beaucoup d'intérêt en raison de plusieurs propriétés biologiques intéressantes liées à

l'artepilline C, un métabolite secondaire dérivé de l'acide cinnamique, qui est devenu l'un des principaux marqueurs chimiques de la propolis verte (Kumazawa *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont exploité son potentiel antioxydant à travers les tests *in vitro* comme le DPPH, le FRAP et l'ABTS (Ahn *et al.*, 2009; Seibert *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2007; Veiga *et al.*, 2017). L'artepilline C peut exercer son activité antioxydante par l'augmentation du potentiel des enzymes endogènes telles que la SOD la CAT et la GPx, ce qui réduit les molécules pro-oxydantes à l'origine des dommages cellulaires (Fonseca *et al.*, 2011; Uto *et al.*, 2006). Un autre mécanisme d'action exercé par ce composé est la protection des membranes contre les dommages cellulaires de la peroxydation lipidique. Une étude réalisée *in vitro* sur des cellules ganglionnaires de la rétine, a prouvé l'effet antioxydant de l'extrait aqueux de propolis contre la neurotoxicité induite par la peroxydation lipidique (Nakajima *et al.*, 2007).

Les scientifiques ont démontré que l'ingestion des aliments riche en quercétine contribue à la protection contre les maladies cardiovasculaires par l'inhibition de l'agrégation des plaquettes sanguines (Hubbard *et al.*, 2004). Elle inhibe l'activité de la xanthine oxydase ce qui entraîne une diminution des lésions oxydatives (Chang *et al.*, 1993). Elle provoque également une réduction des lésions d'ischémie reperfusion, un phénomène incontournable en transplantation rénal, en interférant avec l'activité de l'oxyde nitrique synthase (Shoskes, 1998). Les résultats de Sanderson et son équipe (1999), implique que la quercétine aide à maintenir la transparence du cristallin après une agression oxydative.

#### **4.7 Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo* des extraits de propolis**

D'après notre analyse, l'étude du potentiel antioxydant des extraits dérivés de la propolis est un objectif généralement accompli à travers les tests *in vitro* qui sont plus courants par rapport aux tests *in vivo*. Néanmoins, ces études ne prennent pas en considération les paramètres biochimiques, métaboliques et autres paramètres physiologiques (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2016).

Plusieurs variables biologiques peuvent être accessibles et mesurées par les études *in vivo*, y compris la biodisponibilité des matrices testées (Holst et Williamson, 2008). Cet attribut est très important pour la détermination des doses efficaces et des formes galéniques appropriées afin d'assurer l'efficacité thérapeutique ciblée. Les antioxydants non seulement naturels mais aussi synthétiques subissent de nombreuses réactions biochimiques au cours de l'ingestion, la digestion et l'absorption par l'organisme. Par conséquent, la biodisponibilité effective des différents antioxydants n'est pas clairement définie. Beaucoup d'entre eux sont ingérés sous leur forme active, d'autres doivent être métabolisés pour être biologiquement

actifs, ou même devenir inactifs. En outre, plusieurs facteurs endogènes tels que les interactions avec d'autres nutriments et les variations inter et intra individuelles, affectent leur biodisponibilité par rapport à la dose ingérée (Espín *et al.*, 2007; Holst et Williamson, 2008; Martins *et al.*, 2016).

Sans établir de lien entre les mesures toxico-dynamiques *in vitro* et la toxicocinétique *in vivo*, la pertinence des scénarios d'exposition humaine et de l'évaluation des risques sera limitée (Brake *et al.*, 2017; Sewell *et al.*, 2017).

Dans ce travail systématique, deux études *in vivo* (Tableau 28) ont été parmi les articles sélectionnés et ont été analysées pour extraire les données pertinentes.

**Tableau 28.** Etudes *in vivo* sélectionnées dans notre travail systématique.

Titre de l'étude	Référence
Antioxydant Effect of Propolis Against Exposure to Chromium in <i>Cyprinus carpio</i>	(Yonar <i>et al.</i> , 2014)
Antioxydant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats	(Ahmed <i>et al.</i> , 2017)

#### 4.7.1 Modèle animal utilisé

Le choix judicieux de l'espèce sur laquelle sont menées les investigations est cruciale et représente la première étape de l'analyse d'un processus biologique ou de la validation d'une phase pré-clinique. Il est nécessaire d'évaluer les similarités et les différences entre l'espèce sur laquelle l'expérimentation sera conduite et l'espèce pour laquelle les résultats obtenus seront projetés, en général il s'agit de l'homme (Hardin-Pouzet et Morosan, 2019; Nouvel *et al.*, 2010).

Un modèle animal idéal pour la validation des cibles serait un modèle qui récapitule le phénotype des pathologies testées, partage la même pathophysiologie que celle de l'homme et qui répond aux thérapies humaines existantes de manière similaire (Brake *et al.*, 2017). La sélection des espèces animales est également basée sur des considérations pratiques telles que la disponibilité et la facilité d'utilisation dans des conditions et des procédures de laboratoire normalisées. Selon les articles sélectionnés, les modèles animaux utilisés ont été les poissons *Cyprinus carpio* et le rat Wistar.

Il a été démontré que l'utilisation des produits naturels tels que la propolis peut offrir une variété d'avantage en aquaculture, en minimisant le risque de toxicité et les effets secondaires provoqués par les produits synthétiques utilisés dans cette activité sur l'environnement et sur

l'état de la faune marine qui influence directement la santé humaine (de la Cruz-Cervantes *et al.*, 2018).

D'autre part, les rats sont largement utilisés pour évaluer les fonctions biologiques de la propolis particulièrement son effet antidiabétique, neuroprotecteur et cardioprotecteur qui sont généralement attribués à son potentiel antioxydant. Les rats possèdent un certain nombre de qualités qui leurs permettent d'être un modèle animal très approprié et très apprécié. Comme pour les souris, ces qualités comprennent une taille relativement petite, un fond génétique connu, un temps de génération court, des similitudes avec les conditions pathologiques humaines et un statut microbien connu. Leur nature docile les rend plus faciles à manipuler en laboratoire que de nombreux autres rongeurs (Hickman *et al.*, 2017).

#### **4.7.2 Voie d'administration adoptée dans le traitement par la propolis**

Selon les articles ciblés, la voie d'administration utilisée pour le traitement des animaux par les extraits de propolis est la voie orale (100%). Cette forme est la plus facilement acceptée car elle est pratique, simple, sans douleur et auto-administrée (Ding et Li, 2017).

L'acheminement des principes actifs vers les sites cibles fait souvent intervenir diverses barrières biologiques comme l'épithélium du tractus gastrointestinal, l'endothélium vasculaire ou la barrière hémato-encéphalique (Sjögren *et al.*, 2014).

Ces barrières exercent une influence directe sur la biodisponibilité des médicaments et leur application thérapeutique. C'est le cas rencontré avec l'emploi de la voie orale pour administrer les différentes préparations biologiques en raison de la possibilité d'altération des principes actifs par les sucs gastriques (pH acide) et les enzymes hépatiques lors de leur passage par la veine porte vers le foie (Rabanel *et al.*, 2012).

