



**HAL**  
open science

# La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique

Florence Potier

► **To cite this version:**

Florence Potier. La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2014.  
hal-01770685

**HAL Id: hal-01770685**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01770685v1>**

Submitted on 29 Mar 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**

**2014**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquemen

le mardi 3 Juin 2014, sur un sujet dédié à :

**LA PROPOLIS, PROPRIETES  
ET INTERET THERAPEUTIQUE**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **POTIER Florence**

née le 11/10/1989

## **Membres du Jury**

Président : GIBAUD Stephane

Juges : TROCKLE Gabriel

CLAUSSET Martine

SONNTAG Jean-Claude

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Gabriel TROCKLE pour avoir su me guider dans la construction de cette thèse, et pour avoir dès le début accordé son intérêt au sujet que j'ai choisi. C'est grâce à ses conseils éclairés que j'ai pu présenter un travail que j'espère aussi complet et cohérent que le souhaitera le lecteur.

Un grand merci à Monsieur Stéphane GIBAUD, pour avoir accepté de présider à la présentation de cette thèse et m'avoir permis de réaliser ce travail qui me tenait tant à cœur.

Je voudrais remercier tout particulièrement Monsieur Jean-Claude SONNTAG pour avoir suscité mon intérêt envers la naturopathie, notamment via l'aromathérapie et la phytothérapie. Sa maîtrise de ces médecines naturelles a éveillé chez moi l'envie d'étudier à mon tour l'apithérapie, par le biais de cette thèse.

C'est au contact de Madame Martine CLAUSSET que j'ai pu côtoyer de plus près le monde de l'apiculture. En m'offrant beaucoup de son temps et en partageant ses connaissances avec moi, Madame Clausset m'a permis de commencer ma thèse avec une idée bien plus précise de ce que je souhaitais y apporter, et pour cela, je tiens à la remercier chaleureusement.

Merci encore à Monsieur Paul SCHWEITZER, Directeur de la CETAM, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire ainsi que l'accès à sa documentation.

Je tiens enfin à remercier ma famille pour son soutien, ainsi que mon compagnon Gautier AVELINE pour sa complicité dans la partie informatique de ce travail.

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2013-2014**

***DOYEN***

Francine PAULUS

***Vice-Doyen***

Francine KEDZIEREWICZ

***Directeur des Etudes***

Virginie PICHON

***Président du Conseil de la Pédagogie***

Bertrand RIHN

***Président de la Commission de la Recherche***

Christophe GANTZER

***Président de la Commission Prospective Facultaire***

Jean-Yves JOUZEAU

***Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle***

Béatrice FAIVRE

***Responsable ERASMUS :***

Francine KEDZIEREWICZ

***Responsable de la filière Officine :***

Francine PAULUS

***Responsables de la filière Industrie :***

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

***Responsable du Collège d'Enseignement  
Pharmaceutique Hospitalier :***

Jean-Michel SIMON

***Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :***

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

***Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :***

Raphaël DUVAL

***DOYENS HONORAIRES***

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS EMERITES***

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS HONORAIRES***

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

***MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES***

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

## **ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

## **Faculté de Pharmacie**

## **Présentation**

### **ENSEIGNANTS**

*Section  
CNU\**

*Discipline d'enseignement*

## **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

## **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI ☞	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND ☞	87	<i>Environnement et Santé</i>
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>



Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

***MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS***

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

## **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

## **Faculté de Pharmacie**

## **Présentation**

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>

Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie</i>
Francine KEDZIEREWICZ	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Faten MERHI-SOUSSI	87	<i>Hématologie</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Christine PERDICAKIS	86	<i>Chimie organique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Gabriel TROCKLE	86	<i>Pharmacologie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
Colette ZINUTTI	85	<i>Pharmacie galénique</i>

***PROFESSEUR ASSOCIE***

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD

11      *Anglais*

⌘ *En attente de nomination*

*\*Disciplines du Conseil National des Universités :*

*80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle*

*11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

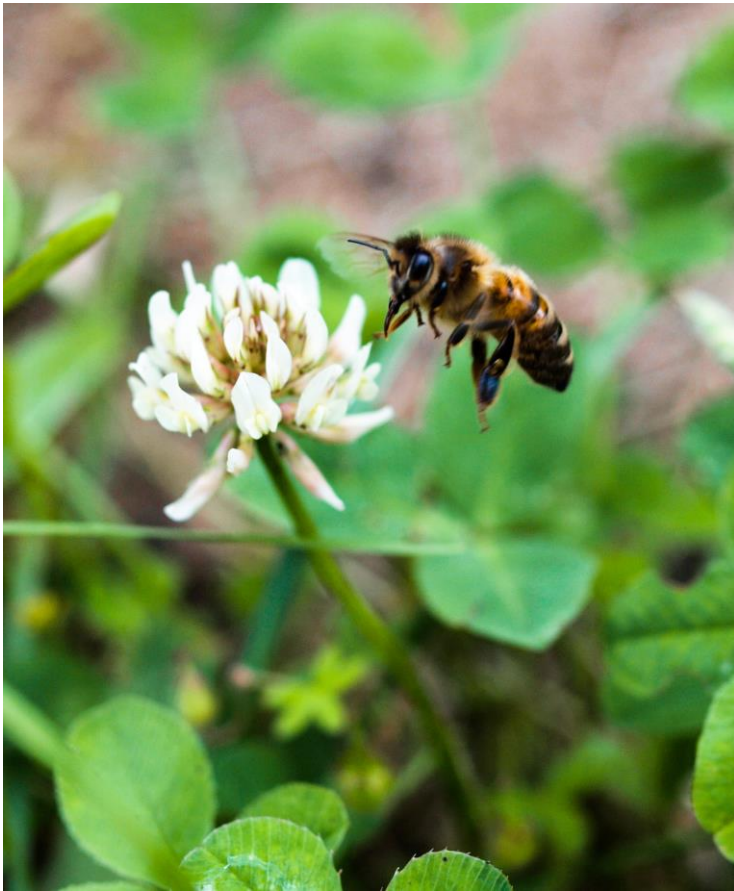
**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque





# LA PROPOLIS

PROPRIETES ET INTERET THERAPEUTIQUE

## RESUME

L'apithérapie, une branche de l'arsenal thérapeutique, consiste à utiliser des produits de la ruche pour soigner certaines pathologies. Voici un recensement de son origine et de ses propriétés physico-chimiques ainsi que thérapeutiques. Cette étude se donne pour but de rassembler toutes les données de la littérature scientifique en l'état actuel pour qui souhaite connaître plus en détail cette substance résineuse riche en composés actifs sur la santé humaine.

Florence Potier

## Table des matières

Introduction : la propolis.....	15
1. Première partie : la propolis au sein de la ruche.....	18
1.1. Production par les arbres : aspect botanique de la propolis.....	19
1.2. L'abeille : <i>apis mellifera</i> .....	20
Classification.....	20
1.2.1. Anatomie .....	21
1.2.2. Structure sociale : la ruche .....	25
1.3. Diversité des abeilles productrices de propolis .....	36
1.4. Collecte de la propolis par l'Homme .....	37
1.5. Extraction et purification .....	38
2. Seconde partie : propriétés physico-chimiques de la propolis .....	42
2.1. Description physique .....	43
2.1.1. Composition.....	43
2.1.2. Méthodes d'analyse physico-chimiques.....	48
2.2. Conclusion des analyses physico-chimiques.....	53
2.3. Variation de la propolis dans sa composition et son activité biologique .....	53
2.4. Conservation.....	54
3. Troisième partie : Propriétés thérapeutiques de la propolis .....	55
3.1. Influence sur les paramètres sériques.....	56
3.2. Effet antibactérien.....	58
3.2.1. Le Staphylocoque.....	61
3.2.2. Le Streptocoque.....	64
3.2.3. Les bacilles .....	65
3.2.4. Les Proteus.....	66
3.2.5. Les Pseudomonas.....	66
3.2.6. Les <i>Listeria</i> .....	66
3.2.7. Les Salmonella .....	67
3.2.8. Les <i>Clostridium</i> .....	71
3.2.9. <i>Escherichia coli</i> .....	71
3.2.10. Les Enterocoques.....	73
3.2.11. <i>Helicobacter pylori</i> .....	74
3.2.12. Autres.....	75
3.3. Effet antiviral .....	76
3.3.1. <i>Influenzavirus A</i> :.....	77
3.3.2. Virus VIH .....	78
3.3.3. <i>Herpes simplex virus</i> .....	79

3.3.4.	<i>Adenovirus</i> :	81
3.4.	Effet antifongique	81
3.4.1.	<i>Candida</i>	81
3.4.2.	Effet antifongique de la propolis sur des champignons pathogènes autres que <i>Candida</i>	85
3.5.	Effet antiparasitaire	88
3.5.1.	<i>Leishmania</i>	88
3.5.2.	<i>Trichomonas vaginalis</i>	91
3.5.3.	Trypanosome	92
3.5.4.	<i>Plasmodium</i>	95
3.5.5.	<i>Giardia intestinalis</i>	95
3.6.	Effet Analgésique	96
3.7.	Effet anesthésique local	97
3.8.	Effet antioxydant	98
3.9.	Effet anti-inflammatoire	101
3.10.	Effet immunomodulateur	104
3.11.	Effet cicatrisant	108
3.12.	Restauration des nerfs lésés	109
3.13.	Régénération du tissu osseux	110
3.14.	Effet antioncotique	110
3.15.	Effet protecteur de la muqueuse gastrique	115
3.16.	Effet anti-UV	115
3.17.	Effet laxatif	116
3.18.	Effet hépatoprotecteur	117
3.19.	Effet sur le muscle lisse	117
3.20.	Effets secondaires	117
3.21.	Doses thérapeutiques de la propolis	119
Conclusion		120
Bibliographie		124
Annexes		140
Table des illustrations		146



---

*Table des abréviations*

---

- ALT : Alanine Aminotransférase
- AST : Aspartate aminotransférase
- BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide. Composé utilisé en chimie organique pour lier un groupe triméthylsilyle –Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> sur un groupe fonctionnel labile afin de protéger ce dernier lors de réactions d'analyse ou de synthèse ultérieures
- CAPE : Ester phényléthylique d'acide caféique, Caffeic Acid Phenethyl Ester
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- CK : Créatine Kinase
- CMB : Concentration Minimale Bactéricide
- CMF : Concentration Minimale Fongicide
- CMI : concentration Minimale Inhibitrice
- CMI50, CMI90 : Concentration Minimale Inhibitrice nécessaire pour une inhibition de 50% ou de 90% du développement de l'organisme étudié.
- CoNS : Staphylocoque à coagulase négative, Coagulase Negative Staphylococcus
- CPI : Méthode de collection intelligente de la propolis, Intelligent Collector of Propolis
- DAD : Détecteur à barrettes de diodes, Diode Array Detector
- DMSO : Diméthylsulfoxyde, solvant fréquemment utilisé pour l'extraction de composés issus des plantes
- EASI-MS : Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry
- ESI-MS: Spéctrométrie de masse avec sonde d'insertion directe, ElectroSpray Ionisation with Mass Spectrometry
- Et al. : « et les autres », abréviation latine de « et alii »
- HPLC: Chromatographie liquide haute performance, Hight Performance Liquid Chromatography
- LDH: Lactate déshydrogénase
- MAE: Extraction Assistée par Micro-ondes, Microwaves Assisted Extraction
- MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*
- PCA : Analyse en Composantes Principales, Principal Components Analysis
- SOD : SuperOxyde Dismutase
- UE: Extraction par Ultrasons, Ultrasonic Extraction
- UFC: Unité Formant Colonie
- UV: UltraViolets

# Introduction : la propolis

La propolis est une substance produite par la ruche, et dont les propriétés thérapeutiques sont très variées et potentiellement utiles à l'homme. Marie-Paule Rolin (1) et Yves Donatieu (2) s'accordent à la définir comme une « Substance résineuse, gommeuse ou balsamique, de consistance visqueuse, recueillie par les abeilles sur certaines parties des végétaux (bourgeons, écorce). »

Ainsi les abeilles récoltent la propolis. De quelle utilité leur est cette matière ? Après incorporation d'enzymes et de substances cireuses, elle leur sert de ciment, de mastic, de vernis. La propolis constitue une barrière de défense lorsqu'elle est appliquée en arrière du trou de vol, à l'entrée de la ruche. Elle permet aussi de colmater et d'obturer les fissures et les fentes de la ruche, cela afin de la rendre plus hermétique. La propolis permet de réparer les rayons et de les consolider. Elle permet de vernissage de surfaces présentant des aspérités, d'enduire les rayons pour les aseptiser, et même d'embaumer les cadavres de petits animaux ayant pénétré dans la ruche et de taille trop importante pour que les abeilles puissent s'en débarrasser en les évacuant par le trou de vol.

La propolis a donc une grande importance pour les abeilles. Mais loin de s'en tenir à ce rôle, elle revêt également une certaine utilité pour l'être humain. Cette utilité est aussi bien domestique que thérapeutique.

L'utilisation probable la plus lointaine de la propolis remonterait aux prêtres de l'Égypte Antique. Les Égyptiens auraient, à l'instar des abeilles, utilisé la propolis pour des opérations de momification. (3)

En revanche, il est certain que cette résine est utilisée au cours de la Grèce Antique. C'est Aristote qui inventera ce terme « propolis » que nous utilisons encore aujourd'hui : il signifie « en avant » (pro) « de la cité » (polis). En effet, il n'aura pas échappé à l'œil du fameux philosophe que les abeilles utilisaient cette substance pour protéger le trou de vol de leur colonie. Galien en fera mention plus tard dans ses traités.

Les auteurs anciens, perplexes face à la multitude de couleurs et d'aspects qu'offre la propolis, pensaient d'abord qu'il s'agissait de multiples produits de la ruche. Mais il devient alors clair qu'il s'agit bien d'une seule et même substance.

Au cours de la Grèce Antique, on utilise donc la propolis sur des enflures, des abcès, des ulcères, des furoncles...le domaine est celui des affections de la peau.

Les Persans, eux, l'utilisaient pour extirper les épines et pointes de flèches entrées dans la chair, car la propolis rendait cette opération plus aisée.

Les Incas se servaient de la propolis pour lutter contre les infections lors desquelles apparaissait de la fièvre.

Son usage en Europe devient toutefois assez méconnu entre l'Antiquité et la fin du siècle dernier, où elle connaît un renouveau lors de la guerre des Boers, qui eut lieu en l'an 1900, en Afrique. Le manque de moyens médicaux fit germer l'idée dans le camp anglais d'utiliser la propolis pour guérir les plaies des blessés, et cette idée fut couronnée de succès.

Face aux progrès de la chimie, elle tombe alors en désuétude. Elle garde une réputation, en médecine populaire, de cure contre les affections cutanées (plaies, abcès...) et les rhumatismes, sous forme d'emplâtres. Sous forme de baume, elle est parfois utilisée contre les plaies, les hémorroïdes et les cors aux pieds. Elle combattra la toux sous forme de fumigation et les affections des voies respiratoires sous forme d'inhalations (sous cette dernière forme, on lui confère même des propriétés contre les maux de dents).

Elle garde également un usage domestique, car elle permet de fabriquer un vernis résistant et brillant qui servira entre autres à la lutherie, dans la confection des violons. Elle remplace le mastic à greffer, obture les fissures des fûts, évite la rouille des tuyaux... une liste exhaustive de ces divers usages serait bien difficile à mettre en place tant l'inventivité humaine tire profit des substances que lui procure la nature.

Cependant, le dédain de nos sociétés pour les propriétés thérapeutiques de la propolis pourrait n'être que temporaire. En effet, l'évolution actuelle de la recherche pharmaceutique fait la part belle aux médicaments tirés des substances naturelles.

Longtemps, la découverte de médicaments était empirique. On utilisait des produits réputés pour leur efficacité sans connaître les mécanismes de leur activité sur l'organisme. Puis, avec l'évolution de la biochimie et de la pharmacologie, la découverte de nouveaux médicaments est devenue une affaire de récepteurs et de ligands. Cette évolution a permis de créer de toutes pièces des entités chimiques dont la structure a été étudiée pour se fixer à un site biochimique précis. De nouveaux médicaments sont ainsi apparus sur le marché, mais ils deviennent de moins en moins nombreux à apporter de réelles avancées au domaine pharmaceutique. Pour avancer, la recherche pharmaceutique doit se tourner vers de nouvelles techniques. La galénique, de plus en plus pointue, permet de trouver de nouvelles façons d'administrer un produit en contrôlant mieux son efficacité et en diminuant ses effets secondaires. Mais la recherche pharmaceutique a maintenant de nouveaux défis à relever :

La thérapie génique consistera à utiliser des gènes pour soigner certaines maladies. Les biotechnologies vont allier le domaine de la biologie à celui de la microbiologie, de la génétique, de l'informatique... l'apparition de molécules-guides commence à permettre d'amener des molécules toxiques vers leur lieu d'action. Le nanomonde s'oriente vers des nanotubes qui ont pour but d'introduire des molécules directement sur le site voulu, de la même manière que les nanovecteurs, un projet consistant à utiliser de mini-têtes chercheuses pour guider ces molécules. Enfin, la thérapie cellulaire devrait permettre de remplacer des cellules malades par des cellules saines.

Tous ces axes constituent une promesse d'avenir pour le domaine pharmaceutique, mais ils n'en sont qu'à leurs balbutiements. Ainsi, les médicaments extraits de la nature reviennent sur le devant de la scène. Des scientifiques et des pharmaciens, comme MM. Jean-Marie Pelt

ou Jacques Fleurentin, pointent leur efficacité prometteuse dans le domaine de l'ethnopharmacologie sans pour autant perdre de vue leur importance pour nos sociétés occidentales. Mark Plotkin, dans son ouvrage *Les médicaments du futur sont dans la nature*, développe clairement la thèse que j'évoque donc ici : l'évolution de la recherche pharmaceutique, avant de pouvoir jouir de technologies plus avancées, passera par une redécouverte des substances thérapeutiques que peut nous fournir la nature.

Les produits de la ruche (Cire, miel, venin, gelée royale, propolis) ont cette particularité qu'ils ont tous une utilité thérapeutique pour l'homme. Parmi ces produits, la propolis semble remarquablement prometteuse. En effet, on lui a découvert des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques, antiparasitaires, analgésiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, immunostimulantes, cicatrisantes et même antioncotiques. Il conviendra de ne pas tomber dans le même excès qu'a subi la baie de Goji, qui à force d'être présentée comme la panacée, a fini par perdre en crédibilité. Ce travail a pour objectif de recenser les réelles propriétés démontrées de la propolis et de mettre en relief les utilités que ces propriétés ont sur le plan thérapeutique. Y seront également développés son origine, sa composition, ses méthodes d'analyse physico-chimiques et sa place dans le marché pharmaceutique actuel.

# **1. Première partie : la propolis au sein de la ruche**

## 1.1. Production par les arbres : aspect botanique de la propolis

Avant de devenir la propolis dont nous allons traiter, la substance que récoltent les abeilles se trouve sur les arbres, sous forme de résine. Cette résine se trouve présente sur les bourgeons, jeunes rameaux, blessures de certains arbres et arbustes... elle a une utilité pour l'arbre qui consiste déjà en certaines propriétés que l'on retrouve plus tard dans la propolis. En effet, elle protège des attaques des micro-organismes. Elle a également un effet répulsif sur les insectes.

Les propolis les plus étudiées sont la propolis européenne, issue majoritairement des peupliers, la propolis verte du Brésil, issue de *Baccharis dracunculifolia*, et la propolis rouge dont la source est *Dalbergia ecastophyllum*. A 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. (4)

Les propolis brésiliennes sont très largement étudiées, car le Brésil est un fort pays pourvoyeur de propolis. On y retrouve trois sortes principales de cette résine : la propolis verte, la propolis rouge et la propolis jaune. (5)

Nous reviendrons plus tard sur la grande variabilité de la propolis. Sa fraction polyphénolique, qui varie beaucoup d'un échantillon à l'autre, permet d'établir une sorte d'empreinte spécifique qui donne la possibilité d'identifier l'origine botanique de la propolis étudiée.

Type de propolis	Origine géographique	Origine botanique	Principaux constituants
<b>Peuplier Ambrée à Brune</b>	Europe, Amérique du Nord, régions non tropicales de l'Asie, Nouvelle-Zélande	<i>Populus spp.</i> Et principalement <i>P. nigra L.</i>	Flavones, flavanones, acides phénols et ses esters et sesquiterpènes
<b>Verte du Brésil</b>	Zone tropicale du Brésil	<i>Baccharis spp.</i> Principalement <i>B. dracunculifolia DC.</i>	Dérivés prénylés de l'acide coumarique Acides diterpéniques Lignanes
<b>Bouleau</b>	Nord de la Russie	<i>Betula verrucosa</i>	Flavones, flavonols, flavanones et sesquiterpènes
<b>Propolis rouge</b>	Cuba, Brésil, Mexique	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Isoflavones, isoflavanes, flavonoïdes et benzophénones isoprénylées
<b>Propolis rouge</b>	Cuba, Venezuela	<i>Clusia rosea</i>	Isoflavones, isoflavanes, flavonoïdes et benzophénones isoprénylées
<b>Méditerranéenne</b>	Sicile, Grèce, Malte, Crête, Turquie	Famille des Cupressaceae	Acides diterpéniques et principalement de type labdane
<b>Pacifique</b>	Zone pacifique (Taïwan, Okinawa, Indonésie)	<i>Macaranga tanarius</i>	Prényl-flavanones

Tableau 1

D'après les travaux de N. Cardinault, M-O Cayeux et P. Percie du Sert (4)

## 1.2. L'abeille : *apis mellifera*

### Classification

L'abeille domestique (nom commun), ou *Apis mellifera*, appartient au :

- Règne des animaux
- Sous-règne des métazoaires
- Division des triploblastiques
- Sous-division des deuterostomes
- Super-embranchement des arthropodes
- Embranchement des mandibulates
- Super-classe des hexapodes, qui possèdent six pattes

- Classe des insectes
- Sous-classe des insectes ailés
- Infra-classe des endoprétygotes
- Super-ordre des mécoptéroïdes
- Ordre des hyménoptères, qui possèdent quatre ailes membraneuses
- Sous-ordre des apocrites
- Groupe des aculéates, qui possèdent un porte-aiguillon
- Super-famille des apoïdés
- Famille des apidés
- Sous-famille des apinés
- Tribu des Apis (6)

### 1.2.1. Anatomie

#### 1.2.1.1. Tête

La tête de l'abeille comporte des yeux : trois ocelles, qui sont des yeux simples permettant d'analyser l'intensité lumineuse, ainsi que deux yeux composés, qui comportent entre 4000 et 5000 facettes. Leur champ de vision couvre 360°.

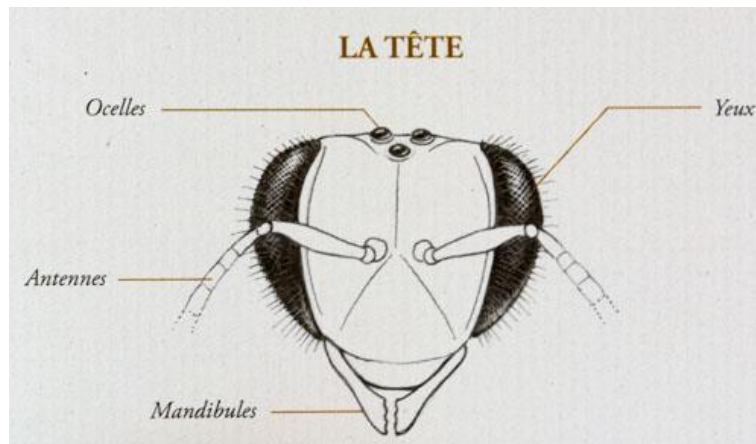


Figure 1: schéma de la tête de l'abeille (7)

On y trouve aussi les antennes, organe sensoriel divisé en trois segments, qui sont le scape (assure la liaison avec la tête), le pédicelle (articulation) et le flagelle (élément terminal). Ces antennes donnent des informations olfactives, gustatives et auditives à l'abeille et la renseignent sur la notion du temps.

L'appareil buccal est constitué de puissantes mandibules, de maxilles et de palpes labiaux, qui guident eux-même la langue rétractable. Cette langue se termine par un cuilleron, et elle permet l'aspiration des liquides : nectar, miellat, eau... ainsi que la trophallaxie, qui consiste en un échange de nourriture contenu dans le jabot des abeilles.



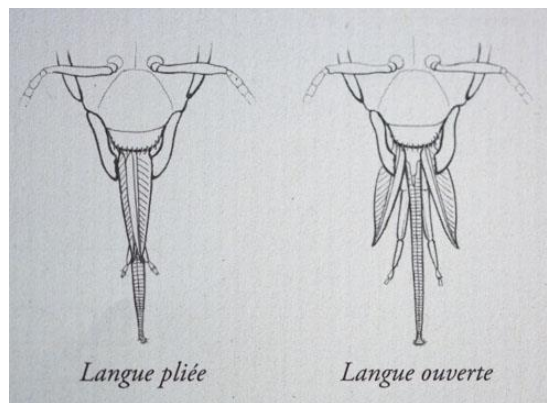


Figure 2: appareil buccal (7)

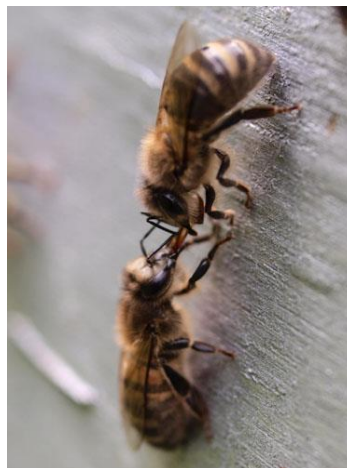


Figure 3: Deux ouvrières pratiquant la trophallaxie (Photographie Potier Florence)

### 1.2.1.2. Thorax

Aussi nommé le corselet, le thorax de l'abeille est la partie du corps sur laquelle s'insèrent les éléments moteurs : pattes et ailes.

Les pattes ne se limitent toutefois pas à leur fonction motrice, et peuvent servir à la collecte du pollen, de brosses permettant d'ôter les grains de pollen de la tête ou de l'abdomen de la butineuse, mais aussi de peigne à antennes.

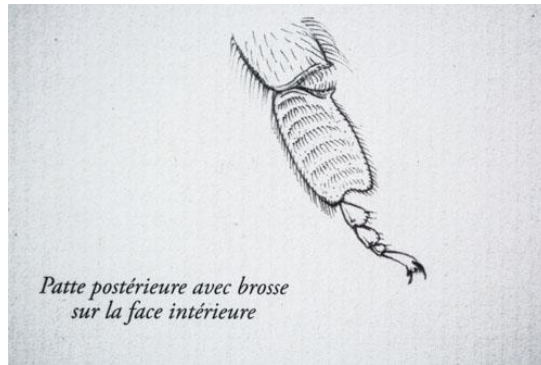


Figure 4: patte postérieure avec brosse sur la face intérieure (7)

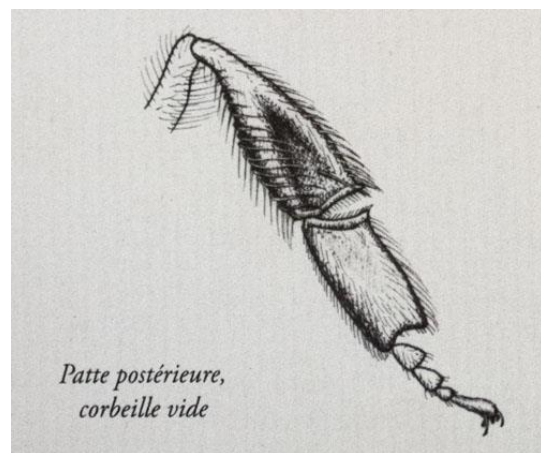


Figure 5: patte postérieure, corbeille vide (7)

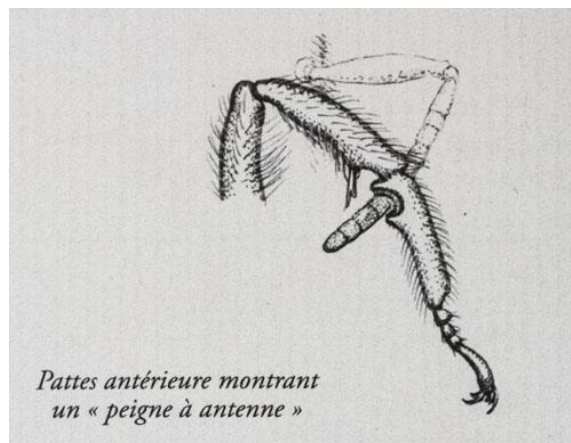


Figure 6: patte antérieure montrant un "peigne à antennes" (7)

Les ailes sont au nombre de quatre, divisées en deux paires. Une série de crochets permet leur fixation pour un vol stable. Ces ailes sont nervurées et sont capables de plusieurs centaines de battements par minute.

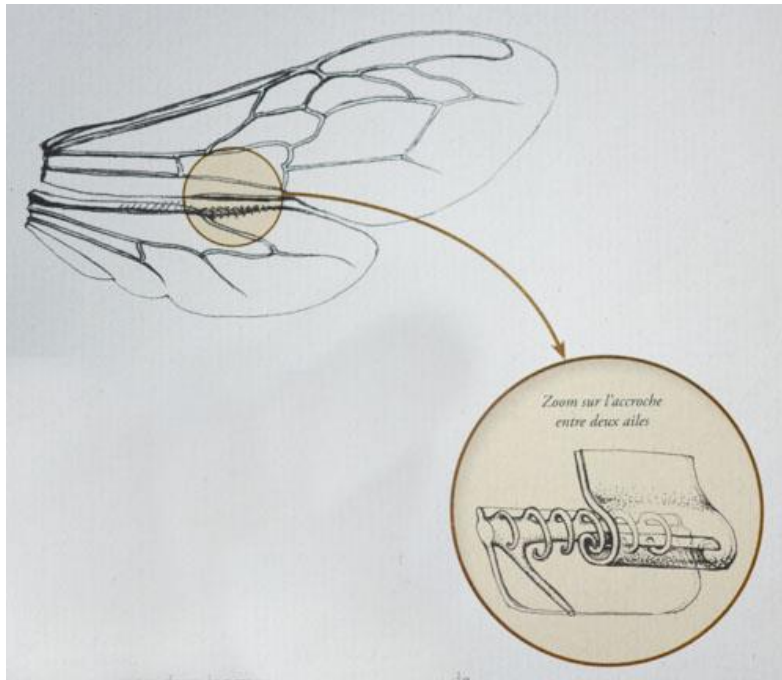


Figure 7: schéma d'une aile d'abeille (7)

### 1.2.1.3. L'abdomen

Il est composé d'un premier segment attaché au thorax suivi de six autres. Des membranes souples entre les plaques de chitine qui les composent permettent une certaine souplesse à l'abeille.

On y trouve notamment l'essentiel des organes composant le tube digestif ainsi que la glande à venin.

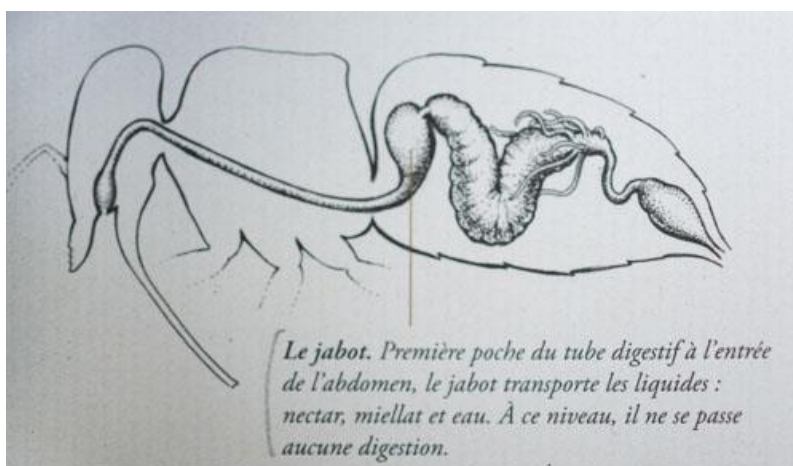


Figure 8: le système digestif (7)

#### 1.2.1.4. *Système glandulaire*

Il se situe à de nombreux niveaux chez l'abeille, que ce soit au niveau de la tête ou du corps. Les glandes hypopharyngiennes, dans la tête, produisent la gelée royale, ainsi que des enzymes ou des phéromones. La partie ventrale de l'abdomen contient les glandes cirières, qui comme leur nom l'indique, permettent la production de cire. A la partie postérieure de l'abdomen se situe la glande de Nasanov, qui sécrète une phéromone de regroupement. La glande à venin, quant à elle, se trouve à la partie postérieure de l'abdomen, et chez les femelles uniquement.