#### **4.7.3 Tests d'évaluation de l'activité antioxydante *in vivo* de propolis**

D'après l'analyse des études sélectionnées, on a constaté que pour toutes les méthodes *in vivo*, les extraits de propolis à tester sont généralement administrés aux animaux d'expérience selon des posologies définies. Après une période de traitement déterminée, les animaux sont sacrifiés et le sang ou les tissus sont utilisés pour réaliser les différents dosages nécessaires, qui consistent le plus souvent d'une estimation du taux des enzymes antioxydantes endogènes telles que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion-S-transférase (GSt) en association avec une estimation des produits de la peroxydation lipidique, généralement le malondialdéhyde (MDA).

La peroxydation lipidique est le phénomène le plus anciennement étudié des effets des radicaux libres et le plus simple à mesurer. Certains produits de dégradation des lipides comme les diènes conjugués et les aldéhydes peuvent se former après une peroxydation et fournissent un moyen de détection utile pour les études du stress oxydant (Moore et Roberts, 1998).

La mesure des enzymes antioxydantes est généralement réalisée par dosage spectrophotométrique, pour lequel des kits commerciaux sont disponibles. Cela permet une analyse simple et peu coûteuse, qui peut être effectuée dans la plupart des laboratoires sans avoir besoin d'un équipement sophistiqué. Des précautions sont nécessaires lors du stockage des échantillons, afin d'éviter leur dégradation.

L'efficacité de l'action du système antioxydant réside dans la synergie qui se produit entre ces antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Compte tenu de ces interactions, on peut constater que la mesure des taux d'antioxydants individuels ne fournira qu'un aperçu limité de la capacité antioxydante de l'hôte en réponse à divers traitements. Le développement de tests pour mesurer la capacité de réduction globale d'un système vise à surmonter ce problème (Wood *et al.*, 2006).

Le tableau 29 résume le principe des méthodes de dosage des enzymes antioxydantes ainsi que le dosage du MDA.

**Tableau 29.** Principes du dosage de quelques paramètres biologiques intervenant dans le processus oxydatif.

Élément à doser	Principe du dosage	Références
<b>Malondialdéhyde (MDA)</b>	La concentration du MDA est souvent déterminée à l'aide de l'acide thiobarbiturique (TBA). Le MDA est dérivé avec le TBA pour former le produit d'addition MDA-TBA fluorescent, qui est le plus souvent quantifié à l'aide d'un dosage spectrophotométrique.	(Placer <i>et al.</i> , 1966)
<b>Catalase</b>	La mesure de l'activité de catalase repose sur la détermination de la constante de décomposition du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme CAT.	(Aebi et Catalase, 1974)
<b>Superoxyde dismutase</b>	Le principe de la méthode repose sur l'empêchement de la réduction du nitrobluetetrazolium (NBT) présent dans le milieu réactionnel en raison des radicaux superoxydes générés lors de la réaction enzymatique entre la xanthine et la xanthine oxydase, par la SOD présente dans l'échantillon (sang/tissus).	(Sun <i>et al.</i> , 1988)
<b>Glutathion peroxydase</b>	Le dosage repose sur la mesure de la vitesse de disparition de NADPH, H <sup>+</sup> oxydé en NADP <sup>+</sup> qui s'accompagne d'une diminution de l'absorbance à 340 nm.	(Neagu <i>et al.</i> , 2011)

#### 4.7.4 Efficacité antioxydante de la propolis dans les modèles *in vivo*

L'emploi de propolis comme supplément nutritionnel a été rapporté particulièrement pour ses propriétés antioxydante qui favorisaient la protection des organismes vivants contre le stress oxydatif provoqué par l'exposition à de nombreux agents chimiques nocifs.

D'après les résultats de Yonar et ses collaborateurs (2014), l'administration de l'extrait éthanolique de propolis à des doses de 5mg/kg et 100mg/kg a diminué la gravité du stress oxydatif induit par l'exposition des poissons au chrome dans différents tissus, principalement au moyen de l'amélioration de l'état de performance du système antioxydant enzymatique.

Les chercheurs ont observé la diminution du niveau de MDA dans le sang, ce qui pourrait être dû à la capacité de la propolis à réduire l'accumulation des radicaux d'anions superoxyde générés pendant la peroxydation lipidique induite par le chrome. Le traitement simultané avec la propolis a entraîné une diminution significative de l'activité de SOD dans le sang et les tissus. Cette diminution a été attribuée à l'inhibition de la génération de radicaux d'anions superoxyde ou à l'activité potentielle de piégeage des radicaux libres par l'extrait de propolis. Ils ont également rapporté une augmentation de l'activités de CAT, ce qui pourrait être dû à la capacité de la propolis à éliminer l'accumulation de chrome qui a bloqué l'activité de cette enzyme. Ainsi, la co-administration de propolis avec le chrome a montré une stabilité dans l'activité des enzymes GSH et GPx ce qui confirme son effet protecteur.

Dans une autre approche, Ahmed et son équipe (2017), ont évalué l'effet antioxydant d'un extrait de propolis sur l'ischémie myocardique induite chez le rat sur la base des dosages de plusieurs marqueurs biochimiques en plus des résultats histopathologiques du cœur.

D'une part, le prétraitement avec la propolis a amélioré de manière significative les niveaux des enzymes antioxydantes telles que la SOD, GPx, et GSt par rapport aux niveaux mesurés pour les rats traités avec un catécholamine synthétique (un agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) qui provoque un stress sévère pour le myocarde.

D'autre part, ils ont observé une amélioration dans le taux de tous les marqueurs d'enzymes, ce qui indique que la propolis contribue à maintenir l'intégrité de la membrane du cœur contre les lésions oxydatives, limitant ainsi la fuite des enzymes.

Ainsi, l'extrait de propolis a restauré de manière significative les altérations du statut des lipoprotéines, ce qui assure la limitation de la progression des plaques d'athérome, maintenant la fluidité et la fonction normales du myocarde.

Les résultats histopathologiques ont montré l'absence de nécrose et une diminution de l'inflammation dans les cœurs prétraités par l'extrait de propolis.

# **Conclusion**

## Conclusion

Au cours de la réalisation de ce modeste mémoire, le passage par plusieurs productions scientifiques sur le pouvoir antioxydant de propolis nous a permis de témoigner à la fois le progrès et l'évolution de cet axe de recherche. Cependant, on a observé que malgré la disponibilité de nombreuses publications scientifiques traitant la composition chimique de la propolis et ses propriétés antioxydantes, la connaissance des constituants actifs de ce produit contre les dommages du stress oxydatif est loin d'être complète. L'analyse des publications scientifiques sélectionnées dans cette étude a montré que la composition chimique de propolis est très complexe et varie fortement en fonction de plusieurs facteurs qui ne se limitent pas aux conditions exercées par la nature sur la fabrication de cette résine mais qui s'étalent aux choix des outils et des instruments de manipulation par les chercheurs. La seule façon de normaliser la propolis est de spécifier des normes multiples pour différents types de propolis selon le profil chimique correspondant.

A travers l'analyse systématique et descriptive de 20 publications scientifiques sur le pouvoir antioxydant de la propolis, nous avons pu tirer que la propolis brésilienne est largement étudiée, car le Brésil dispose d'une variété de reliefs et de climats qui favorisent la disponibilité de plusieurs ressources naturelles. La richesse floristique de ce pays implique la disponibilité de plusieurs types de propolis qui méritent d'être valoriser et investiguer.

Cinquante pourcents des articles sélectionnés ont exploité plusieurs activités biologiques de la propolis en association à son effet antioxydant, ce qui donne plus de valeur aux échantillons testés, implique le grand potentiel thérapeutique de ce produit et confirme la possibilité d'usage multiple de la propolis. L'effet bactéricide de la propolis est le plus largement documenté en association à l'activité antioxydante.