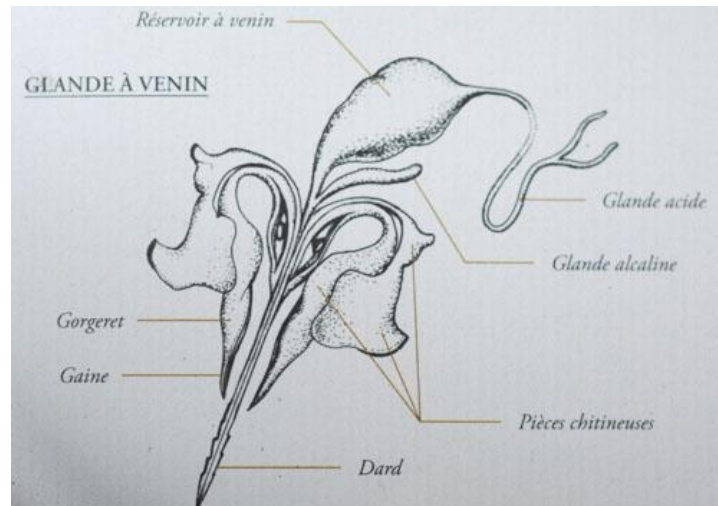


Figure 9: glande à venin (7)

#### 1.2.2. *Structure sociale : la ruche*

##### 1.2.2.1. *Organisation de la ruche*

Une ruche est constituée de 7 à 33 rayons eux-mêmes constitués de cellules, les alvéoles, qui prennent la forme de prismes hexagonaux légèrement inclinés vers le haut afin d'éviter que leur contenu ne tombe. Ces alvéoles sont rigoureusement calibrés à 5,3mm de diamètre pour donner environ 830 cellules au dm<sup>2</sup>. Les cellules de faux-bourçons, bâties au printemps, sont un peu plus grosses, avec un diamètre de 6,9mm. Les cellules royales, quant à elles, sont très proéminentes, elles pendent vers le bas où se trouve leur ouverture. (6)

La ruche est une colonie pérenne, c'est-à-dire qu'elle peut durer plusieurs années. Elle compte 50 000 à 60 000 abeilles réparties en trois castes : la reine, les mâles, ou faux-bourçons, au nombre de 1000 à 2000 individus, et 40 000 à 60 000 ouvrières.

La ruche se situe généralement dans une cavité comme un tronc d'arbre, une cheminée ou un vieux mur présentant de grandes aspérités.

Voici comment s'organise un rayon (8) (9):

- En haut, et descendant vers le bas sur les côtés, on trouve les alvéoles à miel. Les alvéoles à miel situées le plus en bas sont celles où le miel est encore trop liquide ;

elles sont encore ouvertes. Les abeilles les operculeront lorsque le miel, ayant perdu de son eau, obtient la consistance souhaitée. Cet opercule de cire est alors assez mince et présente une légère dépression en son centre.



Figure 10: Des alvéoles à miel (Photographie Potier Florence)

- On trouve du pollen dans des cellules peu nombreuses et généralement non operculées. Il est facile de repérer ce pollen, qui est une substance colorée et opaque.



Figure 11: Des alvéoles à pollen (Photographie Potier Florence)

- Au milieu du rayon se trouve le couvain. La reine dépose ses œufs en commençant par le centre et en décrivant une spirale jusqu'à la périphérie. Lorsque les larves ont éclos et que les cellules sont vides, la reine recommence la ponte en suivant le même schéma.
- Dispersées parmi les cellules du couvain destinées à recevoir les ouvrières, on trouve des cellules légèrement plus grandes : ce sont celles des faux-bourdon.



Figure 12: Une cellule de faux-bourdon (à gauche), disposée à côté d'une alvéole d'ouvrière (Photographie Potier Florence)

- Au début de l'été, on peut trouver des cellules plus grandes, de forme oblongue, formant une saillie tombante : ce sont les cellules royales, qui recevront des larves de reines.





Figure 13: Organisation d'un cadre de ruche, avec le couvain au centre et les alvéoles à miel en périphérie. (Photographie Potier Florence)

La ruche possède un trou de vol qui en constitue l'entrée. Ce trou de vol est protégé par des sentinelles et est étréci à l'aide de la propolis, ce qui le rend plus facilement défendable par les habitantes de la colonie.

#### **1.2.2.2. Les castes**

La vie d'une ruche s'organise autour d'une structure sociale qui réunit trois types de castes :

- La reine. Unique au sein d'une ruche, c'est la seule femelle fertile qui donne naissance à toutes les autres abeilles de la colonie. Elle exerce un contrôle sur la colonie en diffusant des phéromones, qui ont la particularité d'inhiber le développement des caractéristiques sexuelles des ouvrières. Elle se reconnaît principalement à son abdomen beaucoup plus allongé que celui d'une ouvrière.
- Le faux-bourdon. Il s'agit du mâle, il n'a qu'une seule et unique fonction : féconder les reines lorsque vient la période d'accouplement. Il ne butine pas et ne participe pas aux travaux nécessaires au fonctionnement de la ruche. Il se reconnaît par sa taille légèrement supérieure à celle d'une ouvrière et à ses yeux plus développés.
- L'ouvrière, ou l'unité de base de la ruche. Il s'agit d'une femelle non fertile qui va accomplir, tout au long de sa vie, les différentes tâches qui permettent la vie de la colonie.

### 1.2.2.3. Développement et rôle social des différentes castes

#### 1.2.2.3.1. La reine



Figure 14: La reine. (Photographie Potier Florence)

Les œufs de la reine sont déposés dans des cellules royales, qui forment des protubérances au bas de la ruche. La larve est nourrie exclusivement de gelée royale et éclot seulement 16 jours après la ponte. Son régime exclusif à base de gelée royale lui permet de développer ses caractéristiques sexuelles, et à l'inverse, inhibe certaines structures spécifiques des ouvrières comme les corbeilles à pollen. L'œuf éclot au bout de trois jours avant de devenir une larve pour cinq jours et demie, puis suite à un repos de deux jours, la reine devient une larve pendant une journée avant d'entamer sa métamorphose en insecte parfait en trois jours. C'est alors qu'elle sort de son alvéole.

Elle devra ensuite tuer les autres reines non écloses, le plus souvent au nombre de deux, à l'aide de son dard. C'est donc la première née qui sera la seule survivante. En effet, la reine, à l'inverse des ouvrières qui possèdent un dard cranté, est pourvue d'un dard lisse qui lui permet de piquer plusieurs fois sans que cela n'entraîne sa mort.

Il peut arriver qu'une colonie perde sa reine, et en fasse naître une nouvelle en nourrissant à la gelée royale une larve du couvain.

La reine se reconnaît des autres abeilles à son abdomen plus long et à ses ailes plus courtes. Ses pattes ont un ton plus jaune que celles des ouvrières et sa trompe est plus courte. Elle vit en moyenne 4 à 5 ans.

Elle possède une paire d'ovaires comportant chacun 180 ovarioles, alors que les ouvrières n'en possèdent que de 2 à 12. Elle se sert des phéromones qu'elle diffuse pour inhiber la croissance des ovaires des ouvrières, pour les pousser à la nourrir, la reine étant incapable de se nourrir elle-même, mais aussi pour attirer les butineuses à la ruche et les faux-bourçons lors du vol nuptial.

Une fois fécondée lors de ce vol, les spermatozoïdes vont emprunter l'oviducte jusqu'au vagin pour être stockés dans la spermathèque pendant 4 à 5 ans, c'est-à-dire toute la durée de sa vie. C'est là qu'ils seront fécondés pour donner des femelles. La spermathèque peut renfermer 5 à 7 millions de spermatozoïdes, qu'elle peut conserver vivant pendant des années. Il est amusant de noter que la reine étant fécondée par plusieurs mâles, elle mettra au monde plusieurs « fratries » selon les spermatozoïdes utilisés lorsque les œufs sont fécondés. En ouvrant une ruche, on peut ainsi distinguer plusieurs lignées d'abeilles reconnaissables à leur aspect plus ou moins foncé, ou velu... issues des différents mâles.

Elle va alors pouvoir pondre en moyenne 1 500 œufs par jour, en formant une spirale centrifuge qui part du centre du rayon. Lors de la ponte, elle va d'abord inspecter l'alvéole, puis pondre un œuf fécondé ou non selon la largeur de l'alvéole. (6) (10)

#### 1.2.2.3.2. Le faux-bourdon



Figure 15: Un faux-bourdon, facilement reconnaissable à ses yeux fort développés. (Photographie Potier Florence)

La cellule dans laquelle est pondu l'œuf du faux-bourdon est légèrement plus large que celle de l'ouvrière, elle n'exerce pas de pression sur l'abdomen de la reine lors de la ponte. Les œufs ainsi pondus ne sont donc pas fécondés, mais ils sont formés par parthénogénèse. Leur cycle se fait en 24 jours : l'œuf éclot au bout de trois jours, donnant suite à une larve durant six jours. Les trois premiers jours, cette larve sera nourrie à la gelée royale, comme une larve d'ouvrière, puis elle recevra un régime à base de miel, de pollen et d'eau pendant trois jours, suite à quoi les ouvrières operculent son alvéole. Après un repos de sept jours, elle formera une nymphe en une journée avant de devenir un insecte parfait en sept jours. (6) (10)

Ces mâles se reconnaissent facilement car ils sont plus gros et plus velus que les ouvrières. Leurs ailes et leurs yeux sont également plus développés. Leur espérance de vie ne dépasse pas généralement les trois mois. On peut les trouver au sein de la ruche au printemps et en été, car c'est la période des vols nuptiaux.

Ils sont dépourvus de dard et des outils nécessaires pour récolter le miel et le pollen. De plus, leur trompe courte les rend incapables de se nourrir seuls ; ils devront être nourris par les ouvrières, tout comme la reine.

Le faux-bourdon n'a donc pas d'utilité au sein de la structure sociale qu'est la ruche, sinon celle de féconder une reine lors du vol nuptial. A cette fin, ses yeux beaucoup plus développés que ceux des ouvrières lui permettent de repérer une reine en vol.

Son système de reproduction occupe presque tout son abdomen. Son expulsion détruit les organes vitaux, ce qui entraîne sa mort en un court laps de temps. (6)



#### 1.2.2.3.3. L'ouvrière

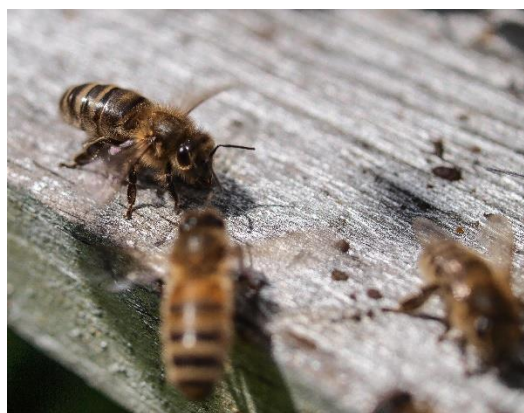


Figure 16: L'abeille ouvrière (Photographie Potier Florence)

La cellule d'ouvrière est dimensionnée de telle façon qu'en dilatant son abdomen pour pondre, la reine sera limitée par les parois de cire. En exerçant une pression sur l'abdomen, ces parois déclenchent le passage des spermatozoïdes de la spermathèque vers l'œuf, qui s'en retrouve fécondé. Une fois pondu, l'œuf va s'incliner de plus en plus au fond de l'alvéole, avant d'éclore au bout de trois jours. A ce stade, il va se produire une mue par jour. (6) Les ouvrières la nourrissent de gelée royale pendant trois jours, ce qui lui permet d'avoir une croissance rapide. Au quatrième jour, les ouvrières ferment l'alvéole avec de la cire, puis maintiennent la chaleur nécessaire au développement de la larve. Cette dernière tisse un cocon mince avec ses glandes séricigènes (à soie) dans lequel elle se métamorphose en nymphe. Puis en une semaine, elle devient un insecte parfait. Après 21 jours de développement, elle déchire son opercule avec ses mandibules. La cellule est alors nettoyée par les ouvrières et la reine peut y pondre à nouveau. (9)



Figure 17: Ecllosion d'une ouvrière hors de sa cellule. (Photographie Potier Florence)

L'ouvrière est une femelle stérile dont les organes sexuels sont atrophiés. Sa durée de vie va dépendre de l'activité à laquelle elle est astreinte : l'hiver, l'activité demandée est faible, l'abeille peut vivre six mois. L'été, l'abeille doit effectuer de longs vols pour butiner, elle ne vit que de 30 à 40 jours.

Sa vie sera orchestrée de façon très nette, avec des tâches particulières qui lui seront échues en fonction de son âge :

- Dès l'éclosion, elle sera **nettoyeuse**. Cette tâche sera la sienne pendant quatre jours. Il lui faudra nettoyer les alvéoles et rejeter les cadavres d'intrus hors de la ruche.
- Puis, pendant dix jours, elle sera **nourrice**. Ses glandes mandibulaires se développent, ce qui lui permet de distribuer aux jeunes ouvrières et aux faux-bourçons un mélange de nectar, de pollen et d'eau.
- Suite à quoi elle sera bâtisseuse. Ses glandes mandibulaires s'atrophient, mais dans le même temps, huit glandes cirières se développent dans l'abdomen, ce qui lui permet de produire une cire blanche qui jaunit au contact de l'air. Cette cire lui permet de construire les rayons et d'operculer les alvéoles.
- Puis elle devient **magasinière** et **ventileuse**. A leur tour, les glandes cirières s'atrophient. Le rôle de l'abeille sera de récupérer la nourriture des butineuses par trophallaxie et de la stocker dans la ruche. La ventilation sera assurée au moyen de ses ailes qu'elle agite pour évaporer l'eau du nectar récolté, mais aussi pour diminuer la température de la ruche lors de fortes chaleurs.
- Le rôle suivant est celui de **gardienne** : l'abeille se poste à l'entrée de la ruche et prend une posture caractéristique, qui consiste à relever la tête et les pattes antérieures. Ce rôle dure environ deux semaines, et permet à la ruche de disposer de véritables sentinelles qui repoussent les attaques d'insectes pilleurs. Mais durant cette période, l'abeille effectuera aussi des vols de repérage, qui la préparent à son rôle suivant :
- **Butineuse**. L'abeille récoltera tous les éléments nécessaires à la survie de la colonie : nectar, pollen, eau et propolis, cela pendant environ trois semaines. Avec environ cent fleurs butinées par vol et un rayon d'action de dix kilomètres, ce travail épuise l'abeille. Alors âgée, elle restera à la ruche pour maintenir la chaleur nécessaire. (9)

#### **1.2.2.4. Langage et comportement social**

L'abeille est un insecte qui fascine, principalement parce que c'est un insecte social. Pour la survie de l'espèce, il va former une colonie, qui lui permettra de se défendre, organiser les stocks de nourriture ou aseptiser son milieu de vie. En effet, l'abeille dispose d'un génome très restreint en ce qui concerne le système immunitaire, si on le compare à d'autres insectes comme la drosophile ou l'anophèle. Elle ne dispose pas de l'immunité acquise, et de plus, ses défenses immunitaires chutent lorsqu'elle arrive en âge de butiner. (11)

Comme dans toute structure sociale, il faut pouvoir établir un mode de communication. Chez les abeilles, le mode de communication des éclaireuses est remarquablement codifié.

Lorsqu'une éclaireuse estime avoir trouvé un endroit intéressant à butiner, riche en ressources et peu éloigné de la ruche, elle va le communiquer au reste de la colonie en décrivant une série de cercles durant quelques minutes, en changeant régulièrement de sens. Tout ce cérémonial ne sert pour l'instant qu'à attirer l'attention des autres abeilles. Plus la danse est vive, plus la nourriture est abondante. De plus, en décrivant ces cercles, l'éclaireuse va diffuser l'odeur de son butin, ce qui renseigne la colonie sur la nature des fleurs à butiner.

La danse en huit commence alors. Elle donne la localisation précise du lieu à butiner. En frétilant, l'abeille décrit une ligne crantée au milieu du huit. La danse présente l'angle entre la source de nourriture et le soleil, avec une précision spectaculaire. Cet angle est mesuré à l'aide des ocelles situées sur le dessus de la tête de l'abeille, et peut même être recalculé selon le déplacement du soleil dans la journée. (6)

### **1.2.2.5. Cycles de la ruche**

#### **1.2.2.5.1. La vie de la ruche selon les saisons**

A l'arrivée de l'hiver, lorsque la température commence à descendre sous 15°C, les abeilles peuvent se serrer pour former des grappes au sein desquelles la température monte jusqu'à 35°C. Cela permet de préserver la colonie qui tombe dans un état de semi-hibernation. La population de la ruche diminue jusqu'à atteindre seulement 10 000 individus. Les abeilles cessent de sortir accomplir leur travail de butinage, et leur espérance de vie augmente, passant de quelques semaines à plusieurs mois. Elles s'installeront sur la partie du rayon contenant les réserves de nourriture, miel et pollen, avec la reine au centre. Elles ne sortiront pas tant que dureront les frimas de l'hiver, sauf pour effectuer un « vol de propreté », durant lequel elles vont éjecter leurs déchets azotés stockés dans leurs abdomens distendus. Ce vol est effectué lorsque les températures sont plus clémentes, mais le froid de l'hiver tue malgré tout souvent une grande partie de la colonie déjà faible.

Au printemps, la ruche se réveille avant même que la température ne monte. Le mécanisme de ce réveil est encore inconnu à ce jour. Afin de reconstituer une colonie nombreuse, la reine se remet à pondre. De nombreuses cellules de faux-bourçons sont aménagées, car la période des vols nuptiaux approche. Les ouvrières construisent de nouveaux rayons, et la ruche atteint sa population maximale. Le rôle des phéromones dégagés par la reine est alors primordial : si ces hormones ne sont pas assez puissantes (cela peut être dû à l'âge de la reine, trop jeune ou au contraire trop âgée), les ovaires des ouvrières ne seront pas inhibés dans leur développement et la colonie perdra de sa cohésion.

C'est également au printemps que se produit l'essaimage, si les provisions de la ruche le permettent.

Les abeilles vont ensuite butiner tout l'été pour constituer les réserves alimentaires qui leur permettent de subsister l'hiver suivant.

#### **1.2.2.5.2. L'essaimage**

Lorsqu'arrive le printemps, vers mai-juin, et si les provisions de miel sont abondantes, la ruche peut décider d'essaimer. Cet événement a cela de fascinant qu'il bouleverse l'ordre social si pointilleux des abeilles.

Les ouvrières vont plus ou moins forcer la reine à pondre des œufs dans des cellules royales qu'elles auront préparées. Une fois ces cellules obturées, la reine diminue ses apports

alimentaires, elle entame pour ainsi dire une « diète » qui lui permet de voler plus facilement par la suite. En effet, elle va quitter la ruche pour la laisser à la nouvelle reine lors de son éclosion. Les abeilles qui souhaitent la suivre signalent leur intention aux autres en volant en zigzag.

Ainsi la reine et ses ouvrières s'en vont et trouvent un abri temporaire en attendant de trouver un nouvel emplacement où établir leur ruche. Cet endroit pourra être une branche, une charpente de toit et toutes sortes de points d'appuis. On peut alors voir une « barbe » d'abeilles : s'entassant les unes sur les autres, elles vont former une grappe compacte d'insectes, la reine se situant au milieu. Cette grappe va vite acquérir un semblant d'organisation malgré l'absence de structure en cire : les plus vieilles abeilles se placent à l'extérieur et protègent les autres de la pluie grâce à leurs ailes qui formeront autant de petites tuiles. La température sera maintenue à 35°C. A cette fin, les abeilles peuvent se resserrer. La reine dispose même d'un couvain et peut continuer à pondre au sein de la grappe d'abeilles.

Pendant le déploiement de cette organisation, des abeilles partent accomplir la mission d'éclaireuses : elles cherchent un emplacement pour fonder une nouvelle ruche. Lorsqu'elles en trouvent un qui leur plaît, elles effectuent une danse. Cette danse leur permet de rallier d'autres abeilles qui vont à leur tour visiter l'emplacement et témoigner leur enthousiasme aux autres en effectuant une danse plus ou moins vive. Ce n'est pas la reine qui décidera qui doit être écouté mais bien les autres abeilles ; la monarchie est devenue une démocratie, et c'est d'autant plus remarquable que cette société composée de milliers d'individus parvient à prendre une décision en quelques heures seulement ! Une fois les abeilles mises d'accord, elles effectuent toutes la même danse et l'essaim décolle pour construire sa nouvelle ruche au lieu convenu. Cette nouvelle ruche sera construite et fonctionnelle en trois jours seulement.

### **1.2.2.6. Les produits de la ruche**

Il est intéressant de noter que les cinq produits de la ruche ont tous une action pouvant se montrer utile en thérapeutique humaine. Ainsi, le miel possède des propriétés antiseptiques et cicatrisantes. La cire présente également ces propriétés, bien que le miel, en raison de sa nature hydrophile, soit plus facile d'utilisation dans l'arsenal thérapeutique. La gelée royale possède une activité vasodilatatrice et hypotensive, une activité anticholestérolémique ainsi qu'un effet anticancérigène. Même le venin possède une utilité thérapeutique, et il est utilisé pour soigner les affections rhumatismales, les arthrites chroniques, certaines maladies inflammatoires et la sclérose en plaques.

### **1.2.2.7. La récolte de la propolis sur l'arbre par l'abeille**

#### **1.2.2.7.1. Temps de récolte**

Toutes les abeilles de la ruche ne sont pas assignées à la récolte de la propolis. Seules quelques-unes réaliseront cette tâche, au printemps ou à la fin de la miellée. La propolis récoltée servira aux préparatifs d'hivernage.

Afin que cette substance résineuse soit plus facile à manipuler, le moment choisi sera la journée, durant les heures les plus chaudes. (1)

Il est connu que les abeilles opèrent une sélection lorsqu'elles collectent la résine d'un végétal, mais les facteurs qui les guident ne sont pas encore parfaitement connus à ce jour (12) (13). Pour l'instant, on peut seulement affirmer que la nature des terpènes et des composés aromatiques ont leur importance et aident les abeilles à déterminer quelle espèce végétale visiter (14).

#### **1.2.2.7.2. Mode opératoire**

L'ouvrière qui récolte la propolis est généralement âgée. Elle commence par sonder la résine à l'aide de ses antennes avant de l'attaquer avec ses mandibules, voire en s'aidant de ses pattes, en s'arc-boutant parfois pour parvenir à fournir cet effort. La propolis a tendance à s'étirer pour former de longs fils, que l'abeille entasse comme des pelotes les corbeilles de sa troisième paire de pattes après l'avoir fait passer de sa première à sa seconde paire de pattes. Au cours de l'opération de récolte de la propolis, l'abeille retourne parfois à la ruche, vraisemblablement pour se nourrir. La manipulation d'une substance si dure et collante n'est pas une tâche aisée, elle prend de nombreuses heures, d'autant que le déchargement de la propolis à la ruche n'est pas non plus une opération simple. La propolis nécessite donc beaucoup de temps et d'effort, et n'est pas produite en très grandes quantités au sein de la ruche. Habituellement, une colonie d'abeilles n'en produit qu'entre 100g et 300g par an. (1)

Après avoir fini sa récolte, l'ouvrière retourne à la ruche, où elle attend que des abeilles lui prélèvent sa pelote par morceaux. Il faut parfois plusieurs heures pour qu'elle soit

enfin déchargée. Afin d'effectuer cette tâche, l'abeille qui prélève la propolis l'étire en un long fil qui finit par se rompre. Cette façon de procéder explique la présence d'appendices à la surface de la pelote.

Avant de pouvoir servir au sein de la ruche, la propolis va subir certains changements dans sa composition. De nouveaux éléments spécifiques y seront apportés par les sécrétions hypopharyngiennes de l'ouvrière qui a effectué la récolte. En outre, elle subira des transformations (hydrolyse des hétérosides de favonoïdes en aglycones, via une enzyme produite par l'abeille : la 13-glucosidase). (4)

Ce sont les mêmes ouvrières qui récoltent la propolis et se chargent de son utilisation au sein de la ruche. Elles n'effectuent alors aucun autre travail. Il arrive que des ouvrières non spécialisées les aident si nécessaire.

#### 1.2.2.7.3. Variation de la quantité produite

La production d'une ruche en propolis dépendra de différents facteurs, qui sont :

- La variété d'abeille en question. Ainsi, il semblerait que *Apis mellifera caucasia* et *Apis mellifera intermissa* propolisent beaucoup, tandis que *Apis mellifera carnica* et *Apis mellifera ligusta* propolisent peu. *Apis mellifera lasciata*, quant à elle, ne propolise pas du tout.
- La situation du rucher. La récolte de propolis étant liée à la flore locale, elle sera plus abondante lorsque la ruche se situe en bordure de sources importantes de propolis, comme des forêts, ou des bois de peupliers, qui sont les plus importants arbres pourvoyeurs de propolis.
- Les conditions météorologiques. Les abeilles ont tendance à propoliser plus lorsqu'il fait froid.

#### 1.2.2.8. **Utilisations de la propolis au sein de la ruche**

De manière générale, au sein d'une ruche, la propolis sert de ciment, de mastic ou de vernis. Mais outre ce rôle structural, elle a un rôle antiseptique qui permet de compenser la faible capacité des abeilles à se protéger des agressions microbiologiques via leur propre système immunitaire. Afin de tapisser un élément de propolis, l'abeille commence par l'émettre avec ses mandibules, puis la polit avec un mouvement de va-et-vient de la tête.

Comme il a été dit en préambule, la propolis tient son nom du fait qu'on la trouve en avant de la cité. En effet, les abeilles réduisent les dimensions du trou de vol à l'approche de l'hiver à l'aide de propolis. Mais cela ne s'arrête pas là : elles ajoutent de la propolis derrière l'entrée, qui aura un rôle de fortifications contre les intrus. (15)

De la même manière qu'un mastic, la propolis sert à colmater les fissures et fentes de la ruche afin de la rendre plus hermétique. Les abeilles s'en servent aussi pour réparer les rayons et les consolider. Cette façon qu'ont les abeilles de vouloir à tout prix consolider des structures qui leur paraissent peu fiables sont parfois malvenues pour l'apiculteur, lorsque son cheptel décide de « consolider » les rayons mobiles en les fixant à l'aide de propolis !

La propolis sert aussi à vernisser les surfaces intérieures afin d'en supprimer les aspérités.

Voyons à présent le rôle aseptisant de la propolis. Il se trouve que l'abeille dispose d'un code génétique pauvre en gènes codant le système immunitaire. En fait, l'abeille ne possède tout simplement pas d'immunité secondaire, ou acquise. Sa faiblesse sur ce plan l'a conduite à trouver, via la vie communautaire, d'autres stratégies de défense contre les risques microbiologiques. La propolis est un matériau antiseptique, ce qui lui confèrera un intérêt en thérapeutique humaine comme nous le verrons ultérieurement. Les abeilles s'en serviront donc tout naturellement pour aseptiser leur cadre de vie et éviter des contaminations au sein de la ruche. (11)

A cette fin, les rayons et l'intérieur des cellules sont enduits de propolis, qui sera répandue comme un vernis.

Mais afin d'éviter que la putréfaction d'un cadavre ne contamine la ruche d'espèces bactériennes, les abeilles se servent aussi de propolis pour embaumer les cadavres d'intrus dans la ruche, opérant une véritable momification. Cette opération est réalisée lorsque le cadavre de l'indésirable est trop gros pour être évacué par le trou de vol, comme cela est fait habituellement.

Fixer les structures, réduire les aspérités, protéger les abeilles des microorganismes pathogènes, la propolis a des propriétés multiples qui trouvent leur utilité au cœur de la colonie finement structurée d'*Apis mellifera*.

### 1.3. Diversité des abeilles productrices de propolis

*Apis mellifera* n'est pas la seule espèce d'abeille qui soit en capacité de produire de la propolis. Il existe diverses abeilles, avec ou sans dard, qui peuvent également produire une substance analogue à partir de la résine des arbres. Au sein même de l'espèce *Apis mellifera*, il existe de nombreuses variétés. Ainsi, les travaux de MM. Silici *et al.* comparent des échantillons de propolis obtenus à partir de *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera anatolica* et *Apis mellifera carnica* (16).

Il faut savoir que dans la famille des Apidae, la sous-famille des Apinae regroupe plusieurs tribus d'abeilles. Certains, comme la *Xylocopa*, ou abeille charpentière, ne produisent ni miel, ni propolis.



Figure 18: Un couple de *Xylocopes* (Photographie Potier Josette)

En revanche, les tribus des Trigones et des Meliponini produisent ces deux substances et peuvent représenter une source de propolis dans le futur, car elles sont susceptibles d'être élevées (bien qu'on ne parle pas exactement de propolis dans ce cas, comme nous le verrons bientôt). On parle de culture des mélipones, ou méliponiculture. De même que pour nos *Apis mellifera*, cette culture est essentiellement réalisée dans le but d'obtenir du miel (le miel de la mélipone, légèrement acidulé, est très recherché). Mais elle présente aussi la capacité de réaliser un produit à base de résines des arbres, de cire et de boue. Ce produit, que l'on appelle « batumen » ou « cerumen », porte encore le nom de « géopropolis », car sa principale différence avec la propolis classique (pour rappel, un mélange de résines et de cires) est que de la terre y est incorporée sous forme de boue. Les mélipones, dont le développement et la structure sociale sont sensiblement les mêmes que ceux d'*Apis mellifera* (exception faite de la polygynie, phénomène selon lequel plusieurs femelles fécondes, mais une seule gravide, peuvent cohabiter au sein d'une colonie), semblent utiliser le batumen aux mêmes fins que nos abeilles européennes la propolis (17).

Les travaux de MM. Liberio *et al.*, parmi d'autres, mettent en évidence l'action antiseptique exercée par la géopropolis de *Melipona fasciculata*, qui, comme pour la propolis, n'est pas accompagnée de toxicité aux doses nécessaires pour une inhibition des bactéries testées. On peut également y voir que la géopropolis de cette mélipone est elle aussi riche en composés phénoliques, et notamment en flavonoïdes, qu'elle influence la production de cytokine, jouant par là-même un rôle anti-inflammatoire et immunomodulateur. La similitude de certains composés entre propolis et géopropolis permettent en outre de conclure à une probable activité antioxydante de cette dernière. (18)

De même, des études d'extraits éthanoliques de géopropolis produite par *M. compressipes* et *M. quadrifasciata anthidioides* ont démontré que ces produits ont aussi une activité antiseptique (19).

Tout comme la propolis, la géopropolis est empiriquement utilisée dans certains pays pour soigner les blessures, mais aussi dans le traitement des gastrites, et comme agent antiseptique (20).

#### 1.4. Collecte de la propolis par l'Homme

Classiquement, on décrit deux méthodes de récolte de la propolis. (1)

- L'une consiste à racler la propolis directement sur la ruche là où la fantaisie des abeilles leur a dicté de la déposer. On appelle la propolis obtenue **propolis de raclage**. Cette méthode est fastidieuse, aussi n'est-elle pas préférée chez les apiculteurs qui font le commerce de leur propolis.
- L'autre méthode consiste à installer une grille dans la ruche. Les abeilles vont propoliser pour boucher les trous de cette grille. Il suffit alors de la secouer à une température inférieure à 15°C : la propolis est alors dure et cassante, elle va se détacher de la grille.

Toutefois, dans leurs travaux, MM. Inoue *et al.* (21) évoquent une autre méthode de récolte qu'ils appellent la CPI, pour *intelligent collector of propolis*, ou collecteur intelligent



de propolis. Cette méthode consiste à placer des cales dans la ruche afin que les abeilles propolisent sur ces cales. Cette méthode de production pourrait permettre d'accroître la production de propolis, car si elle se montre moins efficace en rendement que la récolte à base de grilles au printemps ( $68.2 \pm 17.1$  g contre  $176.7 \pm 54.8$  g avec la grille, et seulement  $42.8 \pm 13.3$  g avec la méthode de grattage), elle dépasse largement la méthode de la grille pour la récolte automnale ( $212.9 \pm 47.7$  g contre  $87.5 \pm 6.0$  g pour la grille). Le résultat à l'année donne une récolte de  $114.8 \pm 70.6$  g en utilisant cette méthode de CPI,  $120.9 \pm 49.8$  g avec la propolis de grille et  $85.7 \pm 49.2$  g avec la propolis de raclage.

## 1.5. Extraction et purification

La propolis peut être utilisée pure, par exemple en étant mâchée ou même avalée telle quelle. Mais une utilisation médicale à plus grande 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. C'est une nécessité pour la reproductibilité des produits à base de propolis.

La première méthode de purification est de simplement placer la propolis dans de l'eau bouillante. (22) La propolis reste au fond de la solution, alors que la cire surnage.

Cette méthode ne permet toutefois pas d'obtenir une propolis totalement exempte de cire, car elle contiendra la cire de propolis, différente dans sa composition chimique de la cire de rayons (23). Cette cire de propolis peut elle-même être séparée de la propolis par traitement au chloroforme chaud.

Dans son livre sur la propolis, Yves Donatieu (2) signale que la propolis est partiellement soluble dans l'eau par certains procédés, comme l'ébullition à reflux. Il ajoute également que la propolis est partiellement soluble dans l'alcool, l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, et conclut que seul un mélange adéquat de ces différents solvants peut dissoudre la totalité des composants de la propolis. Néanmoins, de nouveaux auteurs ont décrit des façons de procéder qui permettent d'extraire une grande partie de ces composants de façon pratique et économique.

Afin d'étudier les méthodes d'extraction des composés de la propolis, nous prendrons appui sur les travaux de Boryana Trusheva, Dorina Trunkova et Vassya Bankova (24), ainsi que sur l'étude réalisée par Alexandra CHF Sawaya, Ildenize Barbosa da Silva Cunha et Maria C Marcucci (25).

La première porte sur trois modes d'extraction : la macération, l'extraction par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes, ce qui permet de comparer les moyens physiques que nous avons d'extraire la propolis. La seconde se focalise sur la turbo-extraction, l'extraction supercritique, l'extraction via des solvants non alcooliques et l'extraction à l'aide d'émulsions, ce qui permet de se concentrer d'avantage sur le véhicule à utiliser.

Dans leurs travaux, Boryana Trusheva, Dorina Trunkova et Vassya Bankova (24) ont comparé différentes méthodes d'extraction des composés actifs de la propolis pour déterminer les composés majoritairement extraits selon la méthode utilisée. Pour cela, ils se sont focalisés sur les trois méthodes principalement utilisées pour extraire la propolis :

- La macération
- L'extraction par ultrasons (UE)
- L'extraction assistée par micro-ondes (MAE). Il semble, et c'est l'avis des auteurs, que cette étude est la première à étudier la méthode MAE appliquée à la propolis.

Pour cette étude, le solvant utilisé est une solution d'éthanol à 70%. En effet, il est généralement admis qu'il s'agit du meilleur solvant pour extraire la propolis. C'est également ce solvant qui est le plus utilisé pour l'extraction afin de réaliser les produits à base de propolis commercialisés sur le marché. (26) (27)

Il est intéressant d'observer la teneur en flavonoïdes d'extraits obtenus avec 5 à 30% de propolis brute et 60 à 96% d'éthanol. Les plus fortes concentrations en composés phénoliques ont été obtenues en utilisant les solvants avec les plus faibles concentrations en éthanol et les plus fortes fractions de propolis brute. Cependant, l'extrait contenant le plus de flavonoïdes entre tous a été celui qui comportait la fraction d'alcool la plus forte. (25)

La méthode de macération traditionnelle dure de deux à dix jours. Pour exploiter industriellement la propolis, il est naturel de chercher à augmenter le rendement et la rapidité de son extraction. Il faut alors se tourner vers l'étude de nouvelles méthodes d'extraction. L'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par ultrasons sont deux méthodes mises au point pour l'extraction de composants organiques issus d'une matrice solide, ce qui correspond exactement au cas de la propolis. Ces extractions semblent toutes indiquées pour les produits naturels et ont déjà fait leurs preuves pour de nombreuses plantes médicinales.

L'extraction assistée par ultrasons, ou MAE, consiste en l'utilisation d'énergie sous forme de micro-ondes pour chauffer le solvant en contact avec l'échantillon pour séparer certains composants de la matrice vers le solvant.

Quant à l'extraction par ultrasons, ou UE, son bénéfice semble être dû principalement à l'effet mécanique des ondes sonores qui créent des bulles de vapeur durant un faible intervalle de pression négative.

Le taux de phénols et de flavonoïdes extraits a été déterminé et l'efficacité des différentes méthodes a été comparée. L'extraction assistée par micro-ondes est très rapide, mais l'extrait obtenu présente un fort taux de substances qui ne sont ni des phénols, ni des flavonoïdes. C'est l'extraction par ultrasons qui offre le meilleur pourcentage de phénols extraits.

Sans surprise, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par ultrasons ont toutes deux un bien meilleur rendement que la simple macération de l'échantillon dans la solution. La durée d'extraction est plus faible.

C'est l'extraction par ultrasons qui se trouve être la méthode la plus efficace pour ce qui est du rendement, du temps d'extraction et de la sélectivité.

Voici un aperçu des résultats sous forme de tableau. Les composants bioactifs dosés sont les phénols, les flavones et flavonols, les flavanones et dihydroflavanols. Ce choix de composés est dû au fait que leur taux est bien mieux corrélé à l'activité antibactérienne et offre bien plus d'informations que la concentration de composants individuels.

Type d'extraction	Propolis/solvant (m/V)	Durée	Fraction phénolique totale %	Fraction flavones/flavonols totale %	Fraction flavanones/dihydroflavonols totale %	Extraction totale %
Macération	1:20	72 h	44 ± 2	8.6 ± 0.1	18 ± 1	58 ± 3
Macération	1:10	72 h	43 ± 2	8.8 ± 0.1	19 ± 2	55 ± 1
UE	1:20	10 min	35.9 ± 0.5	9.4 ± 0.2	20 ± 5	41 ± 1
UE	1:20	30 min	50 ± 1	8.6 ± 0.1	23 ± 2	50 ± 1
UE	1:10	30 min	52 ± 3 <sup>a,b,c</sup>	9.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	22 ± 2 <sup>a</sup>	53 ± 3 <sup>a,b,c</sup>
MAE	1:20	2 × 10 s	40 ± 1	9.3 ± 0.1	23 ± 3	73 ± 2
MAE	1:10	2 × 10 s	40.4 ± 0.6 <sup>a,b,c</sup>	8.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	20 ± 1 <sup>a</sup>	75 ± 0 <sup>a,b,c</sup>
MAE	1:10	3 × 10 s	24.4 ± 0.4	10.7 ± 1.7	7.5 ± 0.6	66 ± 5

**Tableau 2: Rendement selon le type d'extraction pratiqué, tableau comparatif entre la Macération, l'UE et la MAE.**

• Valeurs d'extraction ± écart-type;

• <sup>a</sup> valeurs ayant été comparées avec celles de la macération, utilisation de la loi de Student (propolis/solvant 1:10),

• <sup>b</sup> valeurs significativement différentes de celles obtenues par macération, d'après comparaison selon la loi de Student ( $p < 0.05$ ) (propolis/solvant 1:10)

• <sup>c</sup> valeurs comparées et se trouvant être significativement différentes  $p < 0.05$  (loi de Student)

[19]

Dans les trois techniques d'extraction, le taux de solvant utilisé n'influence pas significativement le rendement d'extraction. Cette observation est utile, car elle évite de gaspiller du solvant et de l'énergie en utilisant un ratio supérieur à 10 :1 (v/m).

Dans le cas de l'UE, le rendement de constituants actifs extraits augmente avec le temps. Il a été trouvé dans cette étude qu'une sonication de 30 minutes devrait être suffisante pour extraire le taux disponible de phénols et de flavonoïdes. Cette méthode présente l'avantage d'extraire le minimum de cire.

Avec la méthode MAE, la situation est différente. On trouve dans cette étude un résultat contre-intuitif : en effet, un cycle d'irradiation de 10 secondes en plus (donc trois cycles au lieu de deux) donne un rendement plus bas en phénols et en flavones et dihydroflavanols extraits. Quant à la faible augmentation du pourcentage de flavones et flavonols extraits, elle n'est pas significative. L'hypothèse la plus probable est que la transmission d'énergie supplémentaire ait conduit à une altération des molécules d'intérêt, probablement par oxydation.

La méthode MAE est beaucoup plus rapide que la méthode UE, mais elle offre un moins bon rendement, car on y retrouve d'avantage de cire.

Dans leur étude, Alexandra CHF Sawaya, Ildenize Barbosa da Silva Cunha et Maria C Marcucci [16] évoquent brièvement d'autres méthodes :

- La turbo-extraction
- L'extraction supercritique
- L'extraction via des solvants non alcooliques
- L'extraction à l'aide d'émulsions

La turbo-extraction, extraction à l'aide d'une turbine, permet de réduire le temps d'extraction par rapport à la méthode de macération à moins d'une heure, et ce, sans augmenter la température durant l'opération.

L'extraction supercritique est utilisée sur l'extrait sec de propolis, avec pour objectif d'obtenir différentes fractions enrichies en certains composants en particulier. Le CO<sub>2</sub> pur est un excellent extracteur qui s'évapore à l'issue de l'opération, laissant un produit sec sans résidu de solvant. Une hausse de l'extraction de 13% a été observée par rapport à la macération simple, mais la présence d'éthanol reste nécessaire pour fractionner les extraits, car le CO<sub>2</sub> ne fait aucune différence dans la polarité des composants biochimiques.

En ce qui concerne l'extraction via des solvants non alcooliques, le but n'est cette fois pas d'augmenter le rendement mais de proposer une alternative aux solvants alcooliques. En effet, pour certaines utilisations, la fraction alcoolique est indésirable, il faut donc trouver d'autres méthodes d'extraction. On peut utiliser de l'eau pure, mais on n'extraira que très peu de composés parmi les composés hydrosolubles. Des huiles comestibles, comme l'huile de colza, présentent une alternative intéressante avec un résultat proche en composition des extraits alcooliques, bien que les quantités soient moindres et ce pour un temps de macération plus long. Il est intéressant de noter que pour cette méthode, la composition qualitative sera la même pour les composés extraits. [16]

Une autre méthode consiste à utiliser des émulsions. Les microémulsions sont stables. Un extrait de propolis éthanolique incorporé dans une émulsion comportant du tween 20, du tween 80, de l'alcool et de l'eau aura un effet sur les bactéries gram positives. Les tweens étant des surfactants, plus précisément des esters de sorbitane polyoxyéthyléniques, ou polysorbates. L'avantage des esters de sucre est qu'ils sont peu coûteux et d'une grande innocuité.

De leur côté, MM. Netíková *et al.* [87] ont étudié l'impact d'un extrait de propolis Tchèque dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) sur diverses souches bactériennes et fongiques. L'action antiseptique de la propolis contre ces souches testées conduit à penser que le DMSO peut effectivement être un solvant pour extraire les constituants de la propolis.

Utiliser divers solvants peut aussi représenter une solution pour séparer les composants de la propolis. Ainsi, la fraction comprise dans l'hexane contient essentiellement des stéroïdes, des terpènes et des acétophénones. L'extrait du dichlorométhane contient des lignanes, des flavonoïdes, des sesquiterpènes, des triterpènes et des coumarines. L'extrait dans l'acétate d'éthyle contient des flavonoïdes, des tanins, des xanthones, des acides triterpènes, des saponines et des composés phénoliques. Enfin, l'extrait du méthanol contient des flavonoïdes glycosylés, des tanins, des saponines et des carbohydrates. [20]

## **2. Seconde partie : propriétés physico-chimiques de la propolis**

## 2.1. Description physique

Longtemps, on a cru que la propolis était un baume ou une gomme. C'est Alin Caillas qui, dans un travail présenté à l'académie des sciences en 1923, met en évidence sa nature exacte : il s'agit en fait d'une résine. (22)

A une température de 15°C, elle est dure et friable. A 30°C, elle est molle et gluante. Marie-Paule Rolin (1) la décrit comme étant d'une saveur âcre et amère, d'une odeur agréable, évoquant la vanille et la cannelle. Selon cet auteur, le point de fusion se situe entre 70 et 100°C. Cependant, Nicolas André (22) donne son point de fusion à 65-66°C lorsqu'elle est pure. On peut s'étonner de la très grande disparité entre ces différents résultats. En outre, toutes ces publications ne sont pas spécialement récentes (1984 pour Mme Rolin, M.P., 1947 pour M. Nicolas, A.). Malgré mes nombreuses recherches sur ce point particulier, je n'ai pas pu trouver de publication récente pouvant préciser quel est le point de fusion exact de la propolis. Je me permets donc d'avancer un point de vue personnel, selon lequel le point de fusion de la propolis serait variable. En effet, il est établi, grâce à de nombreux auteurs, que la composition chimique de la propolis est très variable (27), notamment et surtout en fonction de la région de récolte (25) (28), mais aussi, de façon moins marquée, par l'abeille productrice (29). Plus encore, certains auteurs ont mis en évidence la variation du taux de cire dans la composition de la propolis (23). Ces variations, et surtout celle en cire, seraient à mon sens responsables des grandes variations constatées dans les points de fusion mesurés par de plus anciens auteurs. La notion de point de fusion serait alors caduque, ce qui explique l'absence de parutions récentes sur ce sujet.

Selon Nicolas André, la densité de la propolis est de 1,186. (22) Là encore, ce résultat est à prendre avec prudence : toujours d'après mon avis personnel, la grande variabilité de la composition de la propolis, qui peut déjà faire varier son point de fusion si mes conclusions sont justes, doit pouvoir également faire varier sa densité. La publication de cet auteur reste assez ancienne, et aucune publication récente ne m'a permis de corroborer ce chiffre, ce qui m'amène à penser que la densité de la propolis ne peut être définie par une valeur aussi précise.

Sa couleur est très variable, elle va du jaune clair au brun presque noir, mais la propolis se trouve aussi dans des couleurs rougeâtres, brunâtres, etc. (22)

Sa microstructure est connue grâce aux travaux de Colette Jeanson et Philippe Marchenay, réalisés au microscope électronique à balayage, et portant sur des échantillons de la France entière. L'observation qui ressort de leurs travaux est que la microstructure trouvée est toujours la même. Cela tendrait à prouver le rôle très important des ouvrières dans la formation de la structure de la propolis. (30)

### 2.1.1. Composition

Avant toute opération de purification, la propolis est en général composée, grossièrement, de 50% de résines et de baumes, 30% de cire, 10% d'huiles essentielles et

aromatiques, 5% de pollen et 5% d'autres substances, notamment du bois et des morceaux d'insectes. (31)

En Europe, la propolis est essentiellement récoltée par l'abeille sur les bourgeons de peupliers et est essentiellement riche en flavonoïdes. Dans les pays au climat sub-tropical à tropical et notamment au Brésil, la composition est nettement plus variable. De plus, existe de nombreuses espèces d'abeilles sans dard qui vont mélanger la propolis à de la cire ou de l'argile afin de l'utiliser comme matériau de construction et comme moyen de défense contre les prédateurs et les maladies. (25)

#### **2.1.1.1. Acides organiques**

Parmi les acides organique, on retrouve des dérivés de l'acide benzoïque, l'acide benzoïque, l'acide gallique (1)

#### **2.1.1.2. Acides-phénols**

Acide caféique, acide cinnamique, acide férulique, acide isoférulique, acide p-coumarique (1)

#### **2.1.1.3. Aldéhydes aromatiques**

Vanilline, isovanilline (1)

#### **2.1.1.4. Coumarines**

Esculétol, scopolétol (1)

#### **2.1.1.5. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes produits dans la propolis des plantes sont élaborés au moment de la photosynthèse et leur premier rôle est de protéger les feuilles des rayonnements nocifs en provenance du soleil (IR, V, rayons X, gamma...) (32)

D'un point de vue chimique, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes avec pour structure de base deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C6-C3-C6.

Dans la propolis, parmi les flavonoïdes, on retrouve :

- Les flavones : acacétine, chryisine (qui est à l'origine de la couleur jaune de la propolis et de la cire), pectolinarigénine, pinocembrine, tectochryisine

- Les flavonols : galangine, izalpinine, kaempféride, quercétine, rhamnocitrine
- Les flavanones : pinostrobinine, sakuranénine, pinobanksine (1)

#### **2.1.1.6. Composés terpéniques**

Cinq terpènes ont été identifiés dans la propolis crétoise,

- Les diterpènes: acide 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-oïque et un mélange de labda-8(17),13*E*-dien-19-carboxy-15-yl oleate et palmitate
- Les triterpènes : acide 3,4-seco-cycloart-12-hydroxy-4(28),24-dien-3-oïque et acide cycloart-3,7-dihydroxy-24-en-28-oïque (33)

#### **2.1.1.7. Vitamines**

On retrouve dans la propolis de la provitamine A et certaines du groupe B (en particulier B3 ou PP ou nicotinamide) (1), ainsi que de la vitamine C et E. (4)

#### **2.1.1.8. Composés volatils**

Dans une étude sur la propolis éthiopienne, MM. Kesatebrhan Haile et Tesfahun Kebede ont mis en évidence l'obtention d'une huile essentielle de couleur jaune clair lors de l'hydrodistillation de la propolis collectée à Haramaya et Assela. Ils constatent une certaine variation dans la composition des échantillons, imputable aux variations de la flore locale ou au changement dans la variété d'abeille. (*Apis mellifera monticola* à Assela, *Apis mellifera jementica* à Haramaya). Si la composition quantitative de ces huiles essentielle peut varier d'une propolis à l'autre selon le lieu de récolte et l'abeille en cause, l'étude réalisée sur la propolis éthiopienne a permis d'identifier les principales molécules volatiles que l'on trouve dans la propolis.

Les méthodes d'analyse utilisées sont la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse. Un total de 62 composés de l'huile essentielle ont été identifiés dans les deux échantillons. Ils peuvent être divisés en sept groupes :

- Les monoterpènes oxygénés (29.81% Haramaya, 9.45% Assela)
- Les sesquiterpènes (15.20% Haramaya, 19.05% Assela)
- Les sesquiterpènes oxygénés (11.86% Haramaya, 18.56% Assela)
- Les aromatiques (14.93% Haramaya, 4.25% Assela)
- Les aromatiques oxygénés (17.59% Haramaya, 4.58% Assela)
- Les aliphatiques (5.06% Haramaya, 7.62% Assela)
- Les aliphatiques oxygénés (7.84% Haramaya, 25.17% Assela)

De façon plus large, on peut les classer en deux groupes :

- Les hydrocarbures (monoterpènes, sesquiterpènes, aromatiques)



- Les composés oxygénés (aromatiques, phénols, alcools, sesquiterpènes alcooliques, aldéhydes, cétones, esters, lactones, éthers, oxydes, etc.)

La composition dépendante de la végétation locale est estimée à 21 composés.

#### **Recensement des composés de l'huile essentielle de propolis en Annexe 1**

On retrouve dans ces huiles essentielles de nombreux composés issus des plantes sur lesquelles les abeilles ont collecté la propolis. D'autres (epi-bicyclosesquiphellandrène,  $\alpha$ -campholénal, 3-isopropyl-6-méthyl-2-oxo-1-(3-oxobutyl)-cyclohexanecarbaldehyde et p-menth-1-en-8-ol) ont été identifiées seulement dans la propolis.

Les aromatiques oxygénés (thymol), les monoterpènes oxygénés (camphre, bornéol), les sesquiterpènes ( $\delta$ -cadinène, cédrol) sont les principaux composés actifs dans l'effet antibactérien et l'effet antifongique observés *in vitro* (34).

#### **2.1.1.9. Constituants divers**

Lorsqu'elle est brute, la propolis comporte une partie insoluble, constituée de matières organiques, tissus végétaux, grains de pollen, débris de cuticules et de soies d'insectes.

On retrouve des minéraux dans la propolis: aluminium, baryum, calcium, chrome, cobalt, cuivre, étain, fer, manganèse, nickel, silicium, strontium, titane, vanadium, zinc, argent, bore (traces), magnésium, molybdène, plomb(traces), sélénium (traces). (1)

On y trouve également du xanthorréol, du ptérostilbène, des lactones, des polysaccharides et des acides aminés (3) ainsi que des tanins, des lignanes et des saponines (35).

C'est grâce à la chromatographie en phase gazeuse que l'on sait que l'acide o-et m-coumarique, l'acide gentisique, l'acide hydrocaféique et l'acide salicylique se trouvent eux aussi dans la propolis. (1)

#### **2.1.1.10. Cire de propolis**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'extraction de la propolis, lorsqu'on la traite au chloroforme chaud, on la sépare d'une substance cireuse. Sa composition est assez proche de celle de la cire d'abeille et elle semble être excrétée par celles-ci.

On retrouve des taux très différents de cette cire selon les différentes régions du monde où elle est collectée. Ainsi, dans l'étude de MM. Negri *et al.* (23), les échantillons de propolis étudiés, d'origine brésilienne, ont un taux de cire qui varie entre 4,8% et 19,3%. L'étude en question ne détecte pas pour autant de corrélation entre la teneur en cire et les régions où ont été collectés les échantillons. D'autres études (Bonvehí, J. S.; Coll, F. V. V.; Jordá, R. E. J. Am. Oil Chem. Soc. 1994, 71, 529), menées sur de la propolis d'origine chinoise, trouvent un taux de cire plus proche de 30%.

MM. Negri *et al.*, dans une autre étude (36), ont observé que les monoesters et les hydrocarbures sont les principaux constituants de la cire de propolis. Les alcanes, les alcènes,

les alcadiènes, diesters, cétones et acides gras, qui sont des constituants de la cire de propolis (37), sont des composés fréquemment rencontrés dans les cires naturelles (animale ou végétale).

Dans la cire de propolis comme dans celle de rayon, les monoesters sont clairement la classe prédominante de constituants, suivie par les hydrocarbures. Il n'y a pas d'homogénéité dans les résultats ni de corrélation avec la région de collecte. Il est plus probable que la composition de la cire de propolis et de rayon soit plutôt dépendante du patrimoine génétique des abeilles. En fait, il a été mis en évidence une corrélation avec les degrés d'hybridation entre l'abeille européenne et l'abeille africaine au Brésil (38). En effet, il se trouve qu'au Brésil, il y a eu beaucoup d'hybridations des abeilles européennes *A. mellifera mellifera* et *A. mellifera ligustrica* avec les abeilles africaines *A. mellifera andansonii* (= *A. m. scutellata*).

Le travail de MM. Negri *et al.* (23) consiste notamment à comparer les taux de cire et leur composition en fonction de ces différentes variétés d'abeilles.

Mais il ne s'arrête pas là, et va également comparer cette cire de propolis avec des échantillons de cire de rayon du Brésil. On constatera que ces deux cires sont bien distinctes, et ne possèdent pas la même composition.

Cette étude s'est d'abord retrouvée heurtée à des difficultés analytiques. Le besoin d'hydrolyser les esters pour identifier les constituants acides et les résidus d'alcool est un point problématique dans l'analyse de la cire naturelle, car on n'obtient qu'une analyse partielle des constituants du produit. Lors de conditions appropriées, il est possible d'analyser le contenu total en esters de haut poids moléculaire. De nouvelles techniques impliquant la chromatographie en phase gazeuse à haute température ont permis l'analyse directe d'extrait de propolis sans dérivation (39).

En ce qui concerne la distribution des fractions d'hydrocarbures, on voit une large variation dans les échantillons. La plupart des échantillons de cire de rayon et de propolis ont pour constituant majeur l'heptacosane. On retrouve également de nombreux alcènes dans les deux, et seule la propolis présente des isoalcanes en faibles quantités. Aucune corrélation ne semble pouvoir se faire entre la teneur en hydrocarbures et le lieu de récolte, contrairement ce que l'on sait de la teneur en résines, qui dépend de la flore locale. Là encore, on pense plutôt à des facteurs génétiques. On a trouvé une grande constance entre les cires de rayon et de propolis pour les mêmes variétés d'abeilles. L'analyse des hydrocarbures indique de plus une proportion significative de variations entre les abeilles qui peuvent être attribuées à des facteurs génétiques.

On constate que les distributions des alcools de monoesters dans la cire de rayon et de propolis présentent toutes deux le C24 comme le principal composant.

L'acide palmitique est le constituant majeur de la partie acyl ester dans tous les échantillons examinés. Le fait que le principal alcool soit généralement C30 et le principal acide C16 suggère que le triacontil palmitate (C46) prédomine dans les esters d'échantillons de cire de propolis et de rayon examinés.

Malgré les larges variations observées dans la distribution des constituants des échantillons observés, il y a une remarquable similarité observée entre la composition de la cire de rayon et celle de propolis. Les résines et les fractions de la propolis sont largement dérivées des sécrétions des plantes collectées par les abeilles, mais malgré la capacité des plantes à produire de la cire naturelle, on peut affirmer que la cire de propolis est issue de l'abeille. En

effet, on peut noter des différences entre la composition de la cire d'abeilles par rapport à celle des plantes. Par exemple, il est rare que la cire de plantes contiennent des alcènes et de l'acide oléique comme constituants majeurs en hydrocarbures, et les esters peuvent prédominer chez les plantes, mais pas toujours. En revanche, les monoesters apparaissent constamment comme la classe prédominante dans la cire de rayons que produisent les abeilles.

#### **2.1.1.11. Contaminants**

La propolis n'est pas exempte de risques de contenir certains contaminants, qui sont récoltés par les abeilles sur la flore locale. Un environnement présentant une plus grande pollution peut donner lieu à la récolte d'une propolis contenant de la poudre d'asphalte, des pesticides, un excès de fer, du cuivre, du magnésium (40) et même du plomb (41).

#### **2.1.2. Méthodes d'analyse physico-chimiques**

Cire de propolis : Cette étude s'est d'abord heurtée à des difficultés analytiques. Le besoin d'hydrolyser les esters pour identifier les constituants acides et les résidus d'alcool est un point problématique dans l'analyse de la cire naturelle, car on n'obtient qu'une analyse partielle des constituants du produit. Lors de conditions appropriées, il est possible d'analyser le contenu total en esters de haut poids moléculaire. De nouvelles techniques impliquant la chromatographie en phase gazeuse à haute température ont permis l'analyse directe d'extrait de propolis sans dérivation (39).

##### **2.1.2.1. Analyse des résines solubles dans l'alcool, de la cire et des matières insolubles**

Ces trois paramètres sont souvent utilisés pour définir la qualité de la propolis.

La législation brésilienne définit un minimum de 35% (m/m) de composés extractibles par l'éthanol, un maximum de 5% (m/m) de cendres et de 25% (m/m) en cire. La propolis brute contenant de plus forts taux de cire et de composants non solubles a probablement été mélangée à d'autres matières moins chères, ou viennent de régions où les abeilles n'arrivent pas à collecter suffisamment de résines. Dans les deux cas, le taux de composés extractibles par l'éthanol sera faible. Ainsi, le contenu en cendres et en résidus insolubles dans l'éthanol ont été définis comme paramètres de test. Le contenu en cire est habituellement mesuré en congelant l'extrait alcoolique de propolis (-16°C) et en séparant la cire précipitée à cette température par filtration.

Une trop forte humidité du produit témoigne de mauvaises conditions de conservation ou de manipulation. Le maximum d'humidité considéré comme acceptable est de 8%. (25)

### **2.1.2.2. Analyse des classes spécifiques de composés**

La propolis européenne contient beaucoup de flavonoïdes comme la galangine et la pinocembrine, qui sont responsables de la majeure partie de son activité. Ainsi les premières études réalisées sur la propolis brésilienne s'étaient focalisées sur ces produits. Les méthodes spectrométriques utilisant  $AlCl_3$  comme réactif sont encore très utilisées, avec une courbe de calibration basée sur la quercétine (bien que ce composé ne soit pas commun dans la propolis brésilienne). Les résultats qui en ont découlé montrent qu'il y a une plus forte teneur de phénols qu'en flavonoïdes dans la propolis brésilienne. La teneur en phénols est donc devenue le test standard, habituellement déterminé par la méthode Folin-Ciocalteu avec une courbe de calibration qui utilise l'acide phénolique ou gallique. Des taux de phénols entre 6,4 et 15,2% (m/m) ont été rapportés dans le cas d'extraits alcooliques de la propolis brésilienne verte. La législation brésilienne accepte un minimum de 0,5% de flavonoïdes (m/m) et un minimum de 5% en composés phénoliques (m/m) dans la propolis brute.

Les taux de ces deux classes de composés sont corrélés à une activité antioxydante. De plus, certains acétophénones de la propolis verte brésilienne réagissent avec  $AlCl_3$  et peuvent être comptés à tort dans le contenu en flavonoïdes. La propolis rouge brésilienne, qui contient des benzophénones, des diterpènes et des triterpènes, ne sera pas évaluée de façon adéquate par ces méthodes. Il est nécessaire d'identifier les composants avant de chercher les teneurs en produits actifs. Les méthodes chromatographiques restent de meilleures méthodes d'analyse pour l'identification et la quantification.

D'autres méthodes d'analyses de propolis incluent l'identification d'acides aminés, qui peuvent provenir du pollen fréquemment inclus dans la propolis. La présence de métaux est évaluée par la fluorescence aux rayons X. Bien que les taux de plomb retrouvés dans la propolis excèdent les taux normalement autorisés pour la nourriture, la grande majorité du plomb se retrouve dans le résidu insoluble après extraction éthanolique et on se retrouve ainsi avec un extrait presque exempt de plomb.

### **2.1.2.3. Analyses chromatographiques d'extraits de propolis**

De nombreuses techniques de chromatographie sont utilisées pour les échantillons de propolis. La chromatographie sur colonne ouverte a été utilisée dans de plus anciennes études pour les lignanes et les acides diterpéniques de la propolis provenant de la région de Parana. La chromatographie sur colonne ouverte permet de séparer tous les types de constituants de la propolis, ce qui permettrait à terme de séparer chaque constituant afin de déterminer son activité biologique. L'extraction liquide/liquide a également été utilisée à cette fin.

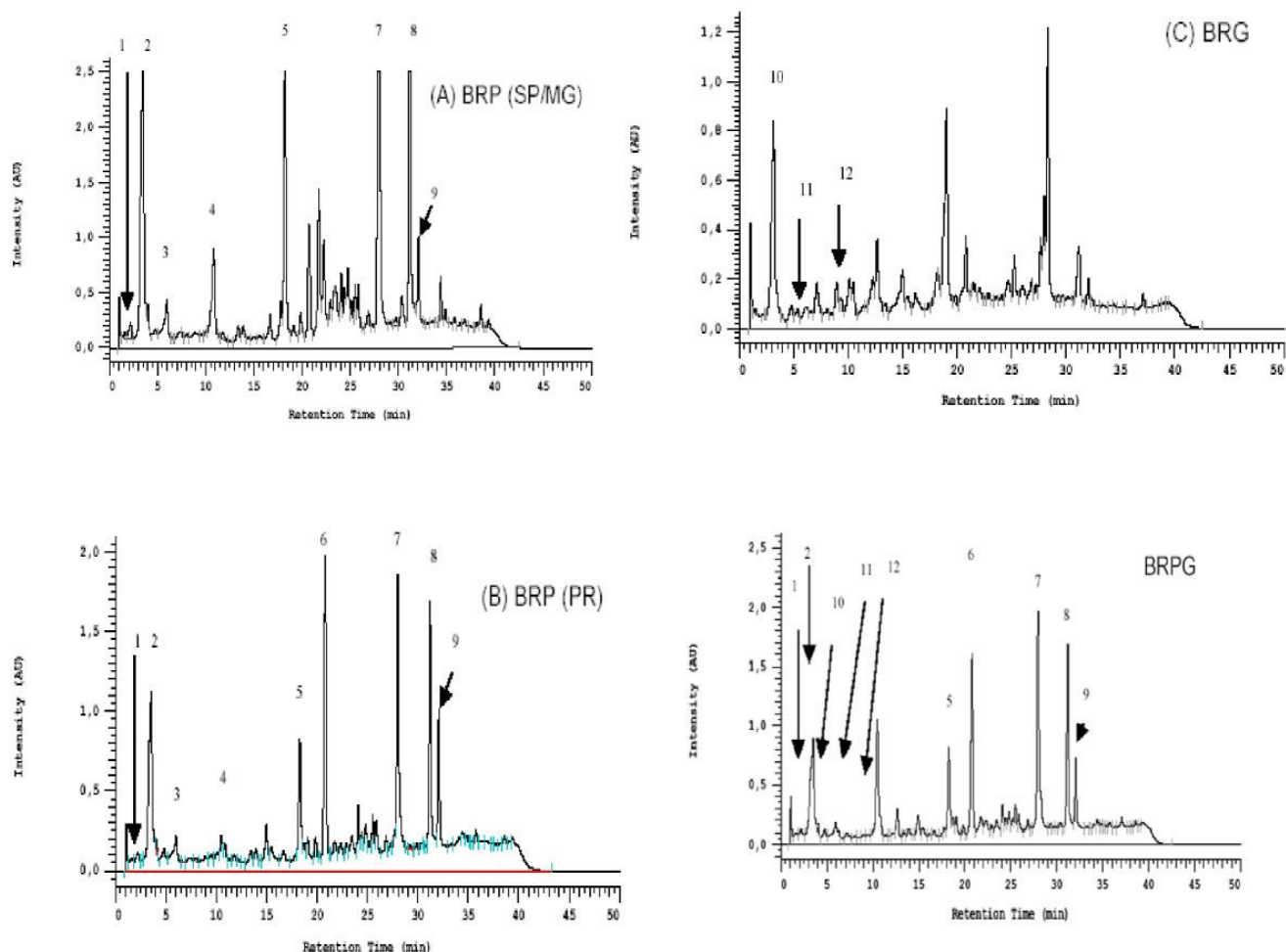
La chromatographie en couche mince peut être réalisée pour comparer différents échantillons de propolis ou différents extraits d'un même échantillon de propolis. On peut évaluer directement l'action antibactérienne, antifongique et antioxydante par CCM. L'utilisation de la CCM peut être problématique car il y a un très grand nombre de composants chimiques dans la propolis et la CCM ne permet pas de tous les séparer correctement.

La chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse ont été appliquées avec succès pour l'analyse d'huiles essentielles produites dans le batumen des mélipones et des trigones (42) et les composés volatils de la propolis de diverses régions du Brésil (43). De

plus, pour la plupart des composés polaires retrouvés dans l'extrait alcoolique de propolis, la dérivation avec le BSTFA a été nécessaire. Le BSTFA est utilisé en chimie organique pour lier un groupe triméthylsilyle  $-Si(CH_3)_3$  sur un groupe fonctionnel labile afin de protéger ce dernier lors de réactions d'analyse ou de synthèse ultérieures.

Cette dérivation a gêné la recherche de composés dans des bases de données car de nombreux composants étaient présents en tant que mono, di et tri-triméthylsilyle.

Étant donné que les composants de la propolis sont extractibles par l'alcool ou par des solutions hydro-alcooliques, on peut utiliser la chromatographie liquide haute performance en phases inversées. Elle est en fait devenue le moyen le plus utilisé dans l'analyse de la propolis. Les phénols et les flavonoïdes émettent dans le domaine UV et sont donc facilement détectables avec un détecteur à barrettes de diodes ou, DAD. Ce détecteur est composé d'une rangée de diodes, chacune indiquent l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde. Cette méthode a également été testée avec succès pour les composants isolés en chromatographie en colonne ouverte. En revanche les terpènes ont une faible absorption et sont parfois indétectables, il faudra donc plutôt utiliser une autre méthode de détection, comme la spectrométrie. (25)



**Tableau 3: Profils des échantillons testés selon la method HPLC-DAD ode: A) BRP/propolis verte de São Paulo et Minas Gerais, B) BRP/propolis verte de Paraná, C) BRG/propolis brune de Paraná et Santa Catarina, et D) mélange de BRPG propolis verte et brune de Paraná**

Composés: (1) acide caféique, (2) acide p-coumarique, (3) acide dicaféoylquinique, (4) dihydrokampféride, (5) acide 3-prenyl-4-hydroxycinnamic, (6) acide 2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-

propenoïque, (7) acide 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamique, (8) acide 2,2-diméthyl-8-prenyl-2H-1-benzopyran-6-propenoïque, (9) acide 3-prenyl-4-dihydrocinnamoyloxy cinnamique, (10) vanilline, (11) 3-méthoxy-4-hydroxycinnamaldehyde et (12) viscidone. (25), adaptation des travaux de Marcucci *et al.*, (44)

#### **2.1.2.4. Spectrométrie de masse avec sonde d'insertion directe (ESI(-)-MS)**

La recherche de méthodes analytiques de plus en plus rapides a conduit à l'utilisation de la spectrométrie de masse avec sonde d'insertion directe. La plupart des composés bioactifs de la propolis contiennent des groupements phénol, ainsi, la spectrométrie de masse avec ionisation par électronébulisation (électrospray) montre les meilleurs résultats pour différencier les différents échantillons (propolis verte du Brésil, propolis brune, propolis rouge) (45).

L'ESI(-)-MS (electrospray ionisation with mass spectrometry) a été utilisée pour analyser l'effet de différents temps de macération d'échantillons de propolis. C'est avec cette technique qu'on a pu mettre en évidence la similitude de la composition qualitative des composés recueillis par extraction à l'éthanol et à l'huile.

La combinaison des temps de rétention de chromatographie et de la dissociation induite par collision permet une identification claire des composés.

Cette méthode d'ESI(-)-MS est également d'une grande utilité pour comparer la composition de différents extraits de propolis.

Cette méthode a été également utilisée sur du batumen de *Tetragonisca angustula* (une abeille sans dard connue sous le nom de « jataí » du sud, sud-est et nord-est du Brésil). Les résultats étaient surprenants, car certains marqueurs ioniques étaient constamment trouvés dans tous les échantillons, ce qui signifie que la même plante a été la source de la résine utilisée dans toutes les régions (*Schinus terebenthifolius*), et ces composés étaient surtout présents dans la fleur. On a alors utilisé cette méthode sur divers échantillons de batumen d'abeilles sans dard (mélipones et trigones), et les résultats ont ensuite été analysés par Analyse en Composantes Principales, ou PCA. Il s'agit d'une méthode statistique qui permet de transformer des variables liées entre elles en variables décorrélées. On a pu ainsi classer les échantillons en trois groupes distincts selon leur marqueur ionique, qui se rapportent aux résines de plantes trouvées dans la région. La comparaison de cériumen d'abeilles *Scaptotrigona* collecté sur plusieurs mois par cette méthode ESI(-)-MS montre que la composition varie selon l'espèce d'abeille, le mois de la collecte et la flore locale.

La méthode Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) est une nouvelle méthode très rapide qui permet d'ioniser directement une gouttelette d'extrait éthanolique sans dissolution. Cela prend environ une minute par échantillon. Cette méthode a été utilisée sur 49 échantillons provenant de différents continents et a montré sensiblement les mêmes résultats qu'avec l'ESI(-)-MS.

L'ESI(-)-MS est une méthode rapide et efficace pour la caractérisation de la propolis, bien qu'il soit nécessaire de faire une séparation chromatographique pour la quantification et l'identification claire des composants. Les techniques de chromatographie rapides, comme la chromatographie liquide à ultra-haute pression couplée à une spectrométrie de masse seront utiles pour la composition rapide des composés de la propolis dans un futur proche. (25)



## **2.2. Conclusion des analyses physico-chimiques**

L'utilisation de la propolis rend nécessaire l'identification de ses composés actifs, non seulement dans un but de recherche mais également pour garantir sa qualité. De plus, la propolis étant un produit naturel, comme beaucoup d'autres, elle possède une activité complexe qui s'explique en partie par la synergie de ses composants bioactifs. Ainsi, il devient nécessaire de distinguer les types de propolis et leurs complexes de composition pour garantir une activité biologique spécifique.

Cette nécessité a permis de faire évoluer les méthodes analytiques appliquées à cette matière résineuse, afin de déterminer lesquelles sont les plus appropriées.

Les méthodes chromatographiques ont été utilisées pour séparer les complexes de propolis en fractions, isoler et aider à quantifier et identifier les composés de la propolis. Les techniques comme celle de l'ESI-MS peuvent être appliquées pour la caractérisation des échantillons et la détermination des plantes à l'origine des échantillons, mais la chromatographie reste nécessaire pour la quantification des composés.

C'est pourquoi les techniques de chromatographie rapides couplées à la spectrométrie de masse devraient être la pierre angulaire des futures recherches et contrôles de qualité sur les produits à base de propolis.

Malgré les progrès des techniques d'analyse chimique de la propolis, il faut garder à l'esprit qu'en raison de la complexité de son action, de la synergie de ses composants et de la grande variabilité de son activité biologique, des essais sur les animaux restent nécessaires. (25)

## **2.3. Variation de la propolis dans sa composition et son activité biologique**

La composition complexe de la propolis peut expliquer en partie pourquoi les mêmes types de propolis présentent parfois des résultats contradictoires (par exemple, la propolis verte peut avoir une activité plutôt orientée anti-inflammatoire, anti-allergique ou immunostimulante). Un autre paradoxe se présente pour son activité anti-cancéreuse et sa faible toxicité, et est probablement dû à la composition complexe des échantillons. Les effets protecteurs peuvent être corrélés à l'action antioxydante et immunomodulatrice des composants de la propolis.

Bien qu'il soit nécessaire de mener des études pour déterminer l'activité de tous ces composants et leurs mécanismes d'action, on doit garder à l'esprit la possibilité de synergie entre eux.

Autrefois, on ne s'attendait pas à une composition très variée de la propolis, et les flavonoïdes et phénols étaient considérés comme les composants bioactifs principaux. Ce concept a bien changé. Toutes les futures études devront être précises quant au type d'abeille et aux sources de plantes utilisées pour la propolis en question, car il est à présent clair que ces facteurs déterminent sa composition et son activité biologique. (25)

Dans la monographie de la propolis, il est d'ailleurs précisé qu'en raison de cette grande variabilité dans les échantillons de propolis, les médicaments à base de propolis ne



peuvent être comparés car la propolis utilisée peut être très différente d'une marque à l'autre. (3)

Sforcin *et al.* (46), dans leurs travaux, analysent la variation physico-chimique entre des échantillons de propolis brésilienne récoltés à différentes saisons. Ils concluent qu'il n'y a que d'infimes différences entre ces échantillons, et que de plus, ces différences ne sont que quantitatives. La variation doit donc provenir essentiellement du lieu géographique de la récolte, et donc de la flore qui s'y situe.

Cette variation en fonction de l'aire géographique où la récolte de la propolis a lieu joue un rôle de premier ordre (47). C'est bien ce paramètre qui possède la plus grande influence sur le contenu en composés chimiques de la propolis, et par là, sur son influence. Ainsi, lors de tests réalisés sur la propolis, on précisera toujours son origine géographique aussi précisément que possible. Et notamment, l'activité pharmacologique de la propolis est généralement plus importante dans les régions tropicales que dans les climats tempérés, car la biodiversité végétale y est considérablement plus riche (48).

Bien que cette thèse se concentre essentiellement sur la propolis produite par *Apis mellifera*, la plus simple à récolter en quantités abondantes et donc la plus prometteuse pour un usage médical courant, il faut garder à l'esprit que d'autres abeilles, que nous décrivons dans le chapitre suivant, propolisent elles aussi. La variation d'une espèce d'abeille à l'autre entraîne bien évidemment elle aussi une variation dans la composition de la propolis (16).

## **2.4. Conservation**

Il semblerait qu'il soit préférable de stocker la propolis dans des récipients opaques, afin qu'elle soit à l'abri de la lumière. Ces récipients doivent être fermés et à l'abri de la chaleur (2).

### **3. Troisième partie : Propriétés thérapeutiques de la propolis**

### 3.1. Influence sur les paramètres sériques

BIOCHEMICAL DETERMINATION	G1	G2	G3
Total protein (g/dL)	11.57 ± 1.84	10.85 ± 1.06	12.67 ± 1.00
SOD (U/mg protein)	16.71 ± 1.53	23.46 ±* 3.01	13.28 ± 4.33
ALT (U/L)	33.60 ± 0.65	31.77 ± 0.55	32.46 ± 2.30
Amylase (U/dL)	152.19 ± 2.14	151.83 ± 2.56	151.84 ± 1.68

Tableau 4: Influence de la propolis sur les protéines totales sériques, la superoxyde dismutase, l'alanine aminotransférase et l'amylase. (49)

Le test de Tukey met en évidence le fait que les valeurs trouvées sont significativement différentes.

ALT : Alanine aminotransférase

SOD : Superoxyde dismutase

Les paramètres ont été relevés 24h après administration, pour G1 de sérum physiologique, pour G2 de solution hydro-alcoolique seule, pour G3 d'extrait de propolis dans une solution hydro-alcoolique à 10%.

Ainsi qu'on peut le constater, La SOD est augmentée dans le groupe qui a reçu la solution hydro-alcoolique témoin, mais pas dans le groupe qui a reçu la solution de propolis. La SOD est un indicateur de la présence de radicaux libres.

On ne remarque pas de modification de l'ALT, de l'amylase, ni des protéines totales, ce qui signifie qu'il n'y a pas de dommages au niveau du foie ou du pancréas.

La même équipe de chercheurs est allée plus loin en testant également les taux sériques des rats concernant les protéines totales, l'urée, le glucose, la créatinine, le cholestérol, les triglycérides, les aminotransférases, la lactate-déshydrogénase (LDH). La variation saisonnière de l'effet de la propolis est également évaluée. Les tests sont, là encore, réalisés avec une solution hydro-alcoolique de propolis à 10%.

BIOCHEMICAL DETERMINATIONS	CONTROL	ALCOHOL	SPRING	SUMMER	AUTUMN	WINTER	STATISTICAL ANALYSE
AST (U/L)	29.60 (1.14)	36.20* (2.95)	30.80 (3.77)	30.40 (1.14)	31.40 (2.07)	33.00 (1.87)	F = 5.17 p<0.01
ALT (U/L)	30.00 (2.55)	31.40 (4.88)	31.40 (2.97)	30.80 (1.48)	30.60 (2.51)	31.60 (3.05)	F = 0.20 p>0.50
LDH (U/L)	1204.00 (25.35)	1342.80 (428.33)	1219.00 (75.70)	1185.00 (263.15)	1278.00 (312.20)	1135.00 (135.74)	F = 0.43 p>0.50
TOTAL PROTEIN (g/dL)	6.04 (0.25)	5.96 (0.27)	6.06 (0.09)	6.30 (0.47)	6.14 (0.18)	6.18 (0.19)	F = 0.99 p>0.10
GLUCOSE (mg/dL)	66.00 (7.00)	63.80 (4.51)	69.80 (4.28)	63.60 (8.24)	67.80 (5.15)	70.10 (3.40)	F = 1.26 p>0.10
UREA (mg/dL)	51.20 (3.77)	46.40 (10.43)	48.60 (5.37)	50.80 (3.77)	50.80 (4.27)	48.40 (5.77)	F = 0.49 p>0.50
CREATININE (mg/dL)	0.55 (0.03)	0.53 (0.05)	0.57 (0.07)	0.51 (0.08)	0.51 (0.06)	0.57 (0.09)	F = 0.64 p>0.50
TRIGLYCERIDES (mg/dL)	109.40 (18.44)	108.60 (34.78)	110.60 (22.04)	110.74 (32.48)	102.00 (22.06)	102.50 (12.97)	F = 0.13 p>0.50
CHOLESTEROL (mg/dL)	57.00 (5.24)	60.00 (5.15)	59.00 (4.90)	58.80 (5.50)	60.80 (6.46)	59.20 (5.40)	F = 0.28 p>0.50
HDL-CHOLESTEROL (mg/dL)	29.60 (4.72)	27.00 (6.71)	29.40 (2.61)	27.00 (3.87)	29.00 (2.00)	29.80 (1.79)	F = 0.52 p>0.50

Results are expressed as means  $\pm$  (SD) of 7 animals.

Values significantly different by Tukey test are shown: \*p<0.05.

**Tableau 5: Détermination biochimique de plusieurs paramètres sériques (49)**

Voici la répartition des rats testés :

- G1 : extrait de propolis récoltée au printemps
- G2 : extrait de propolis récoltée en été
- G3 : extrait de propolis récoltée en automne
- G4 : extrait de propolis récoltée en hiver
- G5 : solution hydro-alcoolique témoin pour évaluer l'effet du solvant seul sur les paramètres sériques des rats testés
- G6 : Sérum physiologique

L'administration de propolis chez les rats n'a pas causé de changements dans les niveaux sériques suivants :

- Protéines totales
- Glucose
- Urée et créatinine, ce qui signifie qu'il n'y a pas de souffrance rénale
- Triglycérides, cholestérol total et cholestérol HDL
- LDH (lactate deshydrogénase). Steinebach et Wolterbeek ont démontré que la LDH était un marqueur de viabilité cellulaire. (50) C'est également un marqueur de

souffrance de certains organes, notamment le cœur, selon les travaux de Cohen *et al.* (51)

- AST (aspartate aminotransférase) et ALT (alanine aminotransférase).

A nouveau, l'absence de variation de l'alanine aminotransférase et de l'amylase vont dans le sens de cette déduction : la propolis n'endommage pas le foie ni le pancréas.

Cependant, on peut noter une augmentation des aspartates aminotransférases chez le rat traité à la solution hydro-alcoolique témoin, augmentation que l'on ne retrouve pas chez les groupes traités à la solution contenant la propolis. On peut donc en déduire un effet protecteur de la propolis qui a contrebalancé les effets de l'alcool contenu dans la solution.

Aucun effet de variation des paramètres n'a été observé selon la saison de récolte de la propolis. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « variation de la propolis dans sa composition et son activité biologique », les différences en composés de propolis récoltées à différentes saisons sont infimes et seulement quantitatives (52). Ce peu de changements selon les saisons peut expliquer l'absence de variation également dans les tests *in vivo*.

### 3.2. Effet antibactérien

L'effet bactéricide de la propolis et de ses constituants est celui qui reste le plus largement documenté. Les études portent sur différents germes, aérobies et anaérobies, Gram positifs ou Gram négatifs, et portent pour la plupart sur des souches impliquées dans des pathologies des sphères otorhinopharyngée, gastro-intestinale, génitale ou buccale, autant de sphères sur lesquelles la recherche se penche à la recherche de nouveaux moyens médicaux. (4) La première étude sur l'activité antiseptique de la propolis a été réalisée par Kivalkina en 1948 (53). Il détecta une activité bactériostatique sur *Staphylococcus aureus*, le bacille thyphoïde et d'autres pathogènes.

Le mécanisme de l'activité bactériostatique et bactéricide de la propolis semble lié à son action d'inhibition de la synthèse protéique et inhibitrice de la division cellulaire. (54) Havsteem *et al.* suggèrent que certains composants spécifiques de la propolis inhibent la synthèse de protéines et la croissance bactérienne en empêchant la division cellulaire, ce qui donne lieu à des formes de bactéries pseudo-multicellulaires. Ainsi, la galangine et l'acide caféique sont des agents d'inhibition enzymatique responsables d'une inhibition de la croissance et de la prolifération bactérienne. (55) De plus, certaines substances actives de la propolis désorganisent la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire, ce qui conduit à une bactériolyse. Les flavonoïdes affectent le potentiel de la membrane bactérienne et causent une altération de la perméabilité (56). Les propriétés lipophiles inhérentes des terpénoïdes leur confèrent une affinité avec les membranes ; le trans-nérolidol est un composant connu pour augmenter la perméabilité plasmique chez les bactéries (*S. aureus* et *E. coli*). De plus, les sesquiterpénoïdes (nérolidol, farnésol, bisabolol, apitone) peuvent rompre l'effet de barrière de la membrane des bactéries, ce qui permet de faciliter l'assimilation d'exogènes comme les antibiotiques. Cet effet est d'ailleurs plus prononcé chez les bactéries à Gram positif, sans doute à cause de l'absence de barrières supplémentaires sur la membrane externe, contrairement aux bactéries à Gram négatif. (57) Takaisi-Kikuni et Schilcher révèlent que l'inhibition de l'ARN-polymérase par certains composants de la propolis est probablement associée à leur perte de capacité à lier l'ADN. (58) Enfin, la propolis aurait la capacité d'inhiber la mobilité bactérienne. (59)

Les propriétés antibactériennes de la propolis sont donc liées à ses composants, et il convient d'ajouter qu'il y a un effet de synergie entre ces composants. (60)

De nombreuses études prouvent que les effets antibactériens d'extraits de propolis varient selon la région géographique, car la composition même de la propolis change selon la région dont elle est issue.

Seidel *et al.* (61) ont collecté, pour les étudier, quarante échantillons de propolis collectés dans différentes régions du monde. Les échantillons de propolis provenant d'Afrique et d'Asie ont une activité antibactérienne modérée, avec des CMI variant entre 0.0156 et >0.5 mg/mL (Afrique) et 0.0078 à >0.5 mg/mL (Asie). Les échantillons d'Amérique du Nord, d'Amérique du Sud et d'Europe ont une MIC de 0.125 à >0.5 mg/mL.

On observera également une différence d'efficacité selon la souche bactérienne testée. De façon générale, l'action de la propolis sur les bactéries à Gram-positif est supérieure à celle, plus modeste, que l'on peut observer sur les bactéries à Gram-négatif. (62) Voici un tableau qui donne quelques zones d'inhibition obtenues pour des bactéries à Gram positif ou négatif. Ce tableau n'a pas ici pour vocation de présenter toutes les souches de bactéries sensibles à l'action de la propolis, mais d'offrir un ordre d'idée quant aux sensibilités comparées des bactéries selon qu'elles sont à Gram positif ou négatif.

**Table 1.** Antimicrobial activity of ethanolic extracts of 13 propolis samples obtained from different regions of Serbia

Region where propolis was collected	Zone of inhibition of microbial growth (mm) without the size of the hole												
	Gram-positive bacteria						Gram-negative bacteria				Yeast		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Čačak	9	9	6	6	9	10	/	/	/	6	7	5	4
Zaklopača	10	13	8	7	11	12	/	/	1	6	10	7	6
Raška	9	12	8	6	11	12	/	1	1	6	10	5	5
Vlasotince	9	12	7	6	10	13	/	/	/	4	10	6	5
Surčin	9	12	8	7	10	13	/	/	/	4	12	5	5
Pančevo	9	12	8	7	12	13	/	/	/	4	11	5	5
Kragujevac	10	12	7	6	13	12	/	/	/	5	11	6	5
East Serbia 1	9	12	8	6	11	12	/	/	/	2	10	5	5
East Serbia 2	10	11	7	6	13	12	/	1	/	5	10	5	5
East Serbia 3	10	12	8	7	10	12	/	/	/	4	11	6	5
East Serbia 4	10	12	8	7	10	12	1	1	1	2	10	6	6
Plandište	9	10	7	6	10	10	/	/	/	2	10	6	5
Aleksinac	11	12	7	6	10	11	1	2	1	6	11	6	5

1 = *S. epidermidis* ATCC 14990; 2 = *S. aureus* ATCC 25923; 3 = *S. sciuri* ATCC 29062; 4 = *E. faecalis* ATCC 29212; 5 = *B. subtilis*; 6 = *L. monocytogenes* SLCC 2375; 7 = *E. coli* ATCC 25922; 8 = *P. aeruginosa* ATCC 27853; 9 = *S. marscenscens*; 10 = *P. stuartii*; 11 = *C. guilliermondii*; 12 = *C. parapsilosis*; 13 = *C. albicans*

**Tableau 6:** Activité antiseptique d'extrait éthanolique de propolis (63)

Une autre constatation intéressante est la piste qu'ont étudiée MM. Al-Waili *et al.*, et selon laquelle les cultures polymicrobiennes seraient plus sensibles à l'action de la propolis (ici, issue d'Arabie Saoudite) que les cultures bactériennes isolées (étude réalisée sur *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans*).

Pathogène	Culture de contrôle	CMI de la propolis sur la culture de la bactérie seule	CMI de la propolis sur culture polymicrobienne			
			E. coli + C. albicans	E. coli + S. aureus	C. albicans + S. aureus	E. coli + C. albicans + S. aureus
<b>E. Coli</b>	Forte croissance	0.15	0.15	0.15	*	0.15
<b>S. aureus</b>	Forte croissance	0.15	*	0.10	0.10	
<b>C. albicans</b>	Forte croissance	0.20	0.20	*	0.18	0.15

Tableau 7: CMI(%) de la propolis en solution dans l'alcool éthylique pour des cultures isolées ou polymicrobiennes. (64)

Pathogène	Culture de contrôle	CMI de la propolis sur la culture de la bactérie seule	CMI de la propolis sur culture polymicrobienne			
			E. coli + C. albicans	E. coli + S. aureus	C. albicans + S. aureus	E. coli + C. albicans + S. aureus
<b>E. Coli</b>	Forte croissance	0.15	0.20	0.20	*	0.20
<b>S. aureus</b>	Forte croissance	0.15	*	0.15	0.15	0.15
<b>C. albicans</b>	Forte croissance	0.20	0.20	*	0.20	0.20

Tableau 8: CMI (%) de la propolis en solution sans alcool pour des cultures isolées ou polymicrobiennes. (64)

Selon cette même équipe, il y aurait tout intérêt à associer la propolis avec le miel lorsqu'elle est utilisée pour son action antibactérienne, car ces deux produits de la ruche agiraient en synergie. Là encore, pour les trois souches en question, les résultats sont effectivement assez probants.

Pathogène	CMI de la propolis seule		CMI de la propolis associée au miel	
	Provenant d'Arabie Saoudite	Provenant d'Egypte	Provenant d'Arabie Saoudite	Provenant d'Egypte
E. coli	0.15	0.25	0.08	0.20
S. aureus	0.15	0.15	0.08	0.15
C. albicans	0.20	0.22	0.10	0.20

Tableau 9: Comparaison de la CMI obtenue (%) de la propolis collectée en Arabie Saoudite et en Egypte, seule ou en association avec du miel. (64)

Cependant, la recherche médicale ne se limitera pas à l'étude de la propolis seule (ou associée au miel) sur des souches bactériennes. L'idée sera de l'utiliser en synergie avec des antibiotiques déjà existants si les études de ce sujet montrent des résultats probants. Or,

certaines études *in vitro* indiquent un synergisme évident avec une claire diminution de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des antibiotiques testés (56) (65). Ainsi, la propolis Bulgare a été testée et a montré une activité antibactérienne et une synergie avec les antibiotiques agissant sur les ribosomes (66).

Lorsqu'on étudie plus particulièrement l'effet synergétique de la propolis avec d'autres antibiotiques, on s'aperçoit que l'effet bactéricide de la propolis est dû à une destruction de la structure de la paroi bactérienne et sur les fonctions ribosomiques, mais elle ne semble pas interagir avec les antibiotiques agissant sur l'ADN ou la biosynthèse de l'acide folique. (67) Cela étant dit, l'idée d'utiliser la propolis associée aux antibiotiques pour augmenter leur effet antibactérien semble prometteuse. (60) (63) Ainsi, on observe de très bons résultats avec des agents antibactériens qui interfèrent avec la synthèse des protéines bactériennes, comme le chloramphénicol, la gentamycine, la netilmycine, les tétracyclines et la clindamycine. (68)

### 3.2.1. Le Staphylocoque

Les espèces de Staphylocoque diffèrent par leur capacité à exprimer la coagulase, une enzyme qui permet la conversion de fibrinogène en fibrine. Par exemple, *S. aureus* ou *S. intermedius*. Les Staphylocoques qui ne produisent pas de coagulase sont désignés comme étant coagulase-négatifs (CoNS), et on y retrouve *S. epidermidis* ainsi que *S. saprophyticus*.

#### Effet de la propolis sur le Staphylocoque doré, *Staphylococcus aureus*

Le Staphylocoque doré coagulase-positif est un pathogène majeur responsable de nombreuses infections communautaires et hospitalières. Il cause des infections de la peau et des muqueuses, des sites chirurgicaux, mais aussi des endocardites et infections des articulations. (69)

Actuellement, les antibiotiques les plus utilisés pour cette bactérie sont les  $\beta$ -lactamines. Cependant, les souches résistantes de Staphylocoque sont un problème majeur de santé publique, car la bactérie peut aisément circuler dans l'environnement. *Staphylococcus aureus* a développé une résistance aux  $\beta$ -lactamines par synthèse de chromosomes ou de plasmides codant les  $\beta$ -lactamases.

Les souches de Staphylocoque doré résistants à la méthicilline (MRSA) sont encore plus problématiques pour le monde médical que les souches de Staphylocoques dorés sensibles à la méthicilline (MSSA). En effet, les options de traitements de ces souches résistantes sont limitées.

C'est donc naturellement qu'on va chercher à étudier l'impact d'une substance antibactérienne comme la propolis sur des souches de *Staphylococcus aureus*. L'étude de MM. Wojtyczka *et al* (70), au-delà de l'action de la propolis seule sur la bactérie, va se pencher sur l'impact de la synergie entre la propolis et divers antibiotiques sur le Staphylocoque doré.

Ils ont trouvé une CMI moyenne de  $0.54 \pm 0.22$  mg/mL, une CMI<sub>50</sub> de 0.39 mg/mL et une CMI<sub>90</sub> de 0.78 mg/mL. La CMB varie entre 0.78 mg/mL et 3.13 mg/mL.



Plus précisément, les valeurs de la CMI et de la CMB pour le Staphylocoque doré sensible à la méthicilline sont de  $0.59 \pm 0.21$  mg/mL et  $2.5 \pm 0.85$  mg/mL respectivement. Le Staphylocoque doré résistant à la méthicilline, lui, va présenter une CMI de  $0.52 \pm 0.2$  mg/mL et une CMB de  $2.35 \pm 1.21$  mg/mL.

Des études hospitalières ont révélé que les Staphylocoques pouvaient avoir une résistance variée face aux antibiotiques. En plus de sa résistance aux Beta-lactamines, le staphylocoque doré résistant à la méthicilline possède une résistance de plus en plus forte à d'autres groupes d'antibiotiques.

Wojtyczka *et al* (70) observent que les valeurs de CMB et CMI de la propolis contre le staphylocoque doré sensible ou résistant à la méthicilline sont très similaires, ce qui peut conduire à la conclusion que l'extrait de propolis possède une activité anti-staphylococcique non liée au beta-lactamines.

L'effet *in vitro* combiné de dix antibiotiques a ensuite été testé. Ces antibiotiques sont les suivants : ; FOX: Céfoxitine; DA: Clindamycine; E: Erythromycine; CIP: Ciprofloxacine; TE: Tétracycline; P: Pénicilline; TOB: Tobramycine ; LIN: Linézolide; C: Chloramphénicol; STX: Triméthoprime + Sulfaméthoxazole. La méthode utilisée est celle des disques de diffusion. Le test statistique ayant permis l'analyse des résultats est le test de Wilcoxon.

L'extrait de propolis a été ajouté à une concentration égale au quart de la CMI<sub>90</sub> (0,2mg/mL).

La sensibilité des souches de staphylocoque a significativement augmenté pour la clindamycine, la tétracycline, la tobramycine, la linézolide et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, attestant d'un phénomène de synergie. Dans le cas de la tétracycline et de l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, cette synergie est particulièrement forte, avec des disques d'inhibition plus larges de 11 à 12mm.

Une légère augmentation de la sensibilité a été observée pour la céfoxitine, l'érythromycine et la pénicilline, mais sans atteindre un seuil statistique permettant de déclarer cette augmentation comme significative.

L'extrait de propolis est connu pour contenir un certain nombre de composés antibactériens, comme les polyphénols et les flavonoïdes. La conclusion de MM. Wojtyczka *et al* (70) est que la synergie avec les antibiotiques observée dans cette étude peut être attribuée à ces composés naturels. Il a été prouvé que certains de ces composés, comme les polyphénols, exercent leur action à travers des perturbations de la membrane. Ces perturbations de la membrane cellulaire, couplées à l'action de transpeptidation des beta-lactamines, pourraient mener à une augmentation des effets antibactériens. (71)

### ***Staphylococcus epidermitis***

*S. epidermitis* est un microorganisme que l'on peut retrouver souvent sur la peau ou dans le milieu hospitalier, et il est souvent décrit comme un contaminant majeur. Il est considéré comme particulièrement dangereux chez les individus immunodéprimés, les hémodialysés et les porteurs de pacemakers ainsi que de cathéters lorsqu'il s'agit de longues périodes de port du dispositif. Il fait partie des Staphylocoques coagulase-négatifs, ou CoNS, lesquels peuvent présenter des résistances à la méthicilline. (72)

Les CoNS sont souvent mésestimés en raison de leur variabilité et, bien souvent, de leur faible virulence. Toutefois, l'émergence de souches résistantes mène à une grande difficulté dans le traitement de ces bactéries. En effet, on a observé chez *S. epidermitis* des résistances à l'amoxicilline et la méthicilline, ainsi qu'à la vancomycine et la rifampicine *in vitro*.