Il semblerait que la propolis issue des différentes variétés d'abeille *Apis mellifera* sont les plus exploitées. Cependant notre analyse a montré qu'*Apis mellifera* n'est pas la seule espèce d'abeille qui soit en capacité de produire de la propolis. Il existe d'autres espèces d'abeilles, qui peuvent également produire une substance analogue à la propolis. On parle des tribus des Trigones et des Melipones qui produisent la geopropolis, qui mérite d'être investiguer en profondeur.

On a remarqué que dans 55% des études, les chercheurs se contentent de citer uniquement le nom des végétaux disponibles à proximité des ruches étudiées. L'attribution des échantillons de propolis à leur source botanique appropriée est une procédure très difficile surtout dans les terrains qui disposent d'une variété d'espèces végétales mais la connaissance de ces sources

n'est pas seulement d'intérêt académique. Elle pourrait être utilisée comme support pour la standardisation chimique des types de propolis.

Toutes les études passent par une étape d'extraction. Une utilisation médicale à grand échelle nécessite des méthodes d'extraction et de purification afin d'obtenir des solutions dans lesquelles les constituants de la propolis seront identifiables et quantifiables. La macération simple est la technique la plus employée. Cependant l'analyse des études montre que l'extraction par ultrasons offre un meilleur rendement. L'analyse des études a montré que l'éthanol à 70% est le meilleur solvant pour extraire la propolis.

On a également remarqué que toutes les études sélectionnées ne visaient pas à déterminer le profil chimique complet, mais se sont limitées à la classe des phénols. Un aperçu détaillé sur la composition chimique de la propolis peut contribuer à une meilleure compréhension de son potentiel antioxydant. Notre analyse systématique a montré que la composition chimique de propolis varie selon plusieurs facteurs qui sont souvent négligés par les chercheurs comme les caractéristiques phytogéographiques de la région d'étude, la race d'abeille, la saison et la méthode de récolte et les conditions de traitement et de conservation.

Conscient de l'impact négatif des multiples lacunes dans l'axe de valorisation de la propolis sur la qualité des résultats obtenus dans ce domaine, il serait intéressant de réaliser dans les prochaines études systématiques un choix non aléatoire des articles, fondé sur la sélectivité des études existant dans cet axe en fonction des facteurs de variabilité chimique tels que les caractéristiques phytogéographiques comme critères d'inclusion. Ceci permettra de recueillir avec précision les projets qui ont travaillé sur ces critères et de traiter chaque facteur individuellement dans des études distinctes qui vont assurer à la fois la comparaison et la classification des sources et des espèces étudiées. Il serait également pertinent d'inclure un effectif élevé d'études réalisées sur le pouvoir antioxydant de propolis, d'explorer d'autres activités biologiques et d'analyser d'autres critères comme la traçabilité des conditions de production, l'influence des conditions de manipulation sur le rendement d'extraction et de vérifier la compatibilité des formes galéniques, des modes d'administration et des posologies avec les modèles animaux étudiés. Les chercheurs intéressés par ce domaine doivent reconsidérer les facteurs négligés lors de la réalisation des études sur la propolis, en particulier l'influence exercée par l'écosystème sur sa composition chimique. L'investigation des propriétés thérapeutiques des autres classes chimiques moins exploitées que les phénols et la considération des interactions (synergie/antagonisme) des biomolécules actives issues de cette résine vont permettre de mieux comprendre ses vertus thérapeutiques.

# **Bibliographie**

---

**Bibliographie**

- Aebi, H., et Catalase, I. (1974). Methods in Enzymatic Analysis Bergmeyer. *Verlay chem. Wrinheim*, 673. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Ahmad, S., Arshad, M. A., Ijaz, S., Khurshid, U., Sofi, F., et Azam, R. (2014). Review on methods used to determine Antioxidant activity. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 1, 41-46.
- Ahmed, R., Tanvir, E. M., Hossen, M. S., Afroz, R., Ahmmed, I., Rumpa, N.-E.-N., Paul, S., Gan, S. H., Sulaiman, S. A., et Khalil, M. I. (2017). Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2017, 5370545. <https://doi.org/10.1155/2017/5370545>
- Ahn, M.-R., Kunimasa, K., Kumazawa, S., Nakayama, T., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., et Ohta, T. (2009). Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition et Food Research*, 53(5), 643-651. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800021>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., et Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>
- Ali, I. H., Daoud, A. S., et Shareef, A. Y. (2012). Physical properties and chemical analysis of Iraqi propolis. *Tikrit Journal of Pure Science*, 17(2), 26-31.
- Alkis, H. E., Kuzhan, A., Dirier, A., Tarakcioglu, M., Demir, E., Saricicek, E., Demir, T., Ahlatci, A., Demirci, A., et Cinar, K. (2015). Neuroprotective effects of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the radiation-injured brain tissue (Neuroprotective effects of propolis and CAPE). *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION RESEARCH*, 13(4), 297-303.
- Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., et Battino, M. (2009). Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Current Analytical Chemistry*, 5, 293-302. <https://doi.org/10.2174/157341109789077768>
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., et Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 101, 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., et Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>
- Archaina, D., Rivero, R., Sosa, N., et Baldi Coronel, B. (2015). Influence of the harvesting procedure and extracting process on the antioxidant capacity of ethanolic propolis
-

- extracts. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 474-481. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1181838>
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals : A practical case. *Trends in Food Science et Technology*, 11(11), 419-421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)
- Arruda, C., Pena Ribeiro, V., Oliveira Almeida, M., Aldana Mejía, J. A., Casoti, R., et Kenupp Bastos, J. (2020). Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artemillin C and p-coumaric acid from Brazilian green propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 178, 112922. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112922>
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., et Abdelgawad, A. A. M. (2017). Antioxidants : an overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365. <https://doi.org/10.17628/ecb.2017.6.365-375>
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh059>
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 114-117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(2), 23-28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.2.01>
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., I Falcão, S., Isla, M. I., et Moreno, M. I. N. (2019). Standard methods for Apis mellifera propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49.
- Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Popov, S., Sforcin, J. M., et Cunha Funari, S. R. (1998). Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 29(4), 361-367. <https://doi.org/10.1051/apido:19980406>
- Bankova, V., Popova, M., et Trusheva, B. (2006). Plant Sources of Propolis : An Update from a Chemist's Point of View. *Natural Product Communications*, 1(11), 1934578X0600101118. <https://doi.org/10.1177/1934578X0600101118>
- Bankova, V. S., Castro, S. L. de, et Marcucci, M. C. (2000). Propolis : Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15. <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- Bankova, V., Trusheva, B., et Popova, M. (2021). Propolis extraction methods : A review. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 734-743.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., et Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15(7), 561-571. <https://doi.org/10.1002/ptr.1029>