On pense que la capacité de *S. epidermitis* de former des biofilms à la surface d'implants médicaux est un de ses plus importants facteurs de virulence. (73) L'efficacité des médicaments face à de tels biofilms est réduite.

La propolis peut représenter une solution à ce problème médical, car il a été prouvé qu'elle possède une forte activité contre les Staphylocoques à coagulase négative, laquelle serait principalement due à ses composés phénoliques. (74) Toutefois, les études de Najmadeen et Kakamand montrent que les souches de *S. epidermitis* sont moins susceptibles à l'action de l'extrait de propolis que les Staphylocoques à coagulase positive. (75) Bien sûr, cet effet varie selon les sources de propolis et le type d'extraction utilisé. (76)

Voilà pourquoi MM. Wojtyczka *et al.*, dans une autre étude (77), se proposent d'étudier les effets de la propolis face à de tels biofilms *in vitro*. La méthode de détermination de la CMI est celle des dilutions en série, sur microplaques. Sur différentes souches étudiées, la CMI moyenne est de  $1.13 \pm 0.39$  mg/mL, la CMI50 de 0.78 mg/mL et la CMI90 de 1.56 mg/mL.

L'analyse de la croissance des souches de *S. epidermitis* dans un milieu contenant de l'extrait de propolis et dans un milieu exempt de propolis montre que la bactérie se développe de manière similaire dans ces deux milieux durant les deux premières heures d'incubation. En revanche, dans les heures suivantes, les résultats sont plus surprenants.

**Voir Annexe 2 : Croissance dans le temps de différentes souches de *S. epidermitis* en présence de concentrations croissantes d'extrait hydro-alcoolique de propolis**

Cette analyse révèle qu'à de basses concentrations, variant selon le temps d'incubation (0.025–0.05 mg/mL pour six heures, 0.025–0.39 mg/mL pour douze à vingt-quatre heures), la prolifération bactérienne est supérieure à celle de la solution témoin, tandis qu'à de plus fortes concentrations, elle a significativement diminué. L'augmentation transitoire de la croissance bactérienne sur la courbe peut être causée par la présence de nutriments dans l'extrait de propolis, agissant comme un stimulant de cette croissance.

**Voir Annexe 3 : Capacité de formation de biofilms de différentes souches de *S. epidermitis* en présence de concentrations croissantes d'extrait hydro-alcoolique de propolis (77)**

La capacité de *S. epidermitis* à former des biofilms a été inhibée par des concentrations d'extraits de propolis allant de 0,39 à 1,56 mg/mL quel que soit le temps d'incubation.

Cette étude met en évidence la diversité des effets que la propolis peut exercer sur certaines souches bactériennes. Dans cette étude, sa CMI sur *S. epidermitis* varie de 0,78 à 1,56 mg/mL.

Il est intéressant de remarquer que la CMI après 12 heures d'incubation varie de 0,2 à 0,39 mg.mL, tandis que la CMI après 24 heures d'incubation varie, elle, de 0,39 à 0,78mg/mL, ce qui suggère que l'activité de la propolis diminue dans le temps.

Dans cette étude, l'effet d'inhibition de la formation du biofilm chez la majorité des souches de *S. epidermitis* testées a été observé après 12 à 24 heures d'incubation, et il est corrélé avec les valeurs de CMI. On notera qu'après 12 heures d'incubation, aux concentrations de propolis les plus basses, l'effet inverse est observé, ce qui suggère un effet stimulant de la propolis sur la formation de biofilms.

De plus, parmi les bactéries survivantes, celles dont le nombre a été le plus réduit ont été les bactéries sous forme planctonique. Les auteurs pensent que l'extrait de propolis agit d'avantage sur les bactéries que sur la structure du biofilm elle-même.

Les résultats encourageants de cette étude poussent MM. Wojtyczka *et al* à conseiller l'application d'extrait de propolis sur la peau et/ou la muqueuse buccale comme traitement prophylactique contre les infections à *S. epidermitis*.

### **Autres Staphylocoques :**

Grâce à MM. Stepanović *et al.*, on connaît également les CMI de *Staphylococcus xylosus* (0,31µg/mL), de *Staphylococcus lentus* (0,31µg/mL), *Staphylococcus sciuri* (0,16µg/mL) et *Staphylococcus intermedius* (0,31µg/mL).

### **3.2.2. Le Streptocoque**

#### **Streptococcus mutans**

Le Streptocoque mutans est une bactérie de type cocci à Gram positif, qui se retrouve dans la bouche, faisant partie de la flore commensale (78). C'est la bactérie la plus souvent responsable de caries dentaires. Elle agit en présence de carbohydrates qu'elle métabolise en produisant de l'acide lactique, qui entame l'émail des dents. Une relation a d'ailleurs été établie entre le nombre de *S. mutans* présents dans la plaque dentaire et le nombre de caries (79). En l'absence d'un traitement satisfaisant, les caries peuvent conduire à une douleur, une infection, une perte de dents et, dans les cas sévères, la mort (80).

Dans une étude, MM. Ophori *et al.* (81) évaluent l'activité d'extrait éthanolique de propolis sur la bactérie *S. mutans* isolée de caries dentaires. Ils utilisent comme méthode la diffusion sur agar.

La propolis possède une forte activité antibactérienne contre *S. mutans* à des concentrations de 4, 8, 116 et 32µg/mL, les zones d'inhibition étant de  $10 \pm 4$ ,  $12 \pm 4$ ,  $20 \pm 2$  et  $24 \pm 2$  mm respectivement, contre une croissance moyenne, voire maximale pour les solutions témoin d'éthanol et d'eau (l'éthanol ayant exercé une faible activité bactériostatique et bactéricide). En revanche, il y a eu une croissance à des concentrations de 0,5, 1 et 2µg/mL.

Paramètres	Concentration en propolis (µg/mL)						
	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0	32.0
Extrait éthanolique de propolis	+++	++	++	-	-	-	-
Ethanol	+++	+++	+++	++	++	++	++
Eau	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tableau 10 : Propriétés inhibitrices de l'extrait éthanolique de propolis sur *S. mutans* (81)

Organisme	Zone d'inhibition (mm)	CMI (µg/mL)
<i>S. mutans</i>	6 ± 2	2
	10 ± 4	4
	12 ± 4	8
	20 ± 2	16
	24 ± 4	32

Tableau 11: CMI de l'extrait éthanolique de propolis sur *S. mutans* (81)

MM. Ophori et son équipe en déduisent que l'activité antibactérienne contre *S. mutans* de la propolis est conséquente, et qu'elle devrait être utilisée dans le traitement des caries dentaires, causées en majorité par *S. mutans*.

### *Streptococcus sanguinis*

*Streptococcus sanguinis*, une bactérie de type cocci à Gram positif présente dans la flore commensale buccale, peut causer des endocardites bactériennes. D'après MM. Cardinault *et al.*, elle est sensible à l'activité antibactérienne de la propolis. (4)

### 3.2.3. Les bacilles

Bien que l'efficacité de la propolis ait été nettement moins étudiée que pour les staphylocoques ou les streptocoques, on est en mesure d'affirmer que la propolis a bel et bien un effet sur *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. Cette efficacité se constate à 0.02% (v/v) dans l'étude réalisée par MM. Erkmén *et al* (82)., avec de la propolis turque.

*Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* sont toutes deux des bactéries de type bacille à Gram positif, ce qui en fait des cibles privilégiées pour la propolis, plus efficace sur les bactéries à Gram positif. Ces bacilles sont responsables de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques et d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques. (83) (84)

### 3.2.4. Les Proteus

*Proteus mirabilis* est une bactérie Gram négatif qui peuple habituellement l'intestin, le tractus urinaire et les reins, mais qui colonise parfois l'épiderme et la muqueuse de la bouche. Elle est très fréquente chez les personnes hospitalisées pour une période prolongée. *Proteus mirabilis* peut causer des infections urinaires, des infections de plaie, ou des surinfections diverses : tumeurs, voies respiratoires, etc.

Là encore, la bibliographie est assez faible, mais on peut retrouver dans les recherches de MM. Rhigi *et al.* (85) une CMI de 512 µg/mL lorsqu'on exerce l'action de la propolis sous forme d'extrait éthanolique sur *Proteus mirabilis*.

Dans leurs travaux, MM. Cardinault *et al.* (4) affirment également que la propolis possède un effet sur *Proteus vulgaris*.

### 3.2.5. Les Pseudomonas

L'utilité de la propolis à l'encontre des maladies nosocomiales s'exerce notamment grâce à son action antibactérienne à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa*, comme nous pouvons le constater dans l'étude de MM. Siripatrawan *et al.*, quoique l'activité mesurée soit moindre que celle exercée par la propolis sur *S. aureus* au cours de cette même étude (86), ce qui est logique, *Pseudomonas aeruginosa* étant une bactérie à Gram négatif. Ce bacille à Gram négatif se rencontre principalement dans les milieux humides (robinets, douches, nébuliseurs...) et provoque des infections graves (pulmonaires, septicémiques, urinaires) nécessitant l'utilisation d'antibiotiques coûteux et le plus souvent en association.

Mais la propolis a également une action sur *Pseudomonas keratitis* en association avec la ciprofloxacine (87). Toutefois, dans cette dernière étude, le sujet étudié est un animal (le lapin) et l'équipe de MM. Onlen *et al.* signale dans sa conclusion que la propolis ne peut se suffire à elle-même dans le traitement de *Pseudomonas keratitis*, et qu'elle doit rester associée à un traitement antibiotique. L'avancée que l'on pourrait obtenir n'est qu'une augmentation de l'efficacité de ce traitement, ce qui peut déjà constituer une avancée.

MM. Musa *et al.* ont montré une activité antibactérienne de la propolis sur *Pseudomonas fluorescens*, une bactérie susceptible de contaminer les fromages. (88)

Enfin, pour une idée plus globale de l'action de la propolis sur les *Pseudomonas*, Helaly *et al.* (89) se sont penchés sur la détermination de l'effet antibactérien et anti-biofilms du dexpanthenol et de la propolis avec ou sans association d'agents antibactériens. Six souches de *Pseudomonas* ont été isolées de blessures puis étudiées. MM. Helaly *et al.* ont constaté une forte baisse de l'adhésion du biofilm bactérien, même à de faibles concentrations d'extrait de propolis. La conclusion de cette équipe est que la propolis seule ou combinée des antibiotiques prévient la formation de biofilms de Staphylocoque et de *Pseudomonas*, favorisant ainsi la guérison des blessures dans un temps plus court.

### 3.2.6. Les Listeria

MM. Yang *et al.* (90) ont étudié l'impact d'une solution d'extrait hydro-éthanolique de propolis sur *Listeria monocytogenes* selon la concentration en extrait de propolis, et selon la température, le pH du milieu et l'âge des bactéries. Les résultats révèlent que l'extrait hydro-éthanolique de propolis exerce un effet bactéricide sur *L. monocytogenes* à la concentration de 7.5 µg/mL ou plus. La température a joué dans l'action qu'a pu exercer cet extrait de propolis : il a été plus efficace à 37°C. *L. monocytogenes* est également plus sensible à l'extrait de propolis en milieu acide qu'en milieu basique. Enfin, le stade de croissance bactérienne joue un rôle dans la sensibilité de la bactérie à la propolis, ainsi, les *L. monocytogenes* en milieu de phase exponentielle ont la plus grande sensibilité, suivies des *L. monocytogenes* en fin de phase exponentielle et de ceux en phase stationnaire.

*Listeria monocytogenes* est un bacille ubiquitaire à Gram négatif, responsable de la listériose, qui peut entraîner des méningites, des septicémies, des abcès cérébraux, des infections locales et qui est particulièrement dangereux pour la femme enceinte. (91)

### 3.2.7. Les Salmonella

La Salmonelle est une protéobactérie possédant un flagelle. Ce sont des bacilles à Gram négatif, ce qui est un facteur en faveur d'une moindre efficacité de la propolis. Avant de commencer ce chapitre sur l'action de la propolis sur la Salmonelle, il convient de rappeler la terminologie concernant celle-ci, car les risques de confusion sont importants. L'espèce *Salmonella enterica* possède plusieurs sérovars, dont les trois principaux sont Typhimurium, Enteritidis et Typhi (92). Ainsi, lorsqu'un article relate ses résultats sur *S. Typhi*, il s'agit bien de *Salmonella enterica* sérovar Typhi.

Les différents sérovars de Salmonelles sont responsables de maladies humaines allant de la gastroentérite bénigne à une fièvre entérique grave (93).

La résistance de cette bactérie à certains antibiotiques est un problème mondial, d'autant que cette résistance semble s'accroître pour différents types d'antibiotiques. (94) Voilà pourquoi l'utilisation de la propolis peut devenir un enjeu majeur du traitement de l'infection à salmonelles si son efficacité se montre convaincante.

#### ***Salmonella enterica* sérovar enteritidis :**

MM. Siripatrawan *et al.* ont testé l'activité de l'extrait hydro-éthanolique de propolis sur *Salmonella enteritidis*, en utilisant la méthode des disques de diffusion. Ils ont bel et bien observé une inhibition de la croissance bactérienne, quoique moindre que celle observée avec *S. aureus*, qu'ils ont testé également. (86) MM. Orsi *et al.*, eux, ont testé l'effet de la propolis issue de deux régions du Brésil. Leur conclusion est qu'il y a bel et bien une activité bactéricide, bien qu'il faille pour cela des concentrations assez élevées, dues au fait que *Salmonella enteritidis* est une bactérie à Gram négatif. (95) Ainsi, nous pouvons constater via ces travaux que la propolis a une activité bactériostatique et bactéricide envers *Salmonella enterica* sérovar enteritidis.

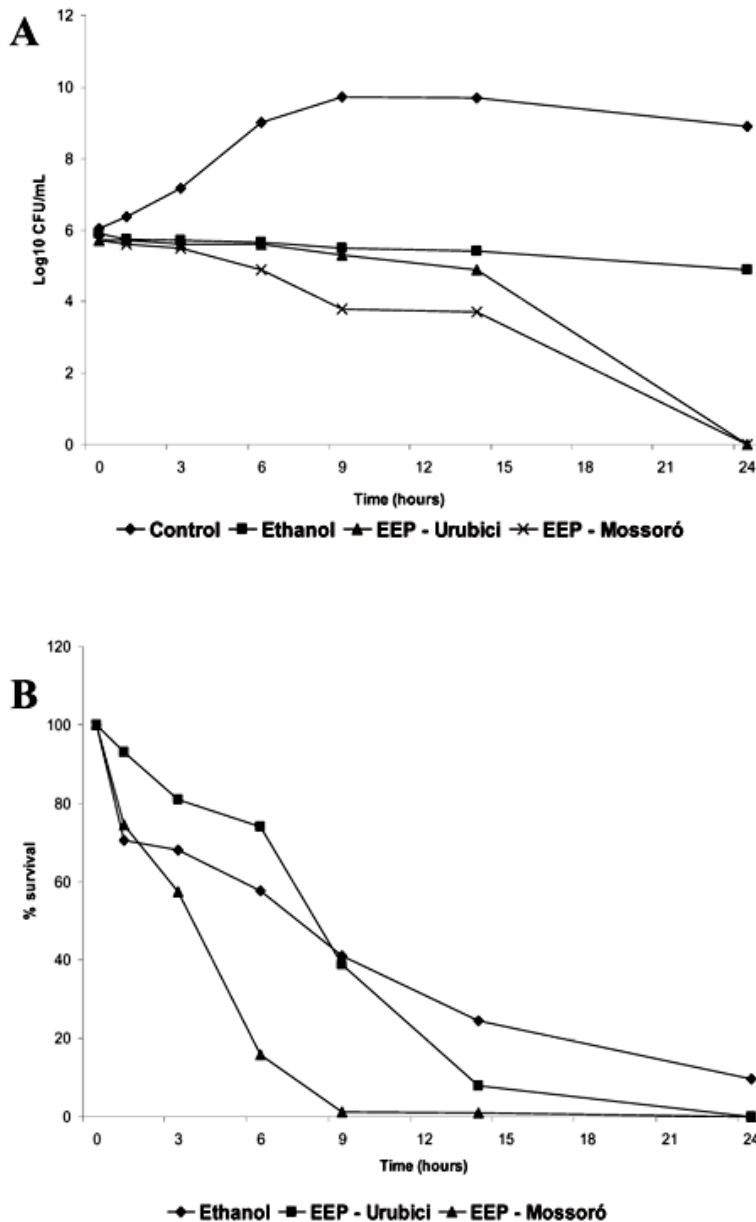


Figure 19: Profil en fonction du temps de l'analyse de la population (A) et de la courbe de survie (%Cfu/mL) (B) de *Salmonella enteritidis* selon la période d'incubation, en présence d'extrait de propolis à 10.0% (v/v) ou d'Ethanol à 70% (12.6% v/v). (95)

### *Salmonella enterica* sérovar typhi :

*Salmonella enterica* sérovar Typhi, est l'agent causant la fièvre typhoïde chez l'humain. Le traitement nécessite des antibiotiques, cependant leur usage intensif mène à l'apparition de souches résistantes (66). MM. Orsi *et al.* (96) donnent une CMI de 90% à 10.0% v/v, soit 247.mg/mL pour la propolis bulgare, et à 9.9% v/v, soit 260 mg/mL, pour la propolis brésilienne. Cette action est assez faible si on la compare à l'effet de la propolis sur des bactéries à Gram positif. Cependant, pour aller plus loin, MM. Orsi *et al.* ont étudié la possible synergie entre la propolis (ici, des échantillons collectés au Brésil et en Bulgarie) et divers antibiotiques. L'observation d'une synergie serait une avancée pour les traitements

actuellement proposés, car elle pourrait permettre de diminuer les doses d'antibiotiques administrés, et par là même, leurs effets secondaires.

Tout d'abord, une étude sur les antibiotiques agissant sur le ribosome : chloramphénicol, tétracycline et néomycine. La synergie a été étudiée en utilisant  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$  de la CMI de la propolis et de ces antibiotiques. La propolis Brésilienne n'a eu une activité bactériostatique que contre *S. Typhi*, alors que la propolis Bulgare a eu une activité bactéricide ainsi qu'une synergie avec les trois antibiotiques étudiés. Les variations d'activité peuvent s'expliquer par la variation de leur composition chimique. Sur la base de ces résultats, on peut affirmer que la propolis Bulgare peut devenir une possible stratégie thérapeutique contre l'infection à *Salmonella Typhi*.

Un autre travail fut effectué, cette fois, sur la synergie entre la propolis et les antibiotiques agissant sur l'ADN (ciprofloxacine et norfloxacine) (67), ainsi que sur les antibiotiques agissant sur le métabolisme (cotrimoxazole). La bactérie testée reste *Salmonella enterica* sérovar Typhi. La propolis utilisée est à nouveau collectée au Brésil et en Bulgarie, et les méthodes de test sont les mêmes. Cette fois, les deux types d'extrait de propolis ont eu une activité antibactérienne, mais pas de synergie avec les antibiotiques. La propolis garde une utilité en elle-même, mais l'associer avec la ciprofloxacine, la norfloxacine et le cotrimoxazole ne permet pas d'obtenir un effet de synergie.

Enfin, dans une troisième étude, MM. Orsi *et al.* se penchent sur d'autres antibiotiques : l'amoxicilline, l'ampicilline et la céfalexine, qui agissent, eux, sur la paroi cellulaire (96). La bactérie étudiée est encore *Salmonella Typhi*, et la propolis, d'origine brésilienne et bulgare. Les deux types d'échantillon ont eu une activité antibactérienne, avec une plus grande efficacité du côté de la propolis bulgare. Enfin, les deux propolis, brésilienne et bulgare, ont eu un effet synergistique similaire avec les antibiotiques testés. Cette information revêt une importance toute particulière, car les trois antibiotiques en question sont très largement utilisés à travers le monde.

### ***Salmonella enterica* sérovar typhimurium :**

Ce sont à nouveau MM. Orsi *et al.* (95) qui ont mené l'étude dont il va être question. L'activité de la propolis collectée dans deux régions du Brésil a été évaluée *in vitro* sur des *Salmonella enterica* de sérovar typhimurium isolé d'infections humaines. Le pourcentage de survie des souches diminue avec le temps d'incubation, montrant une activité bactéricide après 24 heures. Toutefois, selon cette équipe de chercheurs, les concentrations nécessaires pour obtenir un effet bactéricide restent néanmoins assez élevées ce qui est dû au fait que *Salmonella typhimurium* est une bactérie à Gram négatif.



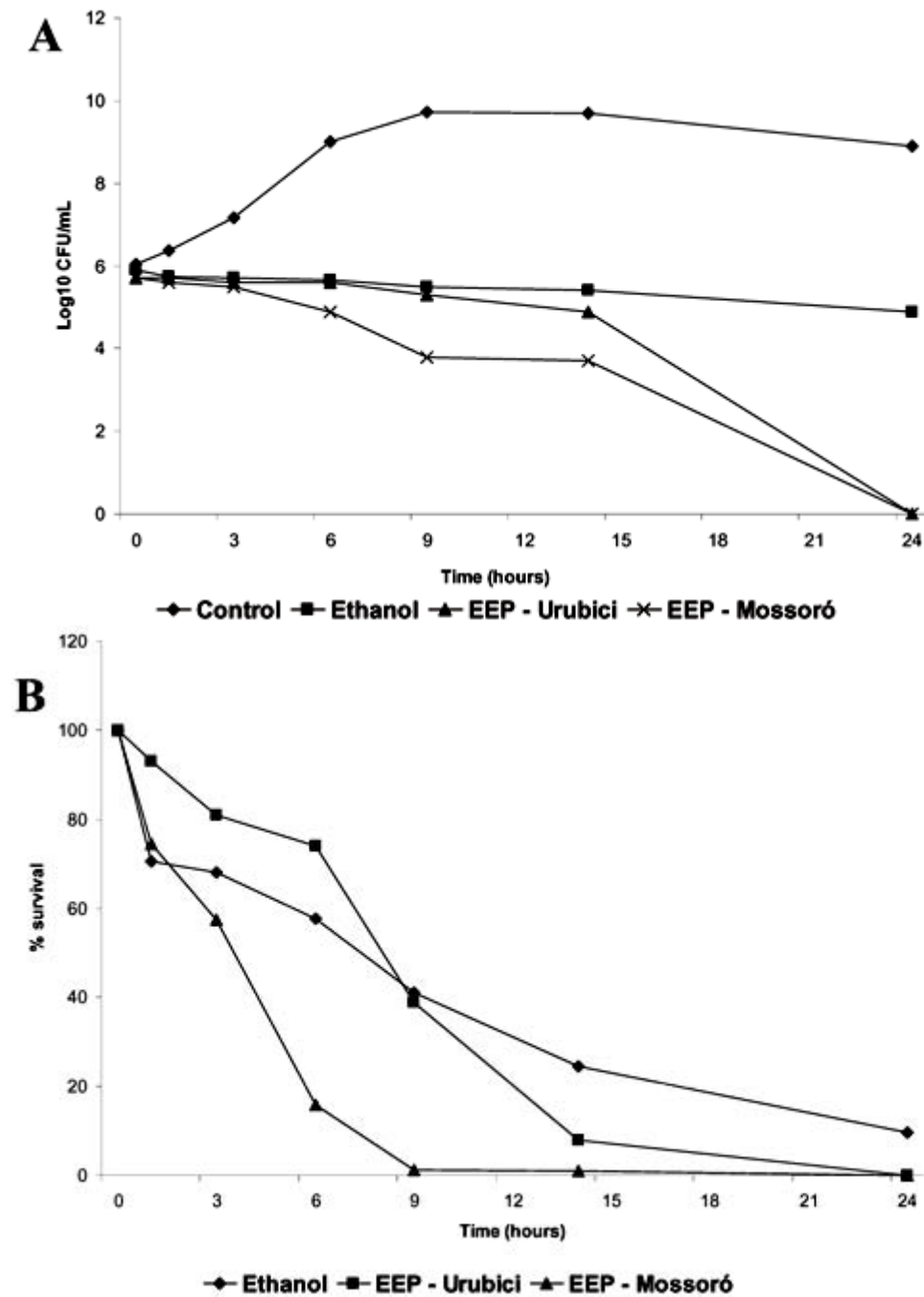


Figure 20: Profil d'analyse de la population (A) et de la courbe de survie (B) (%Cfu/mL) de *Salmonella Typhimurium* selon la période d'incubation dans une solution éthanolique de propolis (10% v/v) et dans l'éthanol (12,6% v/v) (95)

L'étude réalisée par MM. Murugan *et al.* (97) se penche à la fois sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. L'effet d'une solution éthanolique de propolis indienne à 95% a été testé sur ces deux bactéries, et l'action bactériostatique a été observée par méthode de diffusion à la concentration de 700µg/mL. Cette étude conclut que les sensibilités respectives de *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* à la propolis sont les mêmes.

La propolis a donc un effet propre sur les bactéries *S. Typhi* et *S. typhimurium*, et on peut même ajouter qu'elle possède un effet de synergie avec les antibiotiques agissant sur les

ribosomes et sur la paroi cellulaire, ce qui peut se révéler particulièrement utile en thérapeutique. Cependant, son action s'exerce aussi, *in vivo*, via les macrophages dont elle module l'activité bactéricide. (98) Les macrophages jouent un rôle particulièrement important au tout début d'une infection aux Salmonelles. Lorsqu'ils sont préalablement stimulés avec de la propolis Bulgare ou Brésilienne, ils exercent une plus forte activité. Cette action de la propolis sur les macrophages est dose-dépendante. Nous reviendrons plus en détail sur cette activité dans le chapitre dédié à l'activité immunomodulatrice de la propolis.

### **3.2.8. Les *Clostridium***

Le genre *Clostridium* regroupe des bacilles à Gram positif anaérobies. Certaines sont toxigènes et peuvent donc causer divers symptômes chez l'humain selon l'espèce de *Clostridium* concernée.

MM. de Andrade Ferreira *et al.* (99) ont étudié l'impact de la propolis sur *Clostridium perfringens*, qui est responsable de gangrènes gazeuses, de septicémies ou de toxi-infections alimentaires. La propolis a eu un effet bactériostatique sur ce *Clostridium*.

De leur côté, MM. Boyanova *et al.* (100), en testant l'activité bactériostatique de la propolis sur 94 souches de bactéries, nous apportent une précision sur la sensibilité des *Clostridium* à la propolis en général. Leur conclusion est que ces bactéries y sont bel et bien sensibles, comme la plupart des bactéries anaérobies testées, avec toutefois 15% des *Clostridium* testés présentant une résistance à l'extrait hydro-éthanolique de propolis lorsqu'il est administré à la dose de 30µL.

### **3.2.9. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Cette bactérie est généralement commensale de la microflore bactérienne normale du tube digestif de l'homme, mais elle peut être à l'origine de pathologies comme les méningites ou les infections urinaires, les gastro-entérites ou les sepsis. (101)

Bien qu'*Escherichia coli* soit une bactérie à Gram négatif, elle semble bien être affectée par la présence de propolis, quoiqu'à des concentrations plus élevées qu'il n'aurait fallu pour des bactéries à Gram positif, comme en témoigne cette courbe.

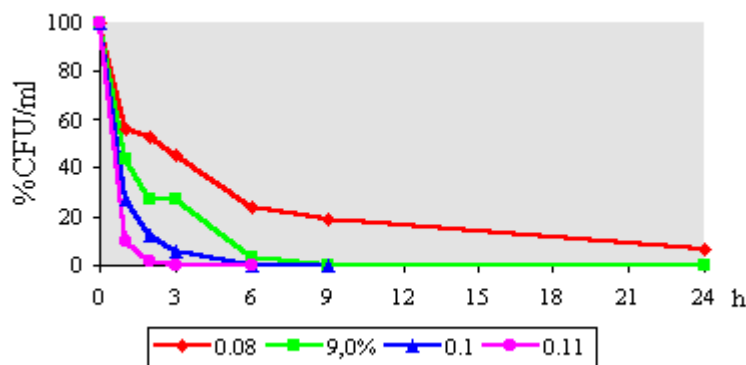


Figure 21: Courbe traduisant l'effet bactéricide de la propolis envers *E. coli* à différentes concentrations (% v/v) au cours du temps. Pourcentage de CFU/mL par rapport à l'inoculum initial. (102)

D'après MM. AL-Waili *et al.*, (64) l'extrait hydro-éthanolique de propolis provenant d'Arabie Saoudite et d'Egypte inhibe la croissance de *E. coli*, et a même un effet de synergie lorsqu'il est utilisé avec du miel. Une souche d'*E. coli* multirésistante aux antibiotiques (linézolide, vancomycine, érythromycine, céfuroxime, ampicilline, kanamycine) fut testée avec succès ; la propolis est un agent prometteur pour les traitements de bactéries résistantes aux antibiotiques. Grâce à une méthode d'évaporation de l'alcool éthylique, cette même équipe a effectué les tests prouvant avec succès un effet bactériostatique sur *Escherichia coli*. Ce n'est pas la seule équipe à avoir prouvé l'efficacité d'une solution non-éthanolique de propolis sur cette bactérie (103). Ainsi, une solution de propolis sans alcool peut avoir un effet bactériostatique, ce qui peut se montrer utile pour traiter certaines personnes sensibles à l'alcool éthylique (enfants, femmes enceintes...). L'équipe de M. Al-Waili a de plus effectué des tests avec des bactéries isolées, mais aussi avec différentes souches de bactéries mises ensemble en milieu nutritif. Il se trouve que des cultures présentant :

- *E. coli* avec *S. aureus*
- *E. coli* avec *C. albicans*
- *E. coli* avec *S. aureus* et *C. albicans*

Ont bel et bien été sensibles à l'action de la propolis. Plus encore, *S. aureus* et *C. albicans* ont été plus sensibles à cette action en présence d'*E. coli*. De plus, en présence de *C. albicans* ou de *C. albicans* + *S. aureus*, *E. coli* est également plus sensible à la propolis.

Un des enjeux du traitement contre *E. coli* est la lutte contre les infections urinaires. En effet, *E. coli* est la principale bactérie trouvée dans les infections du tractus urinaire, et développe aujourd'hui des résistances à plusieurs antibiotiques (104). Voilà pourquoi MM. Lavigne *et al.*, précédemment cités, ont évalué l'association de propolis avec des proanthocyanidines de type A pour réduire l'adhésion de la bactérie *Escherichia coli* sur les cellules urothéliales. Le test fut réalisé en utilisant, par voie orale, la canneberge associée ou non à la propolis dans des doses variables, sur cinq volontaires. Bien que l'échantillon soit faible, cette étude a le mérite d'étudier cet effet de la propolis *in vivo* dans des conditions réalistes d'utilisation. Mais une autre mesure de cette activité se fait *ex vivo* au niveau cellulaire, en testant l'adhésion des bactéries sur les cellules urothéliales de nématode. Ces essais montrent une plus grande efficacité de l'effet anti-adhésif de la canneberge sur *E. coli* lorsqu'elle est associée à la propolis, et ce, de façon dose-dépendante. Plus encore, la méthode

d'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP) prouve l'excrétion de composants de la propolis dans les urines, ce qui prouve que la propolis passe bien par le tractus urinaire, et peut donc y avoir une action locale. Cependant, les analyses montrent que les deux principaux flavonoïdes de la propolis (utilisés comme référence ici), la galangine et la pinocembrine, s'y trouvent en faibles quantités. Cela conduit MM. Lavigne *et al.* à penser qu'ils sont excrétés principalement sous forme de métabolites ( la CLHP permet en effet de trouver des conjugué de la pinocembrine et de la galangine). Les métabolites de la pinocembrine se retrouvent en quantités assez constantes dans les premières 12h dans les urines, avant d'atteindre leurs quantités maximales d'excrétion 24h après l'administration. Quant aux métabolites de la galangine, ils atteignent leur pic maximal d'excrétion 4 à 6 heures après l'administration, et semblent maintenir cette valeur lors des collectes suivantes. Cependant, la galangine serait excrétée en moins grande partie que la galangine dans les urines, car le ratio galangine/pinocembrine est plus haut dans les capsules que dans les urines. Ces conclusions présentent la propolis comme un nouveau moyen de lutter plus efficacement contre les récurrences, fréquentes, des infections du tractus urinaire.

### **3.2.10. Les Enterocoques**

Les *Enterococcus* sont des bactéries commensales du tractus digestif à Gram positif. Elles semblent toutes être sensibles à l'action bactériostatique de la propolis, ou en tout cas, un grand nombre de souches d'entérocoques sont sensibles à cette action (105). Je n'ai trouvé aucune étude à ce jour présentant une espèce parmi les entérocoques qui ne soit pas sensible à la propolis.

#### ***Enterococcus faecalis* :**

*Enterococcus faecalis* est une bactérie à Gram positif, commensale du tube digestif. Elle peut causer des des endocardites, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme. Mais elle joue également un rôle dans les infections dentaires et possède de plus la capacité de former des biofilms.

MM. Netíková *et al.* (103) ont étudié l'impact d'un extrait de propolis Tchèque dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) sur *E. faecalis*. Etrangement, les réponses de cette bactérie selon les différentes concentrations testées forment un plateau, suggérant que la réponse ne serait pas dose-dépendante. Quoi qu'il en soit, la propolis a bel et bien eu un effet inhibiteur sur *E. faecalis*.

Il s'agit ensuite de voir si cet effet peut présenter un intérêt dans les infections dentaires, où la lutte contre *E. faecalis* représente un enjeu majeur. Pour cela, MM. Jahromi *et al.* (106) évaluent et comparent les CMI et les CFU (unités formant colonies) obtenues en utilisant de l'hydroxyde de calcium (un désinfectant courant pour l'usage dentaire) et de la propolis comme antibactériens dans les canaux de dents humaines. Ces dents, exemptes de toute contamination bactérienne, sont mises en présence de *E. faecalis* et incubées avec de l'hydroxyde de calcium, de la propolis, et bien sûr des solutions de contrôle. On constate que la CMI et les CFU obtenues sont très inférieures aux valeurs correspondant à l'hydroxyde de calcium. Plus encore, une autre étude prouve que l'action de la chlorhexidine, elle aussi très utilisée comme désinfectant pour les canaux dentaires, n'excède pas de beaucoup celle de la propolis (107). La propolis se révèle donc être un excellent agent antibactérien intracanal.

### 3.2.11. *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* est une bactérie à Gram négatif de structure hélicoïdale et munie de flagelles. C'est une cause majeure des pathologies gastro-intestinales. En effet, cette bactérie est responsable d'ulcères gastro-duodénaux, de lymphomes gastriques MALT et de carcinomes gastriques. La déformylase, un peptide synthétisé par *H. pylori*, catalyse le clivage du groupe N-terminal que l'on trouve à l'extrémité de toutes les chaînes polypeptidiques naissantes. Cette déformylase semble être une cible prometteuse dans la thérapie contre *Helicobacter pylori*. (108)

MM. Cui *et al.*, pré-cités, ont fait des recherches sur la capacité de la propolis, et plus particulièrement d'un de ses constituants de nature phénolique, le CAPE (ester phényléthylrique d'acide caféique). De précédentes études ont démontré que la propolis avait un effet inhibiteur sur la croissance de *H. pylori in vitro* (109). Ici, une étude prouve cette efficacité avec divers solvants, et précise même que les principaux constituants responsables de cette action sont des constituants phénoliques. MM. Cui *et al.* ont donc évalué l'activité du CAPE contre la déformylase présente chez *Helicobacter pylori*. Les résultats prouvent que le CAPE est un inhibiteur compétitif de la déformylase, avec une valeur d'IC50 (Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) de 4.02µM. De plus, contrairement à de nombreux inhibiteurs de cette enzyme, le CAPE bloque l'entrée du substrat, l'empêchant d'approcher du site actif, sans que le CAPE n'aie d'interaction de type chélation avec la déformylase, et sans qu'il n'interrompe la catalyse métal-dépendante.

#### **Utilité de la propolis contre *H. pylori* dans le cadre de l'ulcère gastro-duodéal :**

Pour comprendre la place de la propolis dans le traitement de *H. pylori*, il faut replacer la contexte du traitement médicamenteux. Ce traitement, permettant d'éradiquer la bactérie dans l'estomac et le duodénum, est incapable pour l'heure d'éliminer complètement ce micro-organisme de la cavité orale. Or, le problème de la ré-infection du tractus gastro-intestinal se pose alors, et il y a risque de réapparition d'un ulcère gastro-duodéal. Cette éradication de *H. pylori* dans la cavité buccale est un problème actuel pour les dentistes et les gastro-entérologues. Voilà pourquoi M. Mkrtchyan, Z.G. (110), étudie l'action de la propolis sur 54 patients porteurs de *H. pylori* dans la salive et le fluide gingival (liquide qui suinte du sillon gingivo-dentaire dans lequel il peut être prélevé). Les résultats ont été probants en utilisant des bandages gingivaux imprégnés de clarithromycine, de miel et de propolis. Cette méthode a même montré une très grande efficacité, selon l'auteur, qui insiste sur le fait que *H. pylori* développe des résistances contre les antibiotiques, et qu'utiliser des moyens naturels reste préférable.

Une étude réalisée par MM. Vaz Coelho *et al.* montre qu'on a obtenu un faible taux d'éradication apparente de *H. pylori* parmi des personnes infectées en utilisant la propolis seule, sans antibiotique. Ces quelques volontaires chez qui la bactérie a été semble-t-il éradiquée (deux sur dix-huit individus) ont toutefois à nouveau eu des résultats positifs dans les tests de dépistage à *H. pylori* quarante jours après leur traitement à la propolis.

Comme on peut le constater, l'intérêt de la propolis ne résidera pas uniquement dans son action seule. Il s'agit de trouver une place à cette substance dans une thérapie antibiotique s'il y a un effet de synergie découvert. MM. Nostro *et al.* (65) focalisent leur étude sur la

clarithromycine, un antibiotique longtemps utilisé contre *Helicobacter pylori*, mais contre lequel la bactérie a fini par développer une certaine résistance (de 13,8%, ce qui signifie que la clarithromycine reste un antibiotique utilisable pour *H. pylori* (110)). Il se trouve que la propolis possède un effet de synergie avec la clarithromycine, augmentant son activité contre *H. pylori*. Voilà qui confirme l'idée que les bandages gingivaux de clarithromycine associée à la propolis puissent être une thérapeutique logique et efficace.

Ajoutons à cela que la propolis possède un effet protecteur de la muqueuse gastrique, ce qui permet d'éviter voire de soigner des ulcères, indépendamment de son action sur *H. pylori* (111). Cette propriété sera vue plus en détail dans le chapitre qui y est consacré.

### **Utilité de la propolis contre *H. pylori* dans le cadre de l'adénocarcinome gastrique :**

On considère que les chémokines de la muqueuse jouent un rôle dans la pathogénèse des adénocarcinomes gastriques associés à *Helicobacter pylori*. Ces adénocarcinomes seraient en fait une conséquence du processus d'inflammation chronique. Les interleukines 8 (IL-8) produites par des cellules épithéliales infectées ont un rôle important dans l'inflammation en induisant l'activation et la migration des neutrophiles.

MM. Siba *et al.* (112) ont étudié l'effet de l'extrait éthanolique de propolis (ici issue de la Pologne) sur la libération d'IL-8 par des cellules d'adénocarcinome gastrique humaines infectées par *H. pylori*. Il se trouve que la libération d'IL-8 a été significativement inhibée par la solution éthanolique de propolis, et ce, de façon dose-dépendante. De plus, lors de cet essai, une solution à 90µg/mL de propolis inhibe la croissance de *H. pylori* de façon significative. Ces résultats prouvent l'efficacité d'une préparation à base d'extrait de propolis pour inhiber partiellement l'inflammation gastrique induite par *Helicobacter pylori* en diminuant la production d'IL-8, une piste, donc, dans la thérapeutique contre les adénocarcinomes gastriques induits par *H. pylori*.

#### **3.2.12. Autres**

L'action antibactérienne s'applique également à de nombreuses autres espèces bactériennes, parfois moins documentées ou tout simplement posant moins de problèmes en ce qui concerne la santé publique. Voici les données que l'on peut trouver sur l'action de la propolis sur ces autres espèces bactériennes.

La propolis a une action bactéricide sur les bactéries *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* et *Clostridium perfringens*. (99)

L'action de la propolis Bulgare contre la plupart des bactéries anaérobies en cause dans les infections de plaies (*Clostridium* à nouveau, *Bacteroides*, *Propionibacterium*) en font un excellent traitement dans la prophylaxie des infections par bactéries anaérobies des blessures sur peau et muqueuse. (100)

Les tests *in vitro* sur des bactéries périodontopathiques prouvent que *Prevotella intermedia*, *Prevotella melanogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis* ainsi que *Fusobacterium nucleatum*,

toutes à Gram négatif par ailleurs, sont bel et bien sensibles à l'action bactériostatique de la propolis, avec les CMI suivantes :

Microorganism	(MIC* - µg/mL)
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> ATCC 29523 and 29522	1
<i>Capnocytophaga gingivalis</i> ATCC 33624	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 10953	0.25
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	0.25
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 33563	0.25
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (wild type)	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (wild type)	14
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, IAL 1611	12
<i>Escherichia coli</i> (wild type)	14

Tableau 12: Concentration minimale inhibitrice (CMI) d'extrait éthanolique de propolis. Chaque souche de bactérie a été testée quatre fois. (113)

Ces informations semblent donc faire de la propolis un excellent antiseptique pour les pathogènes périodontopathiques.

Enfin, grâce aux travaux de MM. Stepanovic *et al.* (63), on connaît les CMI pour les bactéries suivantes (en µg/mL) :

- *M. luteus* : 0,078
- *S. flexneri* : 5
- *Y. enterocolitica* : 1,25
- *K. pneumoniae* : 5
- *S. marscescens* : 1,25
- *P. stuartii* : (5 à 2,5)
- *M. morgani* : 1,25
- *P. rettgeri* : 5

### 3.3. Effet antiviral

L'activité antivirale de la propolis a été démontrée lors de nombreuses études ; on sait que la propolis est efficace contre les *myxovirus*, les *poliovirus*, les *coronavirus*, les *adénovirus* (62) (114) et certains *poxvirus* (115). Cette action présente bien évidemment une utilité thérapeutique, bien que son mode d'action soit encore très méconnu. Et notamment, les structures des composants de la propolis ne suffisent pas à laisser présager d'une action ou d'une autre.

Ainsi, deux acylphloroglucinols polyisoprénylés isolés de la propolis Caraïbienne, le 7-épi-némorosone et la plukénétione A, présentent une activité antivirale (116). Le 7-épi-némorosone ne montre aucune capacité à inhiber la transcriptase inverse *in vitro*, tandis que la plukénétione A possède cette capacité. Ainsi, bien que ces deux composants possèdent des

similitudes dans leur structure moléculaire, les mécanismes d'action mis en jeu dans leur activité antivirale semblent différents. Il semblerait, dans cette étude, que le 7-épinémorosome inhibe la réplication virale en interrompant la cascade signalétique Akt/PKB, alors que la plukénétione A inhibe l'activité enzymatique de la transcriptase inverse, ce qui prouve une action entilentivirale. Il semblerait que cette action de la plukénétione A sur la transcriptase inverse se fasse par l'interaction de cette petite molécule sur le site enzymatique catalytique. (116)

Cependant, plusieurs études se penchant sur l'action de la propolis contre un virus particulier permettent de mettre en lumière les principaux composants antiviraux, et de confirmer le bénéfice que pourrait représenter la propolis dans la lutte antivirale.

Afin de mieux comprendre de quelle façon la propolis pourrait être utilisée à cette fin, voici l'effet obtenu sur quelques virus courants et contre lesquels on cherche à diversifier l'arsenal thérapeutique.

### **3.3.1. Influenzavirus A :**

Les *influenzavirus A* sont des virus à ARN de la famille des orthomyxoviridae. Ils peuvent être responsables de gripes allant de la simple grippe saisonnière à de véritables pandémies.

Ces récentes pandémies que nous avons connues, causées par les *influenzavirus A* tels que H1N1 ou H5N1, remettent sur le devant de la scène les études permettant d'enrichir la lutte contre cette famille de virus. Il apparaît comme crucial de trouver de nouvelles substances dans la lutte contre les virus appartenant à ce genre.

Certains tests *in vivo* menés par MM. Shimizu *et al.* (117) ont permis de recueillir les données suivantes : treize extraits éthanoliques de propolis Brésilienne ont été administrés à des souris infectées par un *influenzavirus A* à la dose de 10mg/kg, trois fois par jour. Parmi ces treize extraits, un seul a conduit à une réduction de la perte de poids des souris infectées. Cependant, à des doses de 2 et 10 mg/kg, une prolongation significative de la survie des souris a été observée. Cet effet est dose-dépendant, aussi cet effet n'est-il pas observable à 0,4mg/kg. Parmi les extraits de propolis testés, l'un a permis de réduire le taux de virus détectés dans les fluides de lavages bronchoalvéolaires des poumons de souris lorsqu'il est utilisé à la dose de 10mg/kg. L'efficacité correspond à celle induite par de l'oseltamivir à 1mg/kg deux fois par jour. La conclusion de ces auteurs et que si la propolis seule et en faible quantité ne permet pas de venir à bout d'une infection à *influenzavirus A*, elle permet toutefois une activité contre ce virus et diminue la sévérité des symptômes chez la souris, ce qui devrait un faire un bon candidat pour un régime diététique anti-influenza pour l'Homme. J'ajouterais qu'il faudrait toutefois veiller à utiliser de fortes doses de propolis pour atteindre ces 10mg/kg.

Nous disposons toutefois d'assez peu de données qui permettent d'expliquer cette activité. Afin de mieux cibler l'action des différents constituants de la propolis sur les *influenzavirus A*, MM. Serkedjieva *et al.* ont testé l'activité de six substances, esters ou acides cinnamiques substitués, identiques ou analogues à des composants de la propolis. L'un d'entre eux, le férulate d'isopentyle, inhibe significativement l'activité infectieuse de l'*influenzavirus A* issu de Hong Kong (H3N2) *in vitro*, ainsi que la production l'hémagglutinines *in ovo*. (118)



L'extrait de propolis aqueux possède lui aussi une activité anti-influenza, ce qui est prometteur pour traiter les personnes auxquelles on ne peut pas administrer d'éthanol. (119)

Selon l'étude sus-citée, les acides caféoylquiniques seraient les composants anti-influenza mis en jeu dans l'extrait aqueux de propolis. Cependant, le taux d'ARN détecté par cellule restant constant en présence de cet extrait aqueux, on aurait tendance à penser que l'extrait aqueux de propolis n'a pas d'impact direct sur *l'influenzavirus* mais possède plutôt une activité cytoprotectrice. On quitte ici le domaine purement antiviral pour arriver dans le domaine cytoprotecteur. Toutefois, ces assertions me semblaient avoir leur place ici car elles permettent d'enrichir les données sur l'utilité de la propolis dans le cadre d'une infection aux *influenzavirus* chez l'homme.

Afin d'obtenir une inhibition maximale de la reproduction du virus, l'idéal est d'utiliser la propolis, comme toute autre substance antivirale, durant tout le processus de l'infection. (118)

### 3.3.2. Virus VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus, appartenant au genre de lentivirus. Il est transmis par certains fluides corporels : sang, sécrétions vaginales, sperme, liquide pré-éjaculatoire ou lait maternel. Le VIH conduit à un syndrome d'immunodéficience acquise, un état affaibli du système immunitaire menant à de nombreuses infections opportunistes. Il représente un enjeu majeur dans la thérapie antivirale ; en effet, l'InVS estime le nombre de découvertes de séropositivité à VIH en France à 6 400 en 2012 ; ce nombre est stable depuis 2007 (120). Voilà pourquoi la découverte de toute nouvelle substance anti-VIH doit être suivie avec intérêt.

Or, selon MM. Gekker *et al.* (121), la propolis possède une activité anti-VIH-1 qui peut s'observer dans les lymphocytes CD4+ et les cultures de cellules microgliales. Cette inhibition dont est capable la propolis se manifeste de façon dose-dépendante (une suppression maximale de 85 à 98% a été observée à 66,6µg/mL, respectivement dans les lymphocytes CD4+ et dans les cultures de cellules microgliales). Une activité similaire anti-VIH-1 a été observée avec des échantillons de propolis provenant de différentes régions géographiques. Le mécanisme de cette activité, concernant les lymphocytes CD4+, semble mettre en cause une inhibition de l'entrée du virus dans la cellule.

La propolis possède une activité antivirale additive avec la zidovudine, qui est un inhibiteur de la transcriptase inverse. Cependant, aucun effet n'est noté en présence de l'indinavir, un inhibiteur de la protéase. L'association avec d'autres antiviraux nécessite donc des études complémentaires afin de déterminer quelles sont les meilleures associations. (121) En tout état de cause, il a été démontré que la propolis exerce un potentiel anti-VIH comme agent anti-intégrase du virus (122)

Mais quels composants peuvent donc entrer en jeu dans les mécanismes antiviraux de la propolis lorsqu'il s'agit du virus VIH ? Parmi quelques composants testés (La melliférone, certains triterpènes, l'acide anwuweizonique, l'acide bétulonique et l'acide moronique), l'acide moronique fait montre d'une activité significative anti-VIH (la concentration effective médiane, ou EC50, est à 0,1 µg/mL). (123)

### 3.3.3. *Herpes simplex virus*

La propolis possède une activité sur les *Herpes simplex virus* (HSV) de type 1 et 2, qui peuvent causer l'herpès labial ainsi que l'herpès génital. Ces virus, de la famille des *Herpèsviridae*, sont des virus à ADN double brin. Le HSV 1 est le plus souvent responsable de l'herpès labial, tandis que le HSV 2 a plutôt tendance à provoquer l'herpès génital. Toutefois, ce n'est pas une règle absolue. Je mettrai ici le distinguo entre les études réalisées sur ces deux virus, HSV 1 et HSV 2.

#### *Herpes simplex virus 1 :*

Une activité bel et bien été observée en utilisant de l'extrait de propolis, qu'il soit éthanolique (124) ou aqueux (L'IC50 est alors de 0,0004%, contre 0,00035% pour l'extrait éthanolique) (114). Lorsqu'il est administré à des souris infectées par HSV 1 trois fois par jour, il limite significativement leurs lésions cutanées (124) (dans cette étude, tous les extraits de propolis n'ont pas eu cette efficacité, il faut là encore choisir le lieu de production de la propolis selon l'activité désirée, et mieux encore, chercher à savoir quels composants sont responsables de cette activité en vue de les doser). Un des extraits testés augmente significativement la production d'interféron gamma par les splénocytes en réaction au virus HSV-1. Plus étonnant, l'un des extraits testés semble n'avoir d'activité que testé *in vitro*. Enfin, certains extraits de propolis testés augmentent l'hypersensibilité retardée, qui contribue à lutter contre l'infection à HSV-1.

La propolis représente un moyen thérapeutique très prometteur contre le virus HSV-1. En effet, l'administration d'un extrait de propolis à 5% suffit à prévenir l'apparition et le développement de symptômes dans des modèles *in vivo* tels que les rats ou les lapins (infection de la cornée pour ces derniers). Cette activité s'accompagne d'une grande innocuité, car aucun effet cytotoxique n'a été observé chez ces cobayes à une concentration de 20%. (125)

On observe à nouveau que l'extrait de propolis a d'autant plus d'activité qu'il est administré tôt : sur cellules Vero, l'administration de propolis avant ou pendant le moment de l'infection permet d'obtenir l'effet inhibiteur le plus significatif, mais même lorsqu'un extrait à 10% est administré deux heures après le moment de l'infection, on obtient une protection allant de 80% à 85%. (125)

Il s'agit à présent de déterminer à quels composants cette activité est due.

Les flavonoïdes sont une classe de composants connus pour avoir une activité majeure dans l'extrait de propolis. MM. Amoros *et al.* (126) se sont donc penchés sur ces composés afin de déterminer lesquels, plus précisément, sont responsables d'une puissante activité anti-HSV-1. Les flavonoïdes majeurs de la propolis ont été testés *in vitro* pour arriver aux conclusions suivantes :

Les flavonols sont plus actifs contre HSV-1 que les flavones, l'ordre d'importance étant : galangine, kaempférol et quercétine. Cela étant dit, les flavones agissent avec les flavonols selon un effet de synergie. Cela explique pourquoi l'extrait de propolis est plus efficace contre le virus HSV-1 que les composants isolés de la propolis.

Afin de sortir du champ des seuls flavonoïdes, je citerais MM. Schnitzler *et al.* (114), qui ont étudié l'action anti HSV-1 de différents polyphénols, flavonoïdes et acides phénylcarboxyliques identifiés comme étant les constituants majeurs. Ainsi, les constituants sélectionnés furent l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide benzoïque, la galangine, la pinocembrine et chrysin. Seules la galangine et la chrysin ont alors eu une activité antivirale. Ces résultats réaffirment l'activité antivirale des flavonoïdes déjà exposée précédemment. En effet, la galangine est un flavonol, et la chrysin est une flavone. On voit aussi ressurgir l'effet de synergie évoqué plus haut : les extraits contenant plusieurs composants différents possèdent une bien meilleure activité anti HSV-1, ainsi que les meilleurs indices de sélectivité (rapport de la dose cytotoxique sur la dose antivirale) par rapport aux solutions de constituants isolés.

L'observation des effets de la propolis sur une culture cellulaire permet de se faire une idée plus précise de son action. Ainsi, ajoutée à une solution de cellules Vero, on observe une action sur la surface cellulaire, mais pas d'interaction directe avec les particules virales de HSV-1. L'action antivirale de la propolis contre HSV-A est donc probablement due à la prévention de la pénétration du virus dans la cellule-hôte et /ou à l'inhibition d'une étape interne durant la réplication du virus. (125)

En conclusion, la propolis semble être un moyen efficace de lutter contre les infections à *Herpes simplex virus 1*.

### ***Herpes simplex virus 2 :***

Non seulement des tests prouvent l'efficacité de la propolis sur le virus HSV-2 (127), mais de plus, MM. Vynograd *et al.* (128) ont réalisé des tests cliniques sur des humains. Quarante-dix volontaires porteurs du virus HSV type 2 ont participé à un essai randomisé en aveugle afin de comparer l'efficacité de la propolis canadienne et des crèmes contenant soit de l'aciclovir, soit un placebo. Le traitement était commencé au stade des éruptions vésiculeuses et fut administré quatre fois par jour. Les patients sont examinés lors des troisième, septième et dixième jours de traitement. Afin de les qualifier, nous nous référerons à ces quatre étapes : vésicules, ulcères, croûtes et peau cicatrisée. Les résultats parlent d'eux-mêmes : sur les 30 individus du groupe traité à la propolis, 24 sont guéris, contre seulement 14 dans le groupe traité à l'aciclovir et 12 dans le groupe ayant reçu le placebo. De plus, la guérison a été plus rapide dans le groupe ayant reçu le traitement à base de propolis : lors du troisième jour, 15 individus du groupe propolis ont des lésions sous forme de croûtes contre seulement 8 individus dans le groupe aciclovir et aucun dans le groupe placebo. Lors du septième jour, dix participants du groupe propolis sont soignés, contre quatre du groupe aciclovir et trois du groupe placebo. Enfin, l'incidence positive de la propolis se ressent également sur la composition de la flore vaginale chez les femmes infectées : lors de l'inspection initiale, 66% d'entre elles ont une surinfection bactérienne. Aucun changement de cet état ne survient avec le placebo ou l'aciclovir, tandis que dans le groupe propolis, l'incidence des surinfections a baissé pour atteindre 55%.

Afin de mieux cerner cette action spectaculaire, je me référerai à l'étude réalisée par MM. Nolkemper *et al.* (127) On y apprend déjà qu'une action est obtenue en utilisant de l'extrait aqueux ou éthanolique de propolis. L'IC50 obtenu pour l'extrait aqueux est de 0,0005% tandis que celui de l'extrait éthanolique est de 0,0004%. Les deux extraits possèdent une forte activité antivirale contre HSV-2 dans les tests de suspension virale, où on observe 99% de chute du titre infectieux initial. Cette expression de l'activité anti-HSV-2 de la

propolis s'observe de façon dose-dépendante. Cette activité s'accompagne d'une faible cytotoxicité.

Ainsi, la propolis semble être un moyen thérapeutique majeur dans la lutte contre le Herpes simplex virus de type 2, et selon mes conclusions, devrait même pouvoir remplacer l'aciclovir. Il possède en effet une puissante activité ainsi qu'une faible toxicité, et présente chez la femme l'avantage de diminuer le taux de surinfections bactériennes.

#### **3.3.4. Adenovirus :**

Les *adenovirus* sont des virus de la famille des *adenoviridae* pourvus d'ADN à double brin linéaire. Ils infectent les cellules à division lente, et peuvent donc causer des infections dans l'appareil respiratoire, l'appareil digestif ou encore l'œil. Ils peuvent, dans de rares cas, causer des encéphalites.

L'ester phényléthylique d'acide caféique (CAPE), un des composants majeurs de la propolis, induit directement la mort cellulaire programmée, ou apoptose, de cellules infectées par *adénovirus* de type 5. (129)

### **3.4. Effet antifongique**

Dans une étude réalisée par Stepanovic *et al.*, on constate une action antifongique de la propolis contre plusieurs espèces fongiques, à des concentrations en propolis de l'ordre de 0.16% à 1.25%. Pour comparaison, selon cette même étude, l'action de la propolis sur les bactéries à Gram positif s'observe à des concentrations allant de 0.078% à 1.25%, et contre des bactéries à Gram négatif, les concentrations sont comprises entre 1.25% et 5%. L'action de la propolis sur les champignons pathogènes est donc loin d'être négligeable.

Cette action fongicide, de la part d'une substance naturelle et d'une grande innocuité, offre des possibilités de traitements alternatifs aux infections fongiques. Voici donc ce qui ressort de la documentation disponible à l'heure actuelle :

#### **3.4.1. Candida**

*Candida albicans*, l'espèce de *Candida* la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine, est un pathogène fongique commensal chez l'être humain. Il s'agit d'un microorganisme pléomorphe qui vit dans le tractus reproductif et intestinal de la moitié de la population humaine. (130)

*Candida spp.* compte parmi les principales causes d'infections nosocomiales, ainsi, il y a actuellement un besoin urgent de nouvelles substances antifongiques, d'autant plus que cette espèce fongique présente des résistances, notamment face aux azolés et à l'échinocandine (130). La recherche de ces nouvelles substances est compliquée par le fait que la plupart du temps, les substances présentant une activité antifongique présentent aussi une toxicité pour les cellules des mammifères. (131)

Afin de lutter contre les infections à *Candida*, on peut utiliser la propolis sous différentes formes. Une bonne connaissance des activités respectives de ces formes permettent d'envisager l'utilisation de la propolis de façon plus rigoureuse. Ainsi, on fera la différence entre l'extrait éthanolique de propolis, l'extrait aqueux, la propolis dans des microparticules matricielles ou enfin sous forme d'extrait sec soluble. Toutes ces formes ont été testées par MM. Berretta *et al.*, avec les résultats suivants : L'extrait éthanolique de propolis a été le plus puissant au niveau de l'action fongicide, avec une CMF (concentration minimale fongicide) de 7.0mg/mL, suivie de l'extrait aqueux, des microparticules matricielles et enfin de l'extrait sec soluble. Enfin, à une concentration de 1% (10mg/mL) et sur un temps de 12 à 24h, l'extrait éthanolique possède une action fongicide, ce qui n'est pas le cas de l'extrait incorporé aux microparticules matricielles ou encore de l'extrait sec soluble. La supériorité de l'extrait éthanolique de propolis en ce qui concerne l'activité fongicide est donc établie, mais les autres extraits ne sont pas à négliger pour autant, car ils permettent d'éviter d'administrer de l'éthanol à certaines personnes fragiles. (132)

Sample	MFC ± SD (mg/mL)		
	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>
PEE	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	14.0 ± 0.0
PWE	24.5 ± 0.0	24.5 ± 0.0	24.5 ± 0.0
PMM	13.7 ± 0.0	27.5 ± 0.0	13.7 ± 0.0
PSDE	11.73 ± 0.0	11.73 ± 0.0	5.86 ± 0.0

**Tableau 13: Concentration minimale fongicide (CMF) de l'extrait éthanolique de propolis (PEE) et de l'extrait aqueux (PWE) de propolis intégrés à des microparticules matricielles (PMM) et sous forme d'extrait sec soluble (PSDE) sur différentes espèces de *Candida* (132)**

Selon cette même étude, les meilleures réponses au traitement par la propolis ont été obtenues après 6 à 8 heures d'exposition.

Mais les possibilités d'optimisation ne s'arrêtent pas là. Afin d'obtenir une utilisation optimale des constituants de la propolis, il peut être nécessaire de la fractionner. Ainsi, pour une utilisation contre *Candida albicans*, il a été prouvé que certaines fractions obtenues à partir d'extraction huileuse avaient plus d'action que la propolis elle-même. (133)

L'expression de l'effet de la propolis à l'encontre de *Candida* s'explique non seulement par ses activités fongistatique et fongicide, mais aussi par la répression de certains facteurs de virulence de ce pathogène. La propolis inhibe le dimorphisme de *Candida*. Ce dimorphisme permet au champignon de passer de l'état de levure à celui d'hyphe. Cette inhibition se manifeste à la dose de 0.22mg/mL chez *Candida albicans*, et peut être observée après seulement 30 secondes à 15 minutes. De plus, le pourcentage dans une culture de la forme hyphe est réduite à de plus faibles concentrations de propolis. Mais il a été prouvé que la propolis inhibait bien les trois formes que peut prendre les champignons de type *Candida* (134). Une autres explication de cet effet inhibiteur est que la propolis cause, de façon dose-dépendante et temps-dépendante, une inhibition de l'activité de la phospholipase (135).

Pour identifier les gènes impliqués dans la sensibilité de *Candida albicans* face à la propolis, MM. De Castro *et al.* (134) ont étudié 800 *C. albicans* présentant une mutation par délétion homozygote ayant une tolérance diminuée à la propolis. 552 sont hypersensibles à

l'action de la propolis, et elles incluent 17 gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la formation de biofilms, la croissance de filaments, le dimorphisme et la pathogénèse. (HST7, GIN4, VPS34, HOG1, ISW2, SUV3, MDS3, HDA2, KAR3, YHB1, NUP85, CDC10, MNN9, ACE2, FKH2 et SNF5).

Pour ce qui est de l'activité purement fongicide de la propolis à l'encontre de champignons du genre *Candida*, on sait qu'elle est médiée par l'activation des capases, qui jouent un rôle lors de l'apoptose, mais aussi par le biais de la protéine Ras, qui contrôle la prolifération. (134)

En utilisant un modèle de test basé sur la survie ou non d'un nématode infecté par *Candida albicans*, MM. Brejer *et al.* (131) ont déterminé quelles étaient les substances antifongiques contenues dans la propolis. Sans surprise, on y retrouve le CAPE, parmi 14 autres constituants permettant de prolonger la survie du nématode tout en inhibant complètement ou en grande partie la filamentation de *C. albicans*. 57 autres constituants prolongent la survie du nématode, mais sans inhiber cette filamentation.

L'extrait de propolis semble en outre proposer une solution au problème des souches résistantes aux antifongiques classiques. Ainsi, on observe une activité remarquable contre des souches de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata* résistantes aux antifongiques azolés. De plus, l'extrait de propolis possède un effet de synergie avec l'amphotéricine B contre ces mêmes souches, ce qui pourrait permettre de mettre au point un protocole de lutte contre les *Candida* résistants aux antifongiques azolés à base de propolis et d'amphotéricine B (136). Il existe ainsi une étude prouvant la capacité de la propolis à inhiber un variété de *Candida glabrata* résistante au fluconazole et responsable de candidoses vulvovaginales récurrentes. (137)

Selon MM. Ota *et al.*, l'activité antifongique de la propolis sur certaines espèces de *Candida* se classerait ainsi, de la plus forte à la plus faible : *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*. (138)

Voyons à présent comment cette puissante activité antifongique peut être utilisée dans des pathologies dues à des infections fongiques courantes : la candidose vulvo-vaginale, et la stomatite dentaire associée à *Candida*.