- 
- Benzie, I. F., Chung, W., et Strain, J. J. (1999). "Antioxidant"(reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(3), 146-150.
- Bogdanov, S. (2016). The Propolis Book, Chapter 1: Propolis: Origine, Production, Composition. Page 2. *Bee Product, Science*.
- Boisard, S. (s. d.). Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis. 390.
- Boisard, S., Le Ray, A.-M., Gatto, J., Aumond, M.-C., Blanchard, P., Derbré, S., Flurin, C., et Richomme, P. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1344-1351. <https://doi.org/10.1021/jf4053397>
- Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo, T. M., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., de Picoli Souza, K., et Dos Santos, E. L. (2017). Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil : *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1038153. <https://doi.org/10.1155/2017/1038153>
- Bonamigo, T., Campos, J. F., Oliveira, A. S., Torquato, H. F. V., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., de Picoli Souza, K., et Dos Santos, E. L. (2017). Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PloS One*, 12(9), e0183983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183983>
- Bouaroura ép Redjem, A., et Segueni, N. (2020). Etude comparative du profil chimique et de l'activité antioxydante de plusieurs propolis de l'Est algérien et investigation phytochimique de la propolis la plus active (Dissertation doctorale, université frères Mentouri Constantine 1).
- Braakhuis, A. (2019). Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients*, 11(11), 2705. <https://doi.org/10.3390/nu11112705>
- Brake, K., Gumireddy, A., Tiwari, A., Chauhan, H., et Kumari, D. (2017). *In vivo* studies for drug development via oral delivery: Challenges, animal models and techniques. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 8(9), 1-11.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., et Bren, U. (2016). Polyphenols : Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, 21(7), 901.
- Broeckx, G., Vandenheuvél, D., Claes, I. J., Lebeer, S., et Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International journal of pharmaceutics*, 505(1-2), 303-318.
- Bueno-Silva, B., Marsola, A., Ikegaki, M., Alencar, S. M., et Rosalen, P. L. (2017). The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source : Chemical composition and antibacterial activity. *Natural product research*, 31(11), 1318-1324.
-

- Buriol, L., Finger, D., Schmidt, E. M., dos Santos, J. M., Rosa, M. R. da, Quináia, S. P., Torres, Y. R., Dalla Santa, H. S., Pessoa, C., et Moraes, M. O. de. (2009). Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: Uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova*, 32(2), 296-302.
- Campos, J. F., dos Santos, U. P., Macorini, L. F. B., de Melo, A. M. M. F., Balestieri, J. B. P., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A. L., de Picoli Souza, K., et dos Santos, E. L. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 65, 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>
- Cardinault, N., Cayeux, M.-O., et Percie du Sert, P. (2012). La propolis : Origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*, 10(5), 298-304. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0733-y>
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., et Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Chang, W.-S., Lee, Y.-J., Lu, F.-J., et Chiang, H.-C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer research*, 13(6A), 2165-2170.
- Chen, T., Lee, J., Lin, K., Shen, C., Chou, D., et Sheu, J. (2007). Antiplatelet activity of caffeic acid phenethyl ester is mediated through a cyclic GMP-dependent pathway in human platelets. *Chinese Journal of Physiology*, 50(3), 121.
- Conti, B. J., Bankova, V., et Sforcin, J. M. (2015). Chemical Composition of the Same Brazilian Propolis Sample Analyzed in 1997 and in 2012 : No Freezing Effect. *Natural Product Communications*, 10(7), 1934578X1501000736. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000736>
- Craig, L. C., Gregory, J. D., et Hausmann, W. (1950). Versatile laboratory concentration device. *Analytical Chemistry*, 22(11), 1462-1462.
- Cunha, I. B. S., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., Povia, G. S., et Carvalho, P. de O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(6), 964-970. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000600026>
- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., et Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 34(6), 975-991. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>
- Daleprane, J. B., et Abdalla, D. S. (2013). Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.
- Dantas Silva, R. P., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., Carvalho, A. A., Padilha, F. F., Barbosa, J. D. V., et Umsza-Guez, M. A. (2017).

- 
- Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PloS One*, 12(3), e0172585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>
- da Silva Cunha, I. B., Rodrigues, M. L. T., Meurer, E. C., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Eberlin, M. N., et Frankland Sawaya, A. C. H. (2006). Effect of the maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. *Journal of apicultural research*, 45(3), 137-144.
- Davies, M. J., Forni, L. G., et Willson, R. L. (1988). Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. And pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *Biochemical Journal*, 255(2), 513-522.
- de la Cruz-Cervantes, J. A., Benavides-González, F., Sánchez-Martínez, J. G., Vázquez-Sauceda, M. de la L., et Ruiz-Urbe, A. J. (2018). Propolis in aquaculture : A review of its potential. *Reviews in Fisheries Science et Aquaculture*, 26(3), 337-349.
- Dezmirean, D. S., Pașca, C., Moise, A. R., et Bobiș, O. (2020). Plant sources responsible for the chemical composition and main bioactive properties of poplar-type propolis. *Plants*, 10(1), 22.
- Ding, C., et Li, Z. (2017). A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 1440-1453. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.130>
- do Nascimento, T. G., dos Santos Arruda, R. E., da Cruz Almeida, E. T., dos Santos Oliveira, J. M., Basílio-Júnior, I. D., Celerino de Moraes Porto, I. C., Rodrigues Sabino, A., Tonholo, J., Gray, A., Ebel, R. E., Clements, C., Zhang, T., et Watson, D. G. (2019). Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. *Scientific Reports*, 9(1), 18293. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54591-3>
- Duca, A., Sturza, A., Moacă, E.-A., Negrea, M., Lalescu, V.-D., Lungeanu, D., Dehelean, C.-A., Muntean, D.-M., et Alexa, E. (2019). Identification of Resveratrol as Bioactive Compound of Propolis from Western Romania and Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), E3368. <https://doi.org/10.3390/molecules24183368>
- Duru, I. (2021). Comparative phytochemical analysis of brown, green and red propolis from Umudike, Abia state Nigeria. 3, 86-97. <https://doi.org/10.22034/ajcb.2021.121910>
- Ecem Bayram, N., Gerçek, Y. C., Bayram, S., et Toğar, B. (2020). Effects of processing methods and extraction solvents on the chemical content and bioactive properties of propolis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 905-916.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., et Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals : Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.
-

- 
- Fang, Y.-Z., Yang, S., et Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., et Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds : From in vitro results to in vivo evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(7), 649-671.
- Fonseca, Y. M., Marquele-Oliveira, F., Vicentini, F. T., Furtado, N. A. J., Sousa, J. P. B., Lucisano-Valim, Y. M., et Fonseca, M. J. V. (2011). Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Fukumoto, L. R., et Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Galeotti, F., Maccari, F., Fachini, A., et Volpi, N. (2018). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(3), E41. <https://doi.org/10.3390/foods7030041>
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, 60(2), 59-84. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>
- Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M. H., Bilsel, M., et Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(8-9), 2227-2238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053>
- Halliwell, B., et Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 125-126. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)91457-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)91457-3)
- Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S. T., Lohmann, C. H., et Singh, G. (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(5), 2073-2087. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34546>
- Hardin-Pouzet, H., et Morosan, S. (2019). *Organismes-modèles et réglementation de la recherche animale*. EDP Sciences.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology et Therapeutics*, 96(2), 67-202. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
- Hickman, D. L., Johnson, J., Vemulapalli, T. H., Crisler, J. R., et Shepherd, R. (2017). Commonly Used Animal Models. *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, 117-175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>
-

- 
- Holst, B., et Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals : From bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology*, 19(2), 73-82.
- Hostettmann, K., et Wolfender, J.-L. (2000). Applications of liquid chromatography/UV/MS and liquid chromatography/NMR for the on-line identification of plant metabolites. *Bioactive Natural Products: Isolation, Structure Elucidation and Biological Properties*, 31.
- Hubbard, G. P., Wolffram, S., Lovegrove, J. A., et Gibbins, J. M. (2004). Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(12), 2138-2145.
- Ibrahim, M. E. E.-D., et Alqurashi, R. M. (2022). Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109463. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109463>
- Ignat, I., Volf, I., et Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Irigoit, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., et Basualdo, M. (2021). The use of propolis as a functional food ingredient : A review. *Trends in Food Science et Technology*, 115, 297-306.
- Isla, M. I., Paredes-Guzman, J. F., Nieva-Moreno, M. I., Koo, H., et Park, Y. K. (2005). Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), 1166-1172.
- Isla, M. I., Zampini, I. C., Ordóñez, R. M., Cuello, S., Juárez, B. C., Sayago, J. E., Moreno, M. I. N., Alberto, M. R., Vera, N. R., Bedascarrasbure, E., Alvarez, A., Ciocchini, F., et Maldonado, L. M. (2009). Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. *Journal of Medicinal Food*, 12(6), 1334-1342. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0286>
- Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., et Iseki, K. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid : A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chemistry*, 114(2), 466-471.
- Izuta, H., Narahara, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Kondo, S., et Hara, H. (2009). 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(12), 1947-1951.
- Jadhav, T. R., et Moon, R. S. (s. d.). Review on lyophilization technique. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(05), 24.
- Jovanović, A. A., Djordjević, V. B., Petrović, P. M., Pljevljakušić, D. S., Zdunić, G. M., Šavikin, K. P., et Bugarski, B. M. (2021). The influence of different extraction
-

- conditions on polyphenol content, antioxidant and antimicrobial activities of wild thyme. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25, 100328. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100328>
- Karadag, A., Ozcelik, B., et Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2(1), 41-60.
- Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K. S., et Apak, R. (2010). Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Food Chemistry*, 120(4), 1201-1209.
- Katekhaye, S., Fearnley, H., Fearnley, J., et Paradkar, A. (2019). Gaps in propolis research : Challenges posed to commercialization and the need for an holistic approach. *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 604-616. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1614273>
- Kekeçoğlu, M., Keskin, M., Birinci, C., Birinci, E., et Kolayli, S. (2021). Effects of Honey Bee Race and Season on Propolis Composition. *Journal of Agricultural Sciences*, 27(3), 292-297. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.619996>
- Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., et Tragoolpua, Y. (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(11), 6991-6995. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6991>
- Kiewlicz, J., Szymusiak, H., et Zieliński, R. (2015). Thermal stability and antioxidant activity of long-chain alkyl esters od ferulic acid. *Food Sci Technol*, 4, 188-200.
- Kocot, J., Kiełczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., et Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly : Possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.
- Konishi, S., Sawaya, A., Custódio, A. R., Cunha, I., et Shimizu, M. (2004). Influence of solubilising agents on antimicrobial activity of propolis extracts and of hydro alcoholic spray formula. *Mensagem Doce*, 75, 22-25.
- Krell, R., et Nations. (1996). Value-added Products from Beekeeping. *Food et Agriculture Org.*
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., et Nakayama, T. (2003). Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(6), 740-742.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., et Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., et Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 14(5), 278-292.

- 
- Lavie, P. (1975). The relationship between propolis, poplar buds (*Populus* spp.) and castoreum. *Proc. XXV International Beekeeping Congress, Grenoble*, 229-233.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., et Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, *100*(1), 237-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>
- Létard, J.-C., Canard, J.-M., Costil, V., Dalbiès, P., Grunberg, B., Lapuelle, J., et Cregg, C. nutrition et thérapies complémentaires du. (2015). *Phytothérapie – Principes généraux. Hegel*, *1*(1), 29-35.
- Liberati, A., Altman, D. G., Tetzlaff, J., Mulrow, C., Gøtzsche, P. C., Ioannidis, J. P. A., Clarke, M., Devereaux, P. J., Kleijnen, J., et Moher, D. (2009). The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: Explanation and elaboration. *BMJ*, *339*, b2700. <https://doi.org/10.1136/bmj.b2700>
- M. Rabanel, J., Aoun, V., Elkin, I., Mokhtar, M., et Hildgen, P. (2012). Drug-Loaded Nanocarriers: Passive Targeting and Crossing of Biological Barriers. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(19), 3070-3102. <https://doi.org/10.2174/092986712800784702>
- Machado, B. A. S., Silva, R. P. D., Barreto, G. de A., Costa, S. S., Silva, D. F. da, Brandao, H. N., Rocha, J. L. C. da, Dellagostin, O. A., Henriques, J. A. P., et Umsza-Guez, M. A. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PloS one*, *11*(1), e0145954.
- Marcucci, M. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, *26*(2), 83-99.
- Maroof, K., et Gan, S. H. (2020). A Review on chemical compositions, biological activity and formulation techniques of Malaysian honey bee and meliponine propolis. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, *10*(6), 507-523.
- Martins, N., Barros, L., et Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science et Technology*, *48*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.008>
- Matsuda, A. H., et de Almeida-Muradian, L. B. (2008). Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis. *Phytochemical Analysis*, *19*(2), 179-183. <https://doi.org/10.1002/pca.1043>
- Mello, B. C., Petrus, J. C. C., et Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, *96*(4), 533-539.
- Meyer, W., et Ulrich, W. (1956). « Propolis Bees » and Their Activities. *Bee World*, *37*(2), 25-36. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1956.11094916>
-

- 
- Mihai, C. M., Marghitas, L. A., Dezmiorean, D. S., et Barnutiu, L. (2011). Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 100-103.
- Miryan, M., Soleimani, D., Dehghani, L., Sohrabi, K., Khorvash, F., Bagherniya, M., Sayedi, S. M., et Askari, G. (2020). The effect of propolis supplementation on clinical symptoms in patients with coronavirus (COVID-19) : A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, 21(1), 996. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04934-7>
- Moise, A. R., et Bobiş, O. (2020). Baccharis dracunculifolia and Dalbergia ecastophyllum, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. *Plants*, 9(11), 1619. <https://doi.org/10.3390/plants9111619>
- Moore, K., et Roberts, L. J. (1998). Measurement of Lipid Peroxidation. *Free Radical Research*, 28(6), 659-671. <https://doi.org/10.3109/10715769809065821>
- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., et Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(11), 3482-3485. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025>
- Mountford-McAuley, R., Prior, J., et Clavijo McCormick, A. (2021). Factors affecting propolis production. *Journal of Apicultural Research*, 0(0), 1-9. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1938456>
- Moura, S. A. L. de, Negri, G., Salatino, A., Lima, L. D. da C., Dourado, L. P. A., Mendes, J. B., Andrade, S. P., Ferreira, M. A. N. D., et Cara, D. C. (2011). Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis : Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, enep112. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep112>
- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., et Hara, H. (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life sciences*, 80(4), 370-377.
- Nanaware, S., Shelar, M., Sinnathambi, A., Mahadik, K. R., et Lohidasan, S. (2017). Neuroprotective effect of Indian propolis in  $\beta$ -amyloid induced memory deficit : Impact on behavioral and biochemical parameters in rats. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 93, 543-553. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.072>
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Ozcelik, B. Ö., et Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis : Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(4(Suppl.)), 1417-1423.
- Naude, Y., De Beer, W. H. J., Jooste, S., Van Der Merwe, L., et Van Rensburg, S. J. (1998). Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the
-