### **Traitement de la candidose vulvo-vaginale**

La candidose vulvo-vaginale est la seconde cause d'infections vaginales aux USA. Le traitement de *C. albicans* se fait habituellement à base de dérivés azolés et de polyènes. Toutefois, ces substances sont responsables d'effets secondaires indésirables et d'une certaine toxicité. De plus, des résistances de *C. albicans* face aux azolés et à l'échinocandine ont été décrites. (130) Enfin, de nombreuses femmes, face à la récurrence du problème, ont demandé un traitement plus naturel. (139)

MM. Mousavi *et al.* constatent que lorsqu'on utilise la propolis sous forme de crème chez des patientes atteintes d'infections vaginales à *Candida albicans*, un soulagement des démangeaisons et de la leucorrhée a été observé chez 68% d'entre elles, contre 92% du groupe testé à la clotrimazole (échantillon de 100 femmes séparées en deux groupes de 50) (139). Un effet en conditions thérapeutiques est donc bien observable, encore qu'il soit moindre que celui obtenu en utilisant un antifongique azolé. La propolis peut donc s'inscrire

en tant qu'agent complémentaire dans le traitement contre la mycose vaginale à *Candida albicans*. Toutefois, face aux résultats obtenus en utilisant la propolis sous forme de crème, une équipe de chercheurs a tenté d'augmenter l'efficacité de la propolis en utilisant d'autres véhicules.

Ainsi, afin de pouvoir offrir une meilleure efficacité à la propolis contre la mycose vaginale, l'équipe de MM. Berretta *et al.* (132) se penchent sur des formulations de gels ayant pour base les produits suivants : le carbopol 940 et le poloxamer 407. La préparation est appliquée à des patients infectés par *C. albicans* toutes les 12 heures pendant 7 à 10 jours. Un traitement de sept jours permet de réduire la charge fongique de 60.2%, 84.8% et 97.2% respectivement pour l'extrait dans du carbopol, dosé à 1% (CP1%), l'extrait dans du poloxamer, dosé à 1% (PP1%) et enfin la clotrimazole, qui est ici la référence. Au bout de dix jours, ces résultats passent à 84.2%, 89.4% et 97.9%, toujours respectivement.

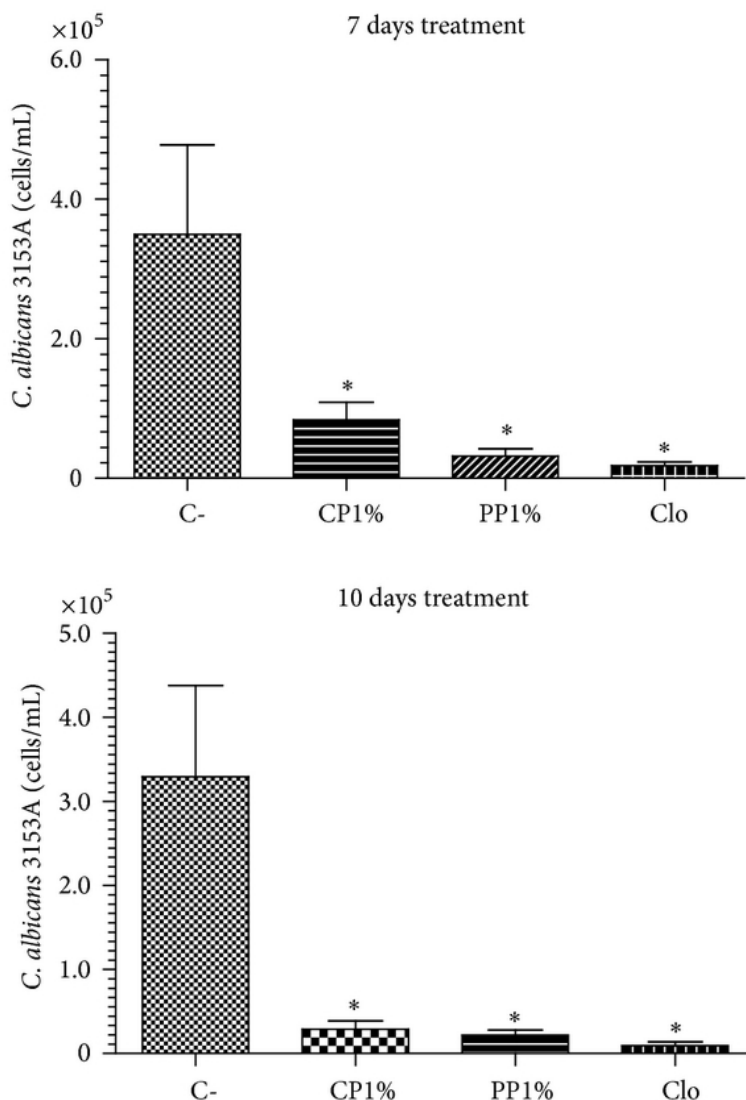


Figure 22: Charge fongique d'un lavage des muqueuses vaginales après 7 et 10 jours de traitement avec CP1%, PP1% et une crème de clotrimazole après infection par *C. albicans* 3153A (20µg, cellule/mL) (132)

On constate que de cette manière, le traitement à la propolis semble bien plus indiqué pour lutter contre les infections génitales à *C. albicans* chez la femme. L'utilisation de la

propolis pour traiter des infections vaginales possède de plus l'avantage de pouvoir exploiter l'action anti-inflammatoire de la propolis, sur laquelle nous reviendrons dans le chapitre prévu à cet effet.

Les propriétés lipophiles inhérentes des terpénoïdes leur confèrent une affinité avec les membranes. Le trans-nérolidol et le farnésol sont des composants capables d'inhiber la transition dimorphique de *C. albicans*. Ce dimorphisme correspond à une transition de la forme levure à la forme mycéliale, il s'agit d'un critère de virulence de ce champignon. Ainsi, l'inhibition de cette transition peut être un moyen de contrôler ce pathogène. (140)

### **Traitement de la stomatite associée à *Candida***

La stomatite dentaire est une lésion inflammatoire dans la muqueuse palatine, assez commune. Une association entre les stomatites et *Candida spp.*, spécialement *Candida albicans*, a été rapportée (141). Le traitement inclut une hygiène dentaire correcte et une réduction des facteurs favorisant cette stomatite. L'association de ces procédures avec une thérapie topique antifongique donne de bons résultats.

MM. Capistrano et al (142). ont fait paraître une étude très édifiante sur les stomatites dentaires associées à *Candida*, dont le but était d'évaluer l'activité de la propolis brésilienne verte dans le traitement des stomatites dentaires associées à *candida*, avec comme molécule de référence le miconazole. 55 patients présentant des stomatites à *Candida spp* sont divisés en trois groupes de traitement : 15 ont reçu de la propolis en gel à 2.5%, 15 du gel au miconazole 2%, et 15% ont eu un bain de bouche à la propolis à 24%. Ces traitements ont été administrés 5 fois par jour pendant deux semaines. Les trois groupes ont donné lieu à une réduction significative, voire à une totale rémission des érythèmes dus à la stomatite, ainsi qu'à une décroissance des colonies de *Candida*. Il n'y a aucune différence statistique dans l'efficacité entre les différents groupes de traitement. *La propolis Brésilienne a donc un effet similaire au miconazole dans le traitement des stomatites associées à Candida, ce qui en fait une alternative naturelle aux traitements actuels.* Les patients ayant testé le bain de bouche à la propolis ont été les plus satisfaits pour ce qui est du goût et de la facilité de prise de leur traitement. On observe en outre que la rémission ne présente pas de corrélation avec la sévérité de l'état clinique initial.

Ainsi, la propolis représente une alternative sérieuse aux traitements classiques des stomatites associées à *Candida*, et, en raison de son faible coût et de sa faible toxicité, pourrait même représenter un enjeu majeur de santé publique dans le traitement de cette pathologie.

#### **3.4.2. Effet antifongique de la propolis sur des champignons pathogènes autres que *Candida***

L'effet antifongique de la propolis ne s'arrête évidemment pas au seul genre *Candida*. Il s'observe également sur de nombreux organismes fongiques pathogènes.

Ainsi, il s'applique aux champignons du genre *Trichophyton*, qui peut causer des dermatophytoses chez l'humain (143). Avec des échantillons de propolis Tchèque et Slovaque, on observe cet effet, et on peut y ajouter certaines précisions. Ainsi, les échantillons bruts de propolis se sont montrés moins inhibiteurs que les extraits. De manière générale,



l'extrait dans l'éther de pétrole est celui pour lequel on observe la plus forte activité antifongique *in vitro*, avec une CMI variant entre 16 et 64 µg/mL. Notons au passage que les auteurs, MM. Buchta, Černý et Opletalová, ont eu l'idée d'utiliser pour leur extraction l'appareil de Soxhlet, une méthode décrite dans cette thèse au chapitre « Extraction et purification ».

Le genre *Aspergillus*, qui peut être responsable chez l'homme de l'aspergillose, est lui aussi sensible à l'extrait de propolis. Une concentration en extrait de propolis éthanolique correspondant à 0.0312g/dL possède un effet partiel sur *Aspergillus fumigatus*, et une concentration de 0.125g/dL est active sur *Aspergillus niger*. (144) De plus, l'extrait de propolis à 2% possède un effet antifongique sur *Aspergillus parasiticus* (145).

Les champignons du genre *Microsporium* ont aussi montré une sensibilité, dose-dépendante, à la propolis, particulièrement *Microsporium gypseum* et *Microsporium canis*. Toutefois, à de fortes concentrations, cette sensibilité commence à décroître (103). Rappelons que *Microsporium canis* est responsable de teignes chez le chat et le chien, qui peuvent être transmissibles à l'Homme, et que *Microsporium gypseum* est un dermatophyte, qui est responsable d'affections fongiques cutanées humaines.

L'action antifongique de la propolis peut aussi s'étendre au domaine alimentaire : en effet, l'extrait de propolis inhibe la croissance de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum i.sp. melonis* et *Penicillium digitatum*, qui sont responsables de moisissures sur les aliments (146).

### **Utilisation de la propolis contre les mycoses cutanées**

D'après les investigations de MM. Sílící *et al.*, la propolis représente un antifongique susceptible d'être utilisé sur des infections fongiques cutanées. En effet, l'extrait de propolis testé a inhibé la croissance de toutes les souches de champignons pathogènes extraites de plusieurs patients atteints de mycose cutanée. (147)

### **Utilisation de la propolis contre les mycoses buccales**

Les infections fongiques de la cavité buccale semblent également être un domaine d'utilisation de la propolis, selon MM. Gomes *et al.* (148), qui ont remarqué une activité de l'extrait de propolis contre toutes les souches de bactéries ayant pu être extraites de plusieurs patients atteints de mycoses buccales. Ces champignons étaient des *Candida albicans*, des *Candida tropicalis*, et des *Actinomyces israeli*, avec une CMI variant entre 1.75 et 14.0 µg/mL. Mais l'activité de la propolis pour soigner ces pathologies ne s'arrête pas là : en effet, elle permet aussi de lutter contre les bactéries le plus souvent responsables de surinfections, c'est-à-dire *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Actinobacillus actinomycesemcomitans*. La conclusion de MM. Gomes *et al.* est que la propolis devrait être d'avantage testée en vue de proposer un traitement alternatif des infections de la cavité orale, comme les stomatites ou les périodontites.

### **Utilisation de la propolis contre les onychomycoses**

L'onychomycose est une infection fongique commune due à une invasion de l'ongle par un champignon pathogène. Ces champignons représentent à eux seuls 50% des pathologies des ongles. Bien que l'onychomycose ne soit pas importante en termes de morbidité et de mortalité, elle peut affecter sérieusement le confort de vie des patients (149). Bien que les dernières décennies aient permis le développement de nouveaux antifongiques, les onychomycoses continuent de poser un problème au niveau du traitement. Les thérapies actuelles incluent une approche topique, et orale lorsque l'invasion devient trop sévère. Le traitement par voie orale est très efficace, mais présente une certaine toxicité.

Les principales espèces fongiques responsables d'onychomycoses sont les levures (63.2%), les dermatophytes (28.1%), et les champignons non-dermatophytes (8.6%). Les doigts des mains sont plus touchés que ceux des pieds. Selon MM. Khosravi *et al.* (150), l'espèce la plus fréquemment trouvée est *Candida albicans* (38.5%), suivie de *Candida spp.* (23.1%) (Notamment *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. usitanea*, *C. glabrata* et *C. stellatoidea*. (149)), *C. tropicalis* (10.8%), *C. kefyri* (6.2%), *C. krusei* (3.1%), *Malassezia globosa* (4.6%), *M. sloofiae* (23.1%) et *M. pachydermatis* (1.5%). MM. Oliveira *et al.*, dans une autre étude, ajoutent à cette liste des *Trichosporons*, dont *T. asahii*, *T. ovoides* et *T. cutaneum*, mais aussi *Geotrichum candidum* et *Saccharomyces cerevisiae* (149). Sur ce point, les deux études ne sont pas tout à fait concordantes. On peut cependant y retrouver, pour toutes deux, une grande abondance de *Candida* par rapport aux autres pathogènes.

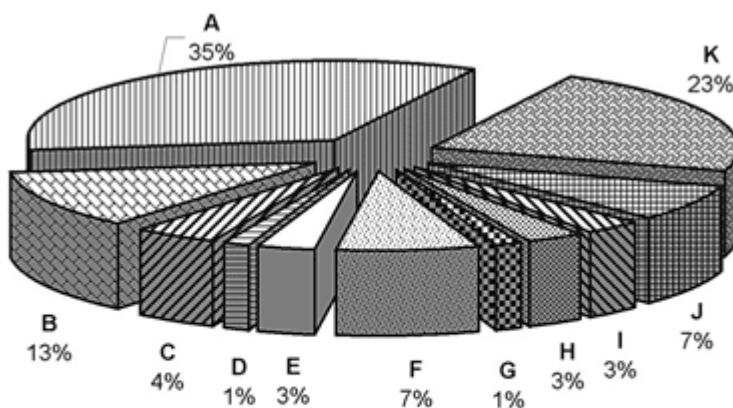


Fig. 1: distribution of species of yeasts isolated from onychomycosis. A: *Candida parapsilosis*; B: *C. albicans*; C: *Saccharomyces cerevisiae*; D: *Geotrichum candidum*; E: *C. glabrata*; F: *Trichosporon spp.*; G: *C. stellatoidea*; H: *C. guilliermondii*; I: *C. kefyri*; J: *C. lusitanea*; K: *C. tropicalis*.

Figure 23: Distribution des espèces fongiques isolées d'onychomycoses selon MM. Oliveira *et al.* (149)

Parmi toutes les levures isolées lors de l'étude de MM. Khosravi *et al.*, pré-cités, sept possèdent une résistance au fluconazole. La CMI moyenne de la propolis pour les souches sensibles à la propolis est de 5.8µg/mL, et cette valeur monte jusqu'à 12.25µg/mL pour les souches résistantes au fluconazole.

MM. Oliveira *et al.* (149) se sont eux aussi penchés sur cette possibilité d'utiliser la propolis contre les onychomycoses. La CMI nécessaire pour inhiber les 67 champignons pathogènes isolés d'onychomycoses fut de 0.5µg/mL en ne considérant que la fraction flavonoïque, ce qui paraît coïncider avec l'étude de MM. Khosravi *et al.* On apprend également que *Trichosporon sp.* est l'espèce la plus sensible à l'action antifongique de l'extrait de propolis, tandis que les espèces les plus résistantes sont *C. tropicalis* et *C.*

*lusitanea*. Pour toutes les souches testées, en plus de son action fongistatique, la propolis a montré une activité fongicide.

Micro-organisme	Nombre de souches testées	CMI50	CMI90
<i>Candida albicans</i>	8	0.250	0.250
<i>Candida parapsilosis</i>	23	0.125	0.250
<i>Candida tropicalis</i>	15	0.250	0.500
<i>Candida lusitana</i>	5	0.125	0.500
<i>Trichosporon sp.</i>	5	0.125	0.125

Tableau 14: Variation de la CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de l'extrait de propolis contre 56 champignons pathogènes isolés et leurs CMI50 et CMI90. Parmi les 67 souches isolées d'onychomycoses, 11 n'ont pu être testées car le nombre de souches isolées n'a pas été assez grand pour obtenir un résultat statistique concluant. (149)

### 3.5. Effet antiparasitaire

La propolis possède une activité contre de nombreux pathogènes susceptibles de causer des infections humaines. On a pu voir que parmi ces pathogènes, il y avait les bactéries, les virus et les champignons microscopiques. Mais l'extrait de propolis se montre également prometteur contre les parasites, dont certains sont responsables de grandes endémies. Ainsi, MM. Monzote *et al.* (151) ont observé une activité antiparasitaire d'un extrait éthanolique de propolis contre des *Leishmania*, des trypanosomes et des plasmodiums. Voici un recensement des données permettant de mieux cibler cette action antiparasitaire.

#### 3.5.1. *Leishmania*

La leishmaniose est une parasitose endémique présente dans 88 pays, qui mène à des lésions chroniques cutanées, cutanéomuqueuses ou viscérales. Elle est provoquée par plusieurs espèces du protozoaire *Leishmania*, et son vecteur est un moustique du type phlébotome. Le parasite *Leishmania* commence son cycle chez l'homme sous forme de promastigote extracellulaire, puis est rapidement phagocyté par les macrophages et se transforme en amastigotes. Ces amastigotes se multiplient dans les cellules infectées et atteignent différents tissus. Dans l'intestin des phlébotomes, porteurs du parasite, on trouve ce dernier sous la forme de promastigote. La prévalence de la leishmaniose dans le monde est de 12 millions de personnes, et la population à risque atteint les 350 millions. La leishmaniose fait donc partie des maladies pour lesquelles il est urgent de trouver de nouvelles armes thérapeutiques. Son traitement actuel consiste en des injections fréquentes et douloureuses de sels d'antimoine pentavalent. Le problème est aggravé par le fait que le *Leishmania* présente une résistance à ce traitement. Le traitement de seconde intention consiste en l'administration de pentamidine et d'amphotéricine B, qui présentent une certaine toxicité ainsi qu'une difficulté d'administration. Voilà pourquoi MM. Ayres *et al.* (152) se sont penchés sur l'action de plusieurs extraits éthanoliques de propolis Brésilienne sur *Leishmania amazonensis*, et particulièrement sur ses formes promastigote, amastigote extracellulaire ainsi

que sur les macrophages péritonéaux infectés. Tous les extraits de propolis testés sont capables de réduire la charge parasitaire, comme on peut le voir via le nombre de macrophages infectés et le nombre de parasites intracellulaires. L'effet antiparasitaire s'observe bien sur les forme promastigote et amastigote. Ces effets sont confirmés par une autre étude, qui fut réalisée par MM. Santana et al (153). La propolis rouge collectée dans l'Etat d'Alagoas, en particulier, contient de fortes concentrations de composés prénylés et de benzophénones, et s'est montrée la plus efficace contre *L. amazonensis*.

L'activité antiparasitaire de la propolis s'étend en fait à plusieurs espèces de *Leishmania*. Ainsi, son activité a été prouvée sur *Leishmania amazonensis* et *Leishmania braziliensis*, qui causent les formes cutanée et cutanée diffuse de la leishmaniose, mais aussi sur *Leishmania chagasi*, responsable de la leishmaniose viscérale, et sur *Leishmania major*. (154)

Il s'agit d'une activité assez puissante. Pour comparaison, lors d'un essai *in vivo*, on observe de bons résultats en utilisant la propolis par rapport à un groupe témoin traité par glucantime. Ainsi, quatre groupes de souris infectées par le parasite *leishmania* présentent une diminution des lésions de 78.6% en utilisant la propolis par voie orale, de 84.3% en utilisant la propolis en topique, 90.0% en utilisant la propolis en topique et par voie orale, tandis que le groupe traité par glucantim ne présentait une réduction des lésions que de 57.7%. (155)

On observe chez *L. braziliensis* des changements morphologiques de la forme promastigote lors d'un traitement à l'extrait éthanolique de propolis brésilienne. Ces changements peuvent s'observer dès 2h d'incubation. Certains promastigotes présentent des signes de rétraction tandis que d'autres ont subi plusieurs modifications de leur flagelle.



**Figure 24: Photographie obtenue par microscopie électronique d'un promastigote de *Leishmania* traité par un extrait de propolis. (154)**

La forme promastigote a été inhibée par une concentration en extrait éthanolique de propolis brésilienne correspondant à 100µg/mL sur 24 heures. Après 96 et 168 heures, toutes les concentrations testées ont permis de réduire la prolifération de ces cellules (les concentrations en question allant de 5 à 100µg/mL). (156)

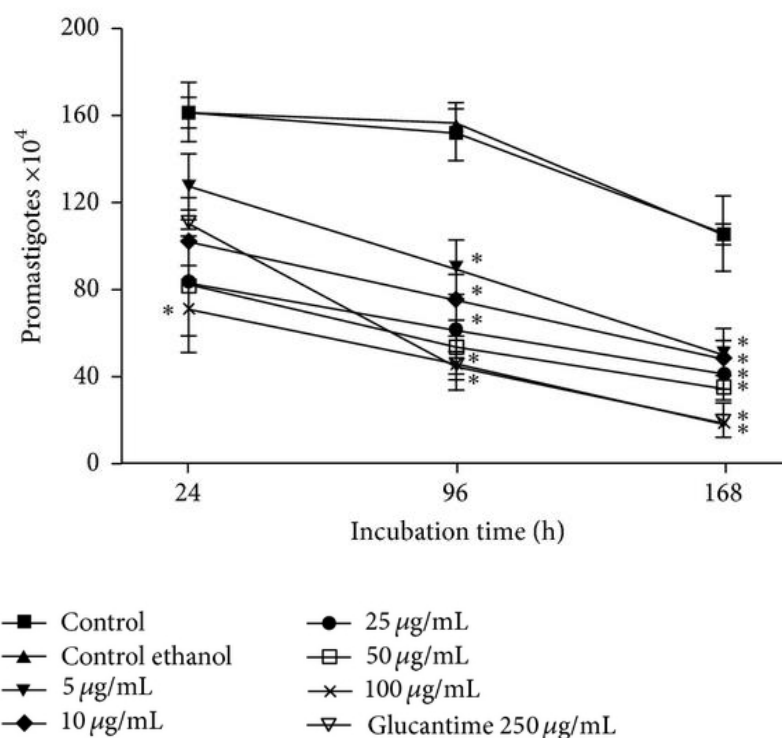


Figure 25: Cinétique de la prolifération des promastigotes de *Leishmania* après traitement à la propolis (5, 10, 25 et 100µg/mL) ou IA glucantime pendant 24, 96 et 168h (154)

Cette activité se trouve être dose-dépendante et temps-dépendante. Une autre propriété intéressante de la propolis serait une absence de toxicité sur les macrophages. Il se trouve qu'au-delà de la dose de 25µg/mL, en-deça de laquelle l'activité antiparasitaire n'est pas satisfaisante, deux extraits de propolis se montrent toxiques envers les macrophages. Ces extraits sont ceux caractérisés par une richesse en coniféraldéhydes en ce qui concerne le premier, et, en ce qui concerne le second, une par une richesse en composés prénylés et en coniféraldéhydes.

Il est intéressant de noter qu'à la concentration de 25µg/mL, l'extrait éthanolique de propolis réduit la charge parasitaire présente dans les macrophages, mais ne présente pas de toxicité directe envers les formes promastigotes et amastigotes extracellulaires. Cela conduit à penser que les constituants de la propolis intensifient le mécanisme d'activation des macrophages conduisant à la destruction de *L. amazonensis*. En revanche, d'autres extraits n'ont pas eu cette toxicité pour les macrophages tout en possédant une activité antiparasitaire sur le *Leishmania*. Il s'agissait de l'extrait riche en composés prénylés et de l'extrait riche en composés prénylés et en benzophénones. Ce dernier extrait est à la fois le plus actif contre *Leishmania amazonensis* et le plus inoffensif pour les macrophages.

Bien sûr, ces profils ne peuvent servir à déterminer quel type de molécule est toxique pour les macrophages et laquelle possède une activité antiparasitaire, car les extraits de propolis se caractérisent par un grand nombre de composés dont la teneur varie d'un échantillon à l'autre. Si l'on souhaite analyser plus précisément l'activité des composants de la propolis dans l'inhibition des *Leishmania*, on sait que les composés associés à une

inhibition de la prolifération de la forme amastigote sont des composés prénylés et les benzophénones (157), tandis que les composés suivants : acide caféique, acide p-coumarique, aromadendrine-4'-methyl ether, 3-prenyl-p-coumaric et 3,5-diprenyl-p-coumaric exercent un effet direct sur les formes promastigotes et diminuent les lésions dues à l'infection *in vivo* (155). Les flavonoïdes, monosaccharides et d'autres composés phénoliques jouent un rôle dans l'action antileishmania des formes promastigotes chez *L. major*, *L. chagasi* et *L. braziliensis*. (154) Enfin, un possible effet de synergie de ces composants ne doit pas être écarté.

L'utilisation de l'éthanol pour extraire la propolis semble ici être incontournable pour obtenir un effet antiparasitaire correct. L'utilisation d'extrait aqueux de propolis permet de réduire la charge parasitaire dans le foie, mais pas dans la rate. L'association de la propolis à des liposomes d'antimoniote de meglumine (meglumine antimoniate, MA) permet de faire diminuer cette charge parasitaire dans le foie et dans la rate, mais cette diminution reste assez faible. Toutefois, ces deux types d'extraits peuvent être administrés afin de protéger le foie et la rate. (158)

Toujours d'après MM. Ayres *et al.*, l'effet antiparasitaire observé est également dû soit à une modification du métabolisme, soit à l'intensification d'une activation des macrophages menant à une production accrue de cytokines. Des macrophages incubés avec de la propolis brésilienne (156) ont eu une forte augmentation de leur intériorisation du parasite et de son élimination. Une production accrue de TNF a été observée chez des souris pré-traitées à la propolis, tandis que l'Interleukine 12 (IL-12) sécrétée a été diminuée pendant l'infection. Cet effet observé peut être imputé à la présence de composés phénoliques (flavonoïdes, acides aromatiques, benzopyranes), de di- et triterpènes, et d'huiles essentielles présents dans la propolis.

### **3.5.2. *Trichomonas vaginalis***

*Trichomonas vaginalis* est un protozoaire flagellé dont la présence sur les muqueuses génito-urinaires provoque la trichomonose.

Selon MM. Xu *et al.*, la propolis possède une activité contre *Trichomonas vaginalis* qui s'observe clairement *in vitro*. Cette activité est dépendante de la dose administrée et du temps de contact respecté (159). Cependant, cette activité ne s'observe pas nécessairement avec n'importe quel échantillon de propolis. Ainsi, sur un modèle *in vivo*, MM. Fidalgo *et al.* (160) ont testé dix-huit échantillons de propolis cubaine et seuls cinq ont eu une activité contre *Trichomonas vaginalis* à une concentration inférieure à 10µg/mL. En conclusion, la propolis peut être un outil thérapeutique contre ce parasite des voies uro-génitales, mais il faut savoir pratiquer des analyses rigoureuses afin d'être sûr d'utiliser un extrait de propolis présentant bien une activité anti *Trichomonas*.

### 3.5.3. Trypanosome

Le Trypanosome est un parasite intracellulaire responsable de la maladie de Chagas, ou maladie du sommeil, encore négligée sur le plan médical. Cette maladie endémique a une prévalence de 18 million de cas recensés dans le monde. La thérapie actuelle est toujours celle qui fut introduite il y a quarante ans, et elle possède une forte toxicité. Il s'agit du benznidazole et du nifortimox. De plus, leur efficacité durant les phases chroniques de la maladie laisse à désirer. Dans ce contexte, il y a une recherche intense de nouveaux composés synthétiques ainsi que de produits naturels pour le traitement de la maladie de Chagas. (161)

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la propolis contre *Trypanosoma cruzi*, il convient de commencer par un rappel sur son cycle parasitaire. Sa transmission à l'homme se fait par les fèces de réduves, qui sont des punaises infligeant des piqûres à l'être humain. Le trypanosome commence alors son cycle sous forme de trypomastigote, qui va pénétrer dans les cellules afin de se transformer en amastigote. Va alors commencer un cycle où les amastigotes, après s'être multipliés dans les cellules, en sortent sous forme de trypomastigotes, qui vont à leur tour s'internaliser dans les cellules de l'hôte sous forme d'amastigotes. La forme épimastigote, elle, ne va se trouver que dans le système digestif des réduves, vecteurs de la maladie de Chagas.

Selon MM. Dantas *et al.* (161), l'extrait éthanolique et acétonique de propolis bulgare ont une activité antiparasitaire sur les amastigotes, avec un IC<sub>50</sub>/24h de  $36.4 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$  et  $39.5 \pm 8.2 \mu\text{g/ml}$ , respectivement (fig. a). Ajoutons que selon MM. Higashi *et al.* (162), l'extrait dans le diméthylsulfoxyde possède lui aussi cet effet antiparasitaire, et ce, contre les trois formes du parasite.

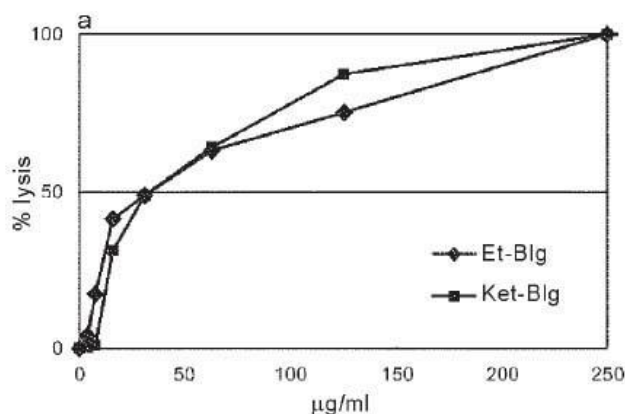


Figure 26: Pourcentage de lyse des amastigotes de *T. cruzi* selon la concentration en extrait éthanolique de propolis administré sur 24h. (161)

Le traitement de muscles infectés à *T. cruzi* avec de l'extrait éthanolique de propolis conduit à une diminution de l'infection (fig. b) et de la prolifération intracellulaire des amastigotes, avec un

IC50/24h de  $2.2 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ , tandis que des dommages sur la cellule-hôte ne sont observables qu'à une concentration 12.5 fois supérieure à la dose affectant le parasite, c'est-à-dire à  $25\text{mg/mL}$ .

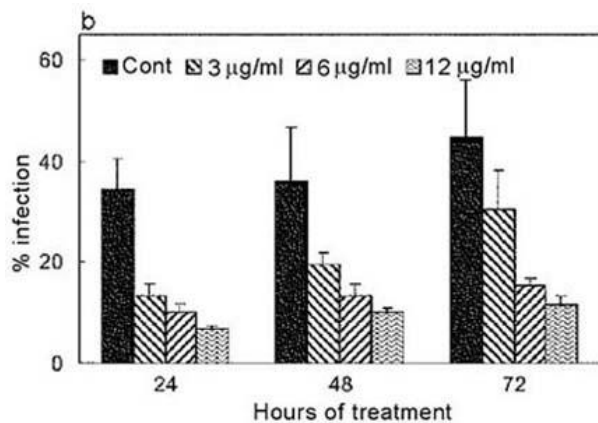


Figure 27: Pourcentage d'infection des cellules par *T. cruzi* selon le temps de traitement (heures) et la concentration en extrait éthanolique de propolis. (161)

Les travaux de MM. Dantas *et al.* nous permettent également de faire la lumière sur cette action de la propolis au niveau biochimique. Sur la forme épimastigote du parasite, les cibles principales sont les mitochondries et le réservoir. En effet, l'extrait de propolis provoque des interférences avec la morphologie de la mitochondrie, incluant une raréfaction de sa matrice, une absence de crêtes dans la membrane interne et une augmentation du volume de l'organite pour une concentration en propolis de  $100\mu\text{g/mL}$ . En ce qui concerne les réservoirs, ils présentent une forme très hétérogène et des inclusions. De plus, l'extrait éthanolique à  $80\mu\text{g/mL}$  affecte le complexe mitochondrie-kinétoplaste (réseau d'ADN circulaire) chez les trypanomastigotes, altérant son organisation, ce qui conduit à la formation de structures membranaires concentriques et de larges vacuoles dans le cytoplasme, ainsi qu'à une diminution de la densité électronique des réservoirs. Comme les réservoirs sont des compartiments de stockage cruciaux de lipides et de protéines, l'action de l'extrait éthanolique de propolis doit probablement interférer avec l'ingestion de macromolécules chez *T. cruzi*. Enfin, on observe chez l'épimastigote une dilatation de l'appareil de Golgi lors d'un traitement à l'extrait éthanolique de propolis à la concentration de  $100\mu\text{g/mL}$ . Ces altérations de l'appareil de Golgi induites par l'extrait peuvent compromettre la glycosylation et/ou de transport de protéines du réticulum endoplasmique vers les vacuoles et les lysosomes (163).