- determination of DDT, DDD and DDE in sediment. *WATER SA-PRETORIA-*, 24, 205-214.
- Neagu, V. R., García, B. M., Rodríguez, A. M., Ferrusola, C. O., Bolaños, J. M. G., Fernández, L. G., Tapia, J. A., et Peña, F. J. (2011). Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology*, 75(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.004>
- Nina, N., Quispe, C., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Feresín, G. E., Lima, B., Leiva, E., et Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(10), 18144-18167. <https://doi.org/10.3390/molecules201018144>
- Nouvel, P., Djian-Zaouche, J., et Duloquin, L. (2010). Qu'est-ce qu'un organisme modèle? *Biofutur*, 314, 24-28.
- Ojeil, A., El Darra, N., El Hajj, Y., Mouncef, P. B., Rizk, T. J., et Maroun, R. G. (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateau KSARA. *Lebanese Science Journal*, 11(2), 117-131.
- Oroian, M. (2020). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. 10.
- Oršolić, N., Šaranović, A. B., et Bašić, I. (2006). Direct and indirect mechanism (s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta medica*, 72(01), 20-27.
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., et Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*: A ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PROPOLIS. *Mycoses*, 44(9-10), 375-378. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x>
- Ozdal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O., et Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 122, 528-536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.028>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., et Chandra, S. R. (2016). Flavonoids : An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Papachristoforou, A., Koutouvela, E., Menexes, G., Gardikis, K., et Mourtzinis, I. (2019). Photometric Analysis of Propolis from the Island of Samothraki, Greece. The Discovery of Red Propolis. *Chemistry et Biodiversity*, 16(7), e1900146. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900146>
- Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., et Mohan, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, 2(7), 210-215.

- 
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., et Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens : Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, *63*, 233-239.
- Patel, S. (2016). Emerging adjuvant therapy for cancer : Propolis and its constituents. *Journal of dietary supplements*, *13*(3), 245-268.
- Penn, J. S., Tolman, B. L., et Bullard, L. E. (1997). Effect of a Water-Soluble Vitamin E Analog, Trolox C, on Retinal Vascular Development in an Animal Model of Retinopathy of Prematurity. *Free Radical Biology and Medicine*, *22*(6), 977-984. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00479-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00479-0)
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., et Periyasamy, L. (2015). Free Radicals : Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *30*(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., et Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, *16*(2), 359-364.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., et Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, *15*(4), 235-240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>
- Popravko, S. A. (1976). Plant sources of propolis. *Pchelovodstvo*.
- Popravko, S. A. (1978). Chemical composition of propolis, its origin and standardization. *A remarkable hive product: propolis*, 15-18.
- Prior, R. L., Wu, X., et Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Przybyłek, I., et Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*, *24*(11), 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
- Rached, W. (2018). Les antioxydants naturels : Identification et Applications. Thèse de doctorat, Université Oran 1, département de biologie.
- Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., González-Martín, I., Escuredo, O., et Seijo, C. (2017). The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant, color and bactericide characteristics of raw propolis. *Microchemical Journal*, *134*, 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.006>
- Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., et Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis : Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(13), 2363-2370. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4468>
-

- 
- Ristivojevic, P., Trifkovic, J., Andrić, F., et Milojković-Opsenica, D. (2015). Poplar-type Propolis : Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Natural product communications*, 10, 1869-1876. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001117>
- Russo, A., Longo, R., et Vanella, A. (2002). Antioxidant activity of propolis : Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73 Suppl 1, S21-29. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00187-9](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00187-9)
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Righi, A., et Salatino, M. (2011). ChemInform Abstract : Propolis Research and the Chemistry of Plant Products. *Natural product reports*, 28, 925-936. <https://doi.org/10.1039/c0np00072h>
- Salatino, A., Teixeira, É. W., et Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2(1), 33-38.
- Sales, A., Alvarez, A., Areal, M. R., Maldonado, L., Marchisio, P., Rodríguez, M., et Bedascarrasbure, E. (2006). The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1352-1356. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.026>
- Samanta, A., Das, G., et Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, 100(6), 12-35.
- Sanderson, J., McLauchlan, W. R., et Williamson, G. (1999). Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation of the rat lens. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5-6), 639-645.
- Santos, L. M., Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., Barbosa, J. D., Portela, R. D., et Machado, B. A. (2020). Propolis : Types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1369-1382. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10024>
- Saur, F. (2012). V. La zone tempérée. *Licence*, 247-262.
- Sawaya, A. C. H. F., Barbosa da Silva Cunha, I., et Marcucci, M. C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>
- Sawaya, A. C., Tomazela, D. M., Cunha, I. B., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custodio, A. R., et Eberlin, M. N. (2004). Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, 129(8), 739-744.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K. H., et Reichling, J. (2010). Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytotherapy Research*, 24(S1), S20-S28. <https://doi.org/10.1002/ptr.2868>
-

- 
- Seeram, N. P., Henning, S. M., Niu, Y., Lee, R., Scheuller, H. S., et Heber, D. (2006). Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1599-1603.
- Seibert, J. B., Bautista-Silva, J. P., Amparo, T. R., Petit, A., Pervier, P., Dos Santos Almeida, J. C., Azevedo, M. C., Silveira, B. M., Brandão, G. C., de Souza, G. H. B., de Medeiros Teixeira, L. F., et Dos Santos, O. D. H. (2019). Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chemistry*, 287, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.078>
- Sewell, F., Aggarwal, M., Bachler, G., Broadmeadow, A., Gellatly, N., Moore, E., Robinson, S., Rooseboom, M., Stevens, A., Terry, C., et Burden, N. (2017). The current status of exposure-driven approaches for chemical safety assessment: A cross-sector perspective. *Toxicology*, 389, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.018>
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the immune system: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
- Sforcin, J. M., et Bankova, V. (2011). Propolis : Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>
- Sforcin, J. M., Fernandes Jr, A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., et Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 73(1-2), 243-249.
- Sforcin, J. M., Kaneno, R., et Funari, S. R. C. (2002). Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 8, 19-29.
- Sharma, G. N., Gupta, G., et Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 28(2), 139-154. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018022258>
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H., et Hara, H. (2005). Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against In vitro and In vivo Ischemic Neuronal Damage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(2), 201-207. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh078>
- Shoskes, D. A. (1998). Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury : A new class of renoprotective agents: 1. *Transplantation*, 66(2), 147-152.
- Siheri, W., Alenezi, S., Tusiimire, J., et Watson, D. G. (2017). The Chemical and Biological Properties of Propolis. In J. M. Alvarez-Suarez (Éd.), *Bee Products—Chemical and Biological Properties* (p. 137-178). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_7)
-

- Silici, S., et Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silva, H., Francisco, R., Saraiva, A., Francisco, S., Carrascosa, C., et Raposo, A. (2021). The Cardiovascular Therapeutic Potential of Propolis—A Comprehensive Review. *Biology*, 10(1), 27. <https://doi.org/10.3390/biology10010027>
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., et Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis : A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, e206439. <https://doi.org/10.1155/2015/206439>
- Simões-Ambrosio, L. M. C., Gregório, L. E., Sousa, J. P. B., Figueiredo-Rinhel, A. S. G., Azzolini, A., Bastos, J. K., et Lucisano-Valim, Y. M. (2010). The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*, 81(8), 1102-1108.
- Simone-Finstrom, M., et Spivak, M. (2011). *Propolis and bee health : The natural history and significance of resin use by honey bees*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Propolis-and-bee-health%3A-the-natural-history-and-of-Simone-Finstrom-Spivak/14da17368c8cb83b392ecde5ec7e377f76ae4d74/figure/3>
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., et Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828-835. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., et Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, p. 152-178). Elsevier.
- Singleton, V. L., et Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sjögren, E., Abrahamsson, B., Augustijns, P., Becker, D., Bolger, M. B., Brewster, M., Brouwers, J., Flanagan, T., Harwood, M., Heinen, C., Holm, R., Juretschke, H.-P., Kubbinga, M., Lindahl, A., Lukacova, V., Münster, U., Neuhoff, S., Nguyen, M. A., Peer, A. van, ... Langguth, P. (2014). *In vivo* methods for drug absorption – Comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient characterization including food effects. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57, 99-151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.010>
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., et Juszczak, L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research*, 29(5), 416-422. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.949705>

- Souza, R. M., de Souza, M. C., Patitucci, M. L., et Silva, J. F. (2007). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and characterization of bioactive components of two Brazilian propolis samples using a pKa-guided fractionation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11-12), 801-807.
- Spulber, R., Colța, T., Băbeanu, N., et Popa, O. (2017). Chemical diversity of polyphenols from bee pollen and propolis. *AgroLife Scientific Journal*, 6(2), 183-194.
- Stan, L., Mărghitaș, L. A., et Dezmirean, D. (2011). Quality criteria for propolis standardization. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 137-140.
- Stojanović, S., Najman, S. J., Bogdanova-Popov, B., et Najman, S. S. (2020). PROPOLIS: CHEMICAL COMPOSITION, BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY – A REVIEW. *Acta Medica Medianae*, 6.
- Sulaiman, G. M., Al Sammarrae, K. W., Ad'hiah, A. H., Zucchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., et Bagnati, R. (2011). Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(9), 2415-2421. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.060>
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., et Zhang, H. (2015). Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, e595393. <https://doi.org/10.1155/2015/595393>
- Sun, Y. I., Oberley, L. W., et Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Swartz, M. (2010). Hplc Detectors : A Brief Review. *Journal of Liquid Chromatography et Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., et Kakde, R. B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14693>
- Teixeira, E. W., Negri, G., Salatino, A., et Stringheta, P. C. (2010). Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 307-315.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., et Park, Y. K. (2013). Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, e697390. <https://doi.org/10.1155/2013/697390>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

- Usman, U. Z., Bakar, A. A., et Mohamed, M. (2016). Phytochemical screening and comparison of antioxidant activity of water and ethanol extract propolis from Malaysia. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(5), 413-415.
- Uto, Y., Ae, S., Koyama, D., Sakakibara, M., Otomo, N., Otsuki, M., Nagasawa, H., Kirk, K. L., et Hori, H. (2006). Artepillin C isoprenomics : Design and synthesis of artepillin C isoprene analogues as lipid peroxidation inhibitor having low mitochondrial toxicity. *Biorganic et medicinal chemistry*, 14(16), 5721-5728.
- Vacek, J., Klejdus, B., Lojkova, L., et Kubáň, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones : A review. *Journal of separation science*, 31, 2054-2067. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700569>
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J. C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Hernandez, J., et Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food chemistry*, 131(2), 645-651.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., et Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vardar-Ünlü, G., Silici, S., et Ünlü, M. (2008). Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1011-1017.
- Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A., Lira, I. S., López, B. G.-C., Negrão, V., et Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 911-920. <https://doi.org/10.1111/jam.13400>
- Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F. M., et Velazquez, E. F. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1747-1756.
- Vermeulen, N., Parker, J. N., et Penders, B. (2013). Understanding life together : A brief history of collaboration in biology. *Endeavour*, 37(3), 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2013.03.001>
- Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., et Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* Leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.021>
- Wagh, V. D. (2013). Propolis : A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/308249>

- 
- Wali, A. F., Mushtaq, A., Rehman, M. U., Akbar, S., et Masoodi, M. H. (2017). Bee propolis (Bee's glue) : A phytochemistry review. *J. Crit. Rev*, 4, 9-13.
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J., et Sforcin, J. M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects : A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11), 1378-1386.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), I1-1.
- Weis, W. A., Ripari, N., Conte, F. L., Honorio, M. da S., Sartori, A. A., Matucci, R. H., et Sforcin, J. M. (2022). An overview about apitherapy and its clinical applications. *Phytomedicine Plus*, 2(2), 100239. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100239>
- Weisdorf, J. L. (2005). From foraging to farming : Explaining the Neolithic Revolution. *Journal of Economic surveys*, 19(4), 561-586.
- Woisky, R. G., et Salatino, A. (1998). Analysis of propolis : Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>
- Wood, L. G., Gibson, P. G., et Garg, M. L. (2006). A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2057-2066. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2604>
- Wu, J. Q., Kosten, T. R., et Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200-206. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., et Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(4), 3444-3455. <https://doi.org/10.3390/molecules16043444>
- Yonar, M. E., Yonar, S. M., Çoban, M. Z., et Eroğlu, M. (2014). Antioxidant effect of propolis against exposure to chromium in *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*, 29(2), 155-164. <https://doi.org/10.1002/tox.20782>
- Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., et Rotsztein, H. (2018). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332-336. <https://doi.org/10.1159/000491755>
- Zeng, L.-H., Wu, J., Carey, D., et Wu, T.-W. (1991). Trolox and ascorbate : Are they synergistic in protecting liver cells in vitro and in vivo? *Biochemistry and Cell Biology*, 69(2-3), 198-201. <https://doi.org/10.1139/o91-029>
- Zin, N. B. M., Azemin, A., Rodi, M. M. M., et Mohd, K. S. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of stingless bee propolis from different extraction methods. *International Journal of Engineering et Technology*, 7(4), 90-95.
- Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravaliala, M., Kripal, K., Fearnley, J., et Perera, C. O. (2021). Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis : A Review. *Foods*, 10(6), 1360.
-

Zulhendri, F., Ravalia, M., Kripal, K., Chandrasekaran, K., Fearnley, J., et Perera, C. (2021). Propolis in Metabolic Syndrome and Its Associated Chronic Diseases : A Narrative Review. *Antioxidants*, 10, 348. <https://doi.org/10.3390/antiox10030348>

**Site web :**

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=antioxidant%20activity%20of%20propolis>

# **Annexes**

**Annexe 1.** Liste des références des 20 articles sélectionnés.

1. Ahmed, R., Tanvir, E. M., Hossen, M. S., Afroz, R., Ahmmed, I., Rumpa, N.-E.-N., Paul, S., Gan, S. H., Sulaiman, S. A., et Khalil, M. I. (2017). Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2017, 5370545. <https://doi.org/10.1155/2017/5370545>
2. Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., et Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 101, 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>
3. Boisard, S., Le Ray, A.-M., Gatto, J., Aumond, M.-C., Blanchard, P., Derbré, S., Flurin, C., et Richomme, P. (2014). Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1344-1351. <https://doi.org/10.1021/jf4053397>
4. Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo, T. M., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., de Picoli Souza, K., et Dos Santos, E. L. (2017). Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil : Scaptotrigona depilis and Melipona quadrifasciata anthidioides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1038153. <https://doi.org/10.1155/2017/1038153>
5. Bonamigo, T., Campos, J. F., Oliveira, A. S., Torquato, H. F. V., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., de Picoli Souza, K., et Dos Santos, E. L. (2017). Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of Plebeia droryana and Apis mellifera (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. *PloS One*, 12(9), e0183983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183983>
6. Campos, J. F., dos Santos, U. P., Macorini, L. F. B., de Melo, A. M. M. F., Balestieri, J. B. P., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A. L., de Picoli Souza, K., et dos Santos, E. L. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from Melipona orbigny (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 65, 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>
7. Dantas Silva, R. P., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., Carvalho, A. A., Padilha, F. F., Barbosa, J. D. V., et Umsza-Guez, M. A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PloS One*, 12(3), e0172585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>
8. Duca, A., Sturza, A., Moacă, E.-A., Negrea, M., Lalescu, V.-D., Lungeanu, D., Dehelean, C.-A., Muntean, D.-M., et Alexa, E. (2019). Identification of Resveratrol as Bioactive Compound of Propolis from Western Romania and Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), E3368. <https://doi.org/10.3390/molecules24183368>

9. Gülçin, I., Bursal, E., Sehitoglu, M. H., Bilsel, M., et Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(8-9), 2227-2238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053>
10. Ibrahim, M. E. E.-D., et Alqurashi, R. M. (2022). Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109463. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109463>
11. Isla, M. I., Zampini, I. C., Ordóñez, R. M., Cuello, S., Juárez, B. C., Sayago, J. E., Moreno, M. I. N., Alberto, M. R., Vera, N. R., Bedascarrasbure, E., Alvarez, A., Cioccini, F., et Maldonado, L. M. (2009). Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. *Journal of Medicinal Food*, 12(6), 1334-1342. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0286>
12. Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., et Tragoolpua, Y. (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(11), 6991-6995. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6991>
13. Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., et Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(11), 3482-3485. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025>
14. Nina, N., Quispe, C., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Feresín, G. E., Lima, B., Leiva, E., et Schmeda-Hirschmann, G. (2015). Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(10), 18144-18167. <https://doi.org/10.3390/molecules201018144>
15. Ozdal, T., Ceylan, F. D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E. O., et Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 122, 528-536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.028>
16. Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., et Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis : Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2363-2370. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4468>
17. Sulaiman, G. M., Al Sammarrae, K. W., Ad'hiah, A. H., Zucchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., et Bagnati, R. (2011). Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(9), 2415-2421. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.060>

18. Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A., Lira, I. S., López, B. G.-C., Negrão, V., et Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 911-920. <https://doi.org/10.1111/jam.13400>
19. Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., et Li, X. (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(4), 3444-3455. <https://doi.org/10.3390/molecules16043444>
20. Yonar, M. E., Yonar, S. M., Çoban, M. Z., et Eroğlu, M. (2014). Antioxidant effect of propolis against exposure to chromium in *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*, 29(2), 155-164. <https://doi.org/10.1002/tox.20782>

## ملخص

جذبت الأدلة العلمية الناشئة على الخصائص العلاجية للعكبر وخاصة خصائصه المضادة للأكسدة اهتمام الصناعة الصيدلانية ومع ذلك، فإن عدم وجود نظام توحيد معتمد لمراقبة الجودة يمثل عقبة أمام صياغة معيار عالمي لهذا المنتج. الهدف من هذه الدراسة هو تحليل المناهج المعتمدة لتقييم مضادات الأكسدة للعكبر من خلال دراسة وصفية وإحصائية بالإضافة إلى تسليط الضوء على تأثير العديد من العوامل على تكوينه الكيميائي. تم استعراض البيانات المستمدة من 20 منشورًا علميًا تم تحديدها في قاعدة البيانات PubMed وفقًا لمبادئ PRISMA التوجيهية. أظهرت النتائج أن الباحثين غالبًا ما يربطون النشاط المضاد للأكسدة للعكبر بمركباته الفينولية، والتي يتم تقييمها على نطاق واسع مقارنة بالفئات الكيميائية الأخرى. بالإضافة إلى ذلك، أظهر تحليلنا أن شدة القدرة المضادة للأكسدة للعكبر تتأثر إلى حد كبير بتركيبها الكيميائي الذي يتأثر بعدة عوامل غالبًا ما يتجاهلها الباحثون مثل الخصائص الجغرافية النباتية لموقع الحصاد، المناخ، أنواع النحل، ظروف التخزين، اختيار المذيبات وتقنيات الاستخلاص والتحليل. تشير نتائجنا إلى أنه من المهم جدًا إجراء تحليل معمق للدراسات التي تم إنجازها في هذا المجال العلمي، تحليل المعايير والأنشطة البيولوجية الأخرى، النظر في العوامل الرئيسية للتغير الكيميائي ودراسة التفاعلات بين جزيئات العكبر النشطة بيولوجيًا من أجل فهم خصائصها المضادة للأكسدة بشكل أفضل.

**الكلمات المفتاحية:** النشاط المضاد للأكسدة، عكبر، PRISMA، دراسة منهجية، التركيبة الكيميائية.

## Résumé

Les preuves scientifiques émergentes sur les propriétés thérapeutiques de la propolis et surtout son potentiel antioxydant ont suscité l'intérêt de l'industrie pharmacologique. Cependant, le manque de standardisation et de système certifié de contrôle de la qualité constitue un obstacle dans la formulation d'une norme universelle pour ce produit apicole. L'objectif de notre étude était d'analyser à travers une étude descriptive, comparative et statistique, les différentes approches adoptées pour la valorisation du potentiel antioxydant de la propolis et de mettre en évidence l'influence de nombreux facteurs sur sa composition chimique. Les données de 20 publications scientifiques identifiées sur la base PubMed, ont été examinées selon les directives de PRISMA. Les résultats ont montré que les chercheurs associent souvent l'activité antioxydante de propolis à ses composés phénoliques qui sont largement valorisés par rapport à d'autres classes chimiques. De plus, notre analyse a montré que l'intensité de la capacité antioxydante de la propolis est largement influencée par sa composition chimique qui est très variable et dépend de plusieurs facteurs qui sont souvent négligés par les chercheurs comme les caractéristiques phytogéographiques du site de récolte, le climat et l'espèce d'abeille, les conditions de conservation, le choix des solvants et des techniques d'extraction et d'identification. Nos résultats suggèrent qu'il est très important d'analyser en profondeur les études réalisées dans cet axe de recherche, d'analyser d'autres critères et activités biologiques, de considérer les facteurs clé de variabilité chimique et d'étudier les interactions entre les molécules bioactives de la propolis afin de mieux comprendre son potentiel antioxydant.

**Mots clés :** Activité antioxydante, propolis, PRISMA, étude systématique, composition chimique.

## Abstract

The emerging scientific evidence on the therapeutic properties of propolis and especially its antioxidant potential has attracted the interest of the pharmacological industry. However, the lack of standardization and a certified quality control system is an obstacle in the formulation of a universal standard for this product. The objective of our study was to analyze through a descriptive, comparative and statistical study, the different approaches adopted in the study of the antioxidant potential of propolis and to highlight the influence of many factors on its chemical composition. Data from 20 scientific publications identified on the PubMed database were reviewed according to PRISMA guidelines. The results showed that researchers often associate the antioxidant activity of propolis with its phenolic compounds, which are widely valued compared to other chemical classes. In addition, our analysis has shown that the intensity of the antioxidant capacity of propolis is largely influenced by its chemical composition which is highly variable and depends on several factors that are often overlooked by researchers such as phytogeographic characteristics of the harvesting site, the climate and the bee species, storage conditions, choice of solvents, extraction and identification techniques. Our results suggest that it is very important to analyze in-depth the studies carried out in this research area, to investigate other criteria and biological activities, consider the key factors of chemical variability and study the interactions between the bioactive molecules of propolis to better understand its antioxidant potential.

**Key words:** Antioxidant activity, propolis, PRISMA, systematic study, chemical composition.