De façon plus générale, l'extrait de propolis dans l'acétone induit des altérations dans la morphologie du parasite trypanomastigote, et l'extrait éthanolique tend à arrondir sa région postérieure et à réduire sa taille lorsqu'il est utilisé à la concentration de  $100\mu\text{g/mL}$ . Ce résultat obtenu par MM. Dantas *et al.* est également corroboré sur des trypanomastigotes par l'équipe de MM. Higashi *et al.*, (162), ces derniers ajoutant que l'effet observable est température-dépendant.

Les parasites intracellulaires se sont montrés environ 20 fois plus susceptibles à l'action de l'extrait éthanolique de propolis que les formes libres (161). De plus, la forme



épimastigote semble elle-même plus sensible à cette action que la forme trypomastigote (163). Cela dit, une telle différence de vulnérabilité du parasite selon ses formes a déjà été décrite avec d'autres médicaments.

Intéressons-nous à présent au modèle animal, qui permet d'obtenir des résultats sur le parasite *in vivo*. Chez la souris infectée, on constate que les niveaux d'urée, de créatine kinase (CK), d'aspartate aminotransférase (AST ou GOT) et d'alanine aminotransférase (ALT ou GPT) augmentent. Cette augmentation est inhibée par l'administration d'extrait éthanolique de propolis. Plus important encore, la mortalité a elle aussi diminué. On observe chez *T. cruzi* des vésicules acides devenant neutres sous l'action de la propolis. Une telle altération peut être due à une activité réduite des pompes à protons des réservoirs. L'accumulation de lipides et la diminution de la densité électronique de la matrice des réservoirs, avec l'altération de l'appareil de Golgi, suggère que l'extrait éthanolique de propolis interfère avec l'endocytose. Quant à la réduction de la densité électronique, elle peut être due à une diminution du contenu en protéines. L'augmentation du ratio lipides/protéines observé chez la forme épimastigote traitée par la propolis renforce l'idée que cette substance altère le métabolisme du parasite, le menant à sa mort. Il semblerait que des atteintes fonctionnelles précèdent des atteintes structurelles. (163)

Une diminution de la masse splénique et une modulation de la réaction inflammatoire peuvent être observées chez des souris infectées par *T. cruzi* et traitées par extrait éthanolique de propolis Bulgare. De plus, on observe une modification de la population en lymphocytes mobilisés lors de l'infection. Ces données indiquent que le traitement de *T. cruzi* par propolis chez la souris interfère avec les propriétés basiques des cellules immunitaires. (164)

*Trypanosoma cruzi* n'est pas le seul trypanosome à être sensible à l'action antiparasitaire de la propolis. Ainsi, une activité trypanocide dose-dépendante est observée *in vitro* chez *Trypanosoma brucei brucei* (165), ainsi que chez *Trypanosoma evansi*. Chez ce dernier, tous les trypomastigotes sont tués *in vitro* après une heure d'incubation avec 10µg/mL d'extrait éthanolique. Cependant, des tests *in vivo* sur des rats n'ont conduit qu'à une faible augmentation de la longévité chez certains sujets testés lorsqu'une concentration de 300 et 400mg/kg est utilisée. (166)

De même, l'extrait éthanolique de propolis brésilienne, administré à des souris infectées à la dose de 25–300 mg/kg, ne réduit que légèrement la parasitémie, mais permet toutefois d'augmenter la survie des animaux infectés et n'induit aucune lésion hépatique, musculaire ou rénale. La conclusion qu'on peut en tirer est que la propolis possède bien une activité sur le trypanosome *in vitro*, mais que son effet trypanocide *in vivo* est faible. Cependant, l'augmentation de la survie chez les sujets ne doit pas être négligée. Il est clair que la propolis seule ne peut suffire à traiter les individus atteints de la maladie de Chagas. Cette substance naturelle devrait avoir une place comme thérapie complémentaire dans le traitement des infections à trypanosome (163).

### 3.5.4. *Plasmodium*

Le *plasmodium* est un protozoaire dont cinq espèces provoquent le paludisme, ou malaria, chez l'Homme. Il a été démontré que l'extrait de propolis possède une activité antiparasitaire *in vitro* contre ce protozoaire, avec une IC50 obtenue à la dose de 0.2µg/mL (167).

Dans les études menées par MM. Syamsudin *et al.*, l'équipe de recherche cible en particulier le *Plasmodium berghei*. Une solution d'extrait éthanolique de propolis est administrée à des souris à la concentration de 25, 50 et 100 mg/kg pendant quatre jours, par voie orale. MM. Syamsudin et son équipe ont alors mesuré la réaction d'hypersensibilité (immunité humorale), ainsi que l'activité des macrophages péritonéaux et leur capacité de phagocytose face au parasite *T. berghei*. Ces recherches révèlent que la propolis possède une forte activité immunomodulatrice, ainsi que nous le verrons dans le chapitre dédié à cet effet, mais une faible activité anti Plasmodium, comme le prouvent l'augmentation des Immunoglobulines G (IgG) ainsi que l'activité des phagocytes et leur capacité de phagocyter le parasite. En résumé, la faible activité que la propolis exerce sur des sujets atteints de la malaria n'est pas due à une action directe contre le parasite, mais à une augmentation de l'efficacité du système immunitaire. De cette manière, la propolis permet d'augmenter la survie du sujet atteint, et bien qu'elle ne possède évidemment pas sa place en thérapie seule contre le paludisme, on peut l'utiliser en complément d'une thérapie classique (168).

### 3.5.5. *Giardia intestinalis*

*Giardia intestinalis*, anciennement *Giardia lamblia*, est un protozoaire flagellé qui possède la capacité d'infecter l'intestin grêle humain, causant une maladie qui porte le nom de giardiose ou lambliose. La symptomatologie de cette maladie est très variable, allant de la forme asymptomatique à des douleurs abdominales, des nausées, une diarrhée aiguë ou chronique (pouvant alors durer jusqu'à plusieurs mois), une malabsorption et une perte de poids. Cette maladie est suspectée comme étant la cause de problèmes de croissance chez l'enfant. On trouve *G. intestinalis* chez les mammifères, il est transmis par l'ingestion de la forme kystique présente dans l'eau ou la nourriture. Le problème de la propagation dans l'eau est que ce protozoaire est résistant au chlore. *G. intestinalis* est le parasite intestinal le plus courant dans les pays développés. La thérapie actuelle repose sur le 5-nitroimidazole, la quinacrine, le furazolidone, la paromomycine, le benzimidazole et le nitazoxanide. La plupart d'entre eux possèdent des effets secondaires, et de plus, *G. intestinalis* a développé une résistance contre ces médicaments. Dans un tel contexte, il est naturel de chercher de nouveaux outils thérapeutiques dans les produits naturels. (169)

MM. David *et al.* ont prouvé que l'extrait de propolis avait bel et bien une activité *in vitro* sur la prolifération des trophozoïtes de *Giardia*, c'est-à-dire sa forme végétative (170). Il permet en outre d'inhiber la croissance de ces trophozoïtes, et ce, de façon dépendante de la

dose et du temps d'incubation. La meilleure inhibition de cette croissance parasitaire a été observée sur des cultures exposées à 125, 250 et 500µg/mL de propolis. Une réduction de la croissance des trophozoïtes de 50% est observée à 125µg/mL, tandis que les concentrations de 250 et 500µg/mL permettent d'obtenir un taux d'inhibition supérieur à 60%. De plus, la propolis inhibe l'adhérence du parasite et on a observé un détachement des trophozoïtes à toutes les concentrations de propolis pré-citées. Des observations microscopiques ont révélé des changements de l'aspect piriforme des cellules et une réduction de la fréquence des battements de flagelle chez une grande partie des trophozoïtes (171). Cependant, la propolis n'a exercé aucune inhibition de l'activité de la protéase sur ces trophozoïtes, dont la capacité d'hydrolyse est identique au contrôle (170).

Lorsqu'elle est utilisée en prophylaxie *in vivo*, la propolis permet de diminuer de manière significative l'intensité de l'infection, tout en modulant la réponse immunitaire : on observe chez la souris infectée une augmentation des niveaux sériques d'interféron gamma et du ratio de lymphocytes CD4+ sur CD8+. En traitement, on observe une diminution significative du nombre de trophozoïtes. Cette diminution est même supérieure à celle obtenue par traitement avec le métronidazole au bout de six jours, puis l'efficacité des deux produits devient la même au bout de 12 jours. Il est à noter que la propolis a eu un effet indésirable lorsqu'elle est utilisée seule : elle a augmenté la réponse inflammatoire intestinale. Cependant, combinée avec le métronidazole, elle n'a pas eu cet effet indésirable et cette bi-thérapie a permis de réduire le nombre de parasites chez l'hôte de façon bien plus efficace qu'en utilisant chaque produit seul. Leur utilisation combinée permet en outre de préserver l'homéostasie intestinale et son architecture histologique (172).

### **3.6. Effet Analgésique**

La propolis est largement utilisée au Brésil, dans la médecine populaire, pour ses propriétés anti-inflammatoires. Cet usage empirique demande une confirmation scientifique, afin de savoir si la propolis peut être utilisée dans le domaine de la douleur et de l'inflammation.

MM. Dulcetti *et al.* (173) ont donc étudié, en 1998, les propriétés anti-inflammatoires et nociceptives d'un extrait éthanolique de propolis brésilienne. L'effet analgésique de la propolis est évalué par deux tests : l'un consistant à injecter dans la cavité péritonéale de l'animal (ici des souris) une substance nocive causant de sévères douleurs abdominales ainsi que des contractions. L'évaluation de l'efficacité antidouleur de la substance à tester se fait selon le nombre de torsions abdominales subies par l'animal. L'autre test consiste à chauffer la queue d'un rat afin de voir à quel stade la douleur le pousse à effectuer un mouvement vif de la queue afin de la retirer. Les résultats montrent une inhibition significative de la douleur chez la souris à une dose de 1000mg/kg, avec une diminution des contorsions de 52,8%. A la même dose chez le rat, le temps avant le retrait de la queue augmente de façon significative (174). MM. De Campos *et al.* (173) relèvent pour leur part, lors d'administration péritonéale de la propolis, un ID50 (concentration responsables d'une inhibition de 50% des contorsions)

correspondant à une concentration de 2.7mg/kg lors d'un test utilisant l'acide acétique, 10.8mg/kg lors du test au kaolin et 10.7mg/kg lorsqu'on utilise le zymosan. Les maximums d'inhibition sont obtenus à  $58 \pm 5$ ,  $57 \pm 10$  et  $51 \pm 5\%$ , respectivement. L'administration orale de propolis permet également d'obtenir une inhibition de la douleur (induite cette fois par capsaïcine), avec un maximum d'inhibition égal à  $39 \pm 8\%$  pour une administration en propolis allant de 3 à 30 mg/kg, et à  $41 \pm 8\%$  pour une administration en propolis allant de 25 à 100 mg/kg.

Cependant, MM. Paulino *et al.* ne repèrent aucune activité analgésique lors des essais sur plaque chauffante. (175)

L'absence d'inhibition de l'effet de la propolis lors d'une administration conjointe de naloxone (inhibiteur de la morphine) tend à démontrer que l'effet analgésique obtenu est indépendant de la voie d'activation des récepteurs opioïdes, cela lors des expériences menées par MM. Paulino *et al.* (173). Cela étant dit, MM. Dulcetti *et al.* (173) ont, eux, mis en évidence une activité inhibitrice de la naloxone sur l'extrait de propolis, et en concluent donc qu'un ou plusieurs de ces composés empruntent bel et bien la voie des récepteurs opioïdes. Cette disparité est difficile à expliquer. Peut-être est-elle due à la différence de composition entre les échantillons de propolis utilisés d'un laboratoire à l'autre, l'un des deux échantillons possédant des composés qui prendraient la voie des récepteurs opioïdes, l'autre non. Mais il ne s'agit là que d'une hypothèse, la variabilité expérimentale d'un modèle *in vivo* pouvant également jouer.

La conclusion de ce chapitre sur l'efficacité analgésique de la propolis est délicate. Tout d'abord, les résultats obtenus par les différentes équipes citées sont parfois contradictoires. De plus, les modèles mis en jeu possèdent bien souvent une composante inflammatoire, et les essais infructueux de MM. Paulino *et al.* (176) lors des tests sur plaque chauffante, exempts de toute composante inflammatoire, les poussent à suggérer que l'action analgésique obtenue lors des autres tests est en fait due à l'activité antiinflammatoire de la propolis. Il est clair que ce domaine d'action de la propolis nécessite des travaux complémentaires pour compléter l'information à laquelle le corps médical peut accéder quant à la possibilité d'utiliser la propolis dans le traitement de certains types de douleur.

### **3.7. Effet anesthésique local**

L'extrait éthanolique de propolis ainsi que certains de ses constitutifs possèdent un effet anesthésique local. Ainsi, MM. Paintz et Metzner relatent que cet effet peut être obtenu avec un extrait total de propolis, avec la pinocembrine seule, la pinostrobine seule ou encore avec un mélange d'acides esters caféïques qui se trouvent dans la propolis. Ces trois derniers extraits ont d'ailleurs eu en moyenne une activité trois fois supérieure à celle de l'extrait total de propolis. Enfin, en application sous-cutanée, la pinocembrine et le mélange d'acides esters caféïques ont eu le même ordre d'efficacité que la lidocaïne. Cette similitude d'efficacité, en

administration sous-cutanée, avec la lidocaïne, a déjà été relatée dans d'autres travaux, et on compare également cette efficacité à celle de la cocaïne. (177)

Les propriétés anesthésiques de la propolis pourraient avoir une importance toute particulière dans le domaine des soins dentaires, car comme nous l'avons vu en étudiant ses propriétés antibactériennes, elle possède déjà un fort potentiel dans ce domaine en tant qu'antiseptique. Certains pays utilisent déjà la propolis dans le cadre d'une anesthésie locale pour les soins dentaires. (178)

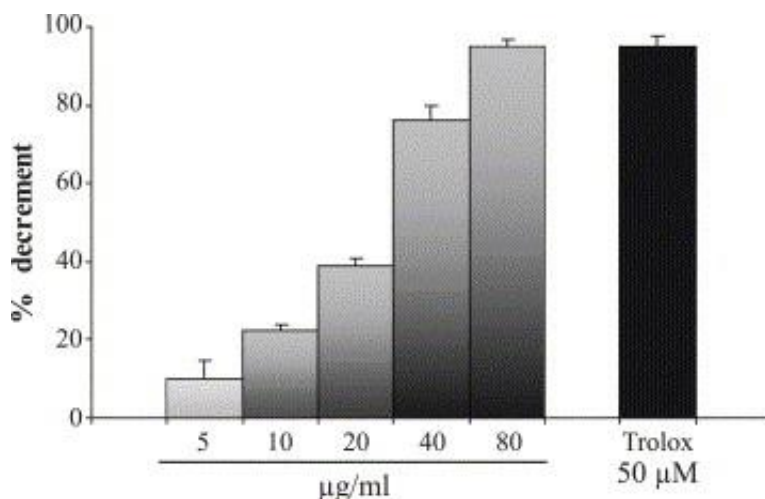
### **3.8. Effet antioxydant**

Il est établi que le métabolisme cellulaire génère des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'anion superoxyde et l'ion hydroxyle, ainsi que des espèces réactives de l'azote (RNS), comme le monoxyde d'azote (NO). Ces espèces réactives peuvent servir de marqueurs. Les espèces réactives de l'oxygène sont habituellement détoxifiées par des enzymes intracellulaires, comme la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase ou la catalase. Une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote cause ce qu'on appelle le stress oxydant. On observe alors une dégradation de lipides, de protéines, d'ADN, etc, avec des effets délétères.

Les espèces réactives de l'oxygène, produites notamment par les neutrophiles, sont impliquées dans la pathogénèse de différentes maladies, dans lesquelles l'apport de substances antioxydantes pourraient apporter un puissant bénéfice chez le patient en tant que prophylaxie. La propolis est riche en flavonoïdes, qui sont de puissants antioxydants, capables de lutter contre les radicaux libres et ainsi protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation des lipides. Il serait donc utile de contrôler les qualités de ce produit naturel en tant qu'antioxydant. (179)

La propolis permet d'endiguer l'augmentation de macrophages et de neutrophiles dans les alvéoles pulmonaires chez des souris exposées à de la fumée de cigarette (la fumée de cigarette contient des composés oxydants, 1014 radicaux par bouffée. Cela stimule les phagocytes qui produisent des espèces réactives de l'oxygène, ou ROS, comme le peroxyde d'hydrogène ou des radicaux hydroxyl. Ces espèces réactives de l'oxygène vont provoquer la peroxydation des lipides et promouvoir la signalisation via la protéine NF-κB et la production de TNF-α.). Le traitement à la propolis a également permis de normaliser les paramètres biochimiques, comme les nitrites, les niveaux de myeloperoxydases, l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase), le ratio glutathion/glutathion oxydé, et la malondialdéhyde (ou aldéhyde malonique, marqueur de la peroxydation des lipides). De plus, il y a eu réduction de l'expression du TNF- α. Enfin, la propolis et l'acide caféique inhibent la production de NO par les macrophages (180) .

Cette activité antioxydante n'est pas anecdotique, en effet, les valeurs d'IC50 pour le test au DPPH sont de 0,03917mg/mL et de 0,01211mg/mL pour deux extraits de propolis algérienne. Ces résultats correspondent à un effet antioxydant puissant (181).



**Figure 28: Effet antiradicalaire d'extrait éthanolique de propolis chilienne selon sa concentration. Essai réalisé via le test DPPH avec le Trolox comme molécule de référence. (182)**

La propolis est non seulement capable de diminuer les dommages ADN par peroxydation lipidique, un mécanisme fortement associé à des complications cardio-vasculaires, mais agit aussi comme un chasseur de radicaux libres et réduit la production d'interféron gamma (183). L'activité de l'extrait de propolis contre la peroxydation des lipides semble s'exercer lors des phases d'initiation et de propagation. (184)

L'action inhibitrice de la propolis ouvre un champ de possibles dans le domaine médical chez l'être humain. En effet, la peroxydation lipidique a de nombreuses conséquences. Les hydroperoxydes instables produits se décomposent en donnant de nouveau radicaux libres, provoquant des oxydations de biomolécules mais aussi des aldéhydes réactifs qui feront des adduits sur les groupements NH<sub>2</sub> des biomolécules (acides nucléiques, protéines, lipides). Ainsi, toutes les structures cellulaires sont touchées, et particulièrement les membranes (comme la membrane plasmique, mais aussi les membranes des organites comme les mitochondries ou les lysosomes). (183).

La dose de propolis à administrer afin d'avoir une activité antioxydante est de 200mg/kg/jour. Au-delà (300mg/kg), on observe au contraire une activité pro-oxydante, qui augmente l'activité de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase et de la peroxydation des lipides. (183)

Certains composés de la propolis, comme l'artépilline C, l'acide coumarique et la drupanine, ont un effet antioxydant contre les agents oxydants environnementaux, comme des rayons UV. L'hypothèse de MM. Lopesa *et al.* est que ces composés ont pu avoir une action

protectrice contre l'oxydation induite par la fumée de cigarette dans les tests qu'ils pratiquèrent sur les souris (183).

Afin de mieux comprendre l'effet antioxydant de la propolis, il convient de se pencher sur les différents constituants responsables de cette activité. De manière générale, la corrélation établie entre le contenu total en flavonoïdes de la propolis rouge brésilienne et son activité antioxydante suggère que cette activité est dûe aux composés phénoliques et flavonoïdes présents dans l'échantillon de propolis. (185) Les composés phénoliques de la propolis, comme le CAPE, la galangine et le kaempférol sont responsables de baisse de niveaux des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives de l'azote, *in vivo* sur des neutrophiles, par leur effet antioxydant (183). Des études prouvent que les principaux constituants responsables d'un effet antioxydant de la propolis rouge brésilienne sont le chalcones et les isoflavonoïdes, comme le 7-O-méthylvestitol, la médicarpine et le 3,4,2',3'-tetrahydrochalcone. Ces substances agissent comme donneuses d'électrons (85). D'autres études comme celle de Simoes-Ambrosio *et al.* (186) suggèrent que l'aromadendrine-4'-méthyl éther, l'artépilline C et la baccharine ont un effet antioxydant contre les espèces réactives de l'oxygène produites par les neutrophiles. Or, dans le travail de MM. Lopesa *et al.* (187), dans lequel la propolis inclue bien ces composés, on observe une diminution des neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire. La conclusion de ces auteurs est que cette diminution des neutrophiles peut être causée par l'action antioxydante elle-même. Il semblerait par ailleurs que l'aromadendrine-4'-méthyl éther et la baccharine jouent un rôle essentiel dans l'activité antioxydante, alors que l'artépilline C est moins importante pour cet effet (186). MM. Búfalo *et al.* (180) ont obtenu un effet antioxydant plus puissant avec l'acide caféique seul qu'avec un extrait total de propolis. Ce dernier possède la capacité d'inhiber la production de NO dans les macrophages.

Afin de pouvoir sélectionner le meilleur type de propolis pour se servir de ces capacités antioxydantes, il faut prêter attention à la saison de récolte. Selon les travaux de MM. Simões-Ambrosio *et al.* [163], l'activité antioxydante de la propolis semble subir une variation selon la saison où la récolte a eu lieu. Cela s'explique par la variation dans la composition d'échantillons selon la saison de récolte: la quantité d'aromadendrine-4'-méthyl éther, d'artépilline C et de baccharine n'est pas la même sur les échantillons récoltés à diverses périodes de l'année. Or, nous avons vu que ce sont des composés majeurs en ce qui concerne l'action antioxydante de la propolis. Cette équipe a relevé une activité antioxydante maximale de la propolis brésilienne verte lorsqu'elle est récoltée aux mois de Mai, Juin et Aout.

Bien sûr, le lieu de récolte possède lui aussi une influence sur l'efficacité de l'extrait de propolis concernant son activité antioxydante. Il semblerait ainsi que la propolis rouge chinoise soit celle qui possède la plus puissante action antioxydante, ce qui serait dû principalement à sa teneur élevée en CAPE (188).

Sa capacité à inhiber les mécanismes oxydatifs est une des propriétés les plus importantes de la propolis. Toutefois, en l'état actuel des choses, le corps médical manque de

données sur la biodisponibilité et la sûreté d'utilisation de ce produit. Des études cliniques permettraient de faire évoluer la situation (179).

### 3.9. Effet anti-inflammatoire

Habituellement, le processus d'inflammation est bénéfique. Il a en effet pour but d'éliminer l'agent pathogène et de permettre la réparation des tissus. Mais il arrive que ce processus devienne néfaste pour différentes raisons : l'agressivité de l'agent pathogène, sa persistance, le siège de l'inflammation, d'éventuelles anomalies de régulation de l'inflammation, ou encore une anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans le processus inflammatoire.

Il a été prouvé que la propolis possède une activité anti-inflammatoire. Sa fraction soluble dans l'acétate d'éthyl semble être la plus active en ce qui concerne cette propriété. Une fois de plus, il s'agit d'une propriété pharmacologique qui se trouve être dose-dépendante (189). Cette propriété anti-inflammatoire est déjà utilisée au Brésil dans la médecine populaire (174).

L'effet anti-inflammatoire de la propolis a été attribué à des mécanismes variés, tels que l'inhibition de la production d'eicosanoïdes et de monoxyde d'azote, l'action antioxydante, la modulation de la mobilisation de l'ion calcium, l'angiogénèse et son activité modulatrice sur les leucocytes. (190)

De plus, il a été observé que le CAPE exerce une action sur la cyclo-oxygénase-2, ou COX-2, qui sont des enzymes permettant la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, activant ainsi un phénomène inflammatoire. La région 5' de promoteur de la COX-2 contient des sites de fixation pour le NF-kB. Ainsi, le NF-kB est un régulateur de l'expression de la COX-2 dans de nombreuses lignées cellulaires. Or, plusieurs études suggèrent que le CAPE est un inhibiteur spécifique de l'activation du NF-kB. L'activation du NF-kB est induite par de nombreux facteurs, comme les cytokines inflammatoires. Il se trouve justement, comme nous le verrons plus en détail au cours de ce chapitre, que la propolis possède une action sur la concentration en cytokines lors d'un phénomène inflammatoire. Cette activation du NF-kB est également induite par le stress oxydatif, qui est lui-même régulé par la propolis, comme nous venons de le voir. (191)

L'administration de propolis verte brésilienne chez l'animal sujet au stress chronique augmente la génération de peroxyde d'hydrogène, ce qui suggère une modulation de l'activation des macrophages (192).

Dans un modèle d'inflammation *in vivo*, il a été démontré que l'extrait de propolis verte brésilienne supprime la migration des cellules sans compromettre le dépôt de collagène, qui permet le phénomène de bourgeonnement (193).



En administrant de l'extrait aqueux de propolis à des souris par voie orale, à la concentration raisonnable de 5mg/kg, MM. Machado *et al.* (194) ont pu étudier le mécanisme anti-inflammatoire de la propolis en relation avec son activité immunomodulatrice. On observe des effets très divers selon l'échantillon de propolis utilisé pour les tests.

Un des constats qu'ils ont pu réaliser est que certains extraits aqueux de propolis ont inhibé les cytokines pro-inflammatoires et augmenté les cytokines anti-inflammatoires, ce qui permet de supposer que la propolis peut bel et bien avoir un avenir en tant qu'outil dans la thérapie contre l'inflammation. Encore s'agit-il de choisir avec soin la propolis à utiliser. La propolis induit différents effets dans la formation des granulomes, en relation avec leur poids et l'œdème formé. On peut ainsi observer une diminution du poids total des granulomes et de l'œdème avec certains extraits. D'un échantillon à l'autre, on peut observer un effet pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. (194)

Certains extraits n'induisent aucun changement hématologique chez l'animal, tandis que d'autres augmentent le nombre de leucocytes et autres cellules de la lignée blanche. Un des extraits testés par MM. Machado *et al.* a même conduit à une réduction des plaquettes. (194)

Une augmentation significative du nombre de macrophages a été observée dans les lavages broncho-alvéolaires collectés chez des animaux traités à la propolis et chez lesquels on a induit une inflammation pulmonaire. Le nombre de neutrophiles, lui, diminue. Le nombre de lymphocytes ne présente pas de changements. Quant au modèle du granulome, on y observe une augmentation des leucocytes pour certains extraits de propolis. Ces leucocytes dont le nombre a augmenté sont principalement des lymphocytes et des neutrophiles. (194)

Ces résultats démontrent que la propolis altère la migration des cellules, mais interfère aussi avec le recrutement des cellules de la moelle vers le sang et les tissus. Une diminution, dans le modèle granulome, du nombre de cellules dans la moelle des animaux traités, suggère une augmentation du recrutement des cellules de la moelle épinière vers le sang, et permet d'expliquer l'augmentation du nombre de leucocytes dans le sang. On observe en outre une capacité des extraits de propolis de moduler le recrutement des cellules dans la zone sujette à l'inflammation, qui réduit le nombre de neutrophiles par rapport aux autres cellules. Rappelons que les neutrophiles peuvent nuire aux tissus inflammés. Les cellules inflammatoires présentes dans le foie, elles, diminuent. (194)

Certains extraits aqueux de propolis ont permis de faire diminuer la concentration en TNF- $\alpha$ , en IL-8 et en IL-6, qui sont des cytokines pro-inflammatoires. Dans le même temps, ces extraits ont aussi augmenté les concentrations en TGF- $\beta$  et en IL-10, qui sont des cytokines anti-inflammatoires. L'extrait de propolis contribue donc à diminuer la réactin inflammatoire en favorisant la libération de cytokines anti-inflammatoires et en inhibant les cytokines pro-inflammatoires. (194)

La propolis possède un puissant potentiel anti-inflammatoire, mais ses effets sont très variables. La mauvaise sélection d'un échantillon peut conduire à une activité pro-inflammatoire et à une augmentation de l'œdème. D'autres échantillons de propolis peuvent

n'avoir aucun effet sur l'inflammation. Cependant, le choix éclairé d'un échantillon de propolis adapté peut conduire à une action anti-inflammatoire, et anti-oedémateuse. (194)

Les acides p-coumarique et caféique (qui sont des acides phénoliques), testés séparément du restant des composants de la propolis dans un modèle de granulome, ne montrent pas spécialement d'effet sur le phénomène inflammatoire, dans un sens ou dans l'autre. Les paramètres biologiques, quant à eux, ne subissent pas de changement significatif, ce qui semble prouver que ces acides phénoliques n'exercent pas d'action sur l'inflammation seuls, mais par un effet additif entre eux. Cependant, dans d'autres modèles expérimentaux, ces acides phénoliques, dont l'acide cinnamique, ont exercé une stimulation des lymphocytes et induit une production de cytokines (195). Certains auteurs ont attribué l'effet anti-inflammatoire de la propolis à l'acide salicylique, l'apigénine, l'acide férulique et la galangine (196). De plus, des études sur l'artépilline C, l'acide phénolique qui constitue le principal composant de la propolis verte, montrent une inhibition de la prostaglandine E2 (PGE2), démontrant l'effet de ce composé sur l'inflammation. (194)

Plus particulièrement, l'artépilline C (qui est un dérivé de l'acide cinnamique) semble posséder en elle-même une puissante activité anti-inflammatoire, en inhibant de manière significative la production de ROS, de RNS, de NO et de cytokines IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12p40, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES et KC, tout en bloquant l'expression de la protéine NF- $\kappa$ B lors d'une réaction inflammatoire. Sa faible masse moléculaire et sa structure chimique augmentent son affinité pour les membranes cellulaires ainsi que son incorporation dans la cellule, ce qui permet d'éviter la conjugaison de ce composé actif en composé inactif durant l'absorption intestinale. Ces propriétés suggèrent une forte biodisponibilité et une forte activité biologique de l'artépilline C. (197)

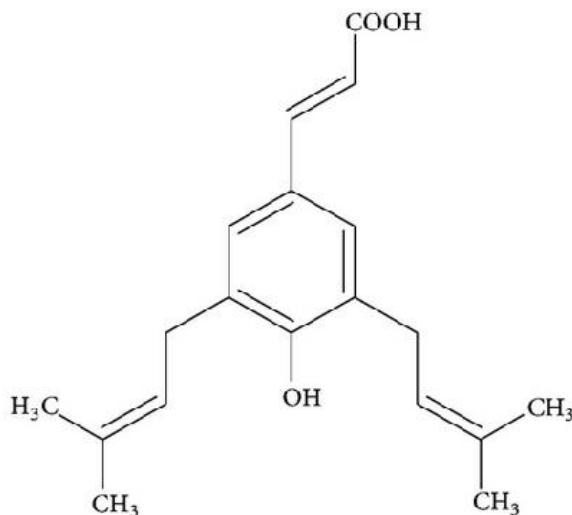


Figure 1: Chemical structure of artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid).

Figure 29: Structure chimique de l'artépilline C (197)

La composition complexe de la propolis peut être la réponse à l'existence des nombreuses activités, très diverses, attribuées à ce produit. Les composés phénoliques représentent les composants les plus remarquables de la propolis, car ils sont considérés comme responsables de la plupart de ses propriétés. De plus, ils interagissent entre eux dans un extrait de propolis, ce qui résulte en différents effets observables. (194)

En conclusion, la propolis possède un effet net sur le processus inflammatoire, en jouant un rôle dans le chimiotactisme cellulaire, le recrutement dans la moelle de cellules inflammatoires et modifiant les quantités de cytokines sécrétées. Cet effet est principalement dû à son contenu en acides phénoliques. Cependant, la grande variabilité de son influence selon l'échantillon de propolis récolté nécessite des études complémentaires sur les activités distinctes obtenues selon les composés testés, et leurs concentrations. Cela permettrait de sélectionner selon des critères scientifiques des échantillons de propolis adaptés à une utilisation chez l'être humain. Il semblerait, pour commencer, que la propolis chinoise possède une excellente activité anti-inflammatoire (188).

### **3.10. Effet immunomodulateur**

Nous l'avons vu dans le précédent chapitre, la propolis exerce un effet anti-inflammatoire par le biais de ses propriétés immunomodulatrices. Ces propriétés, justement, peuvent à leur tour être utilisées en tant que telles. Moduler le système immunitaire peut permettre de lutter plus efficacement contre certaines infections, à condition d'utiliser un extrait de propolis adapté à l'usage que l'on compte en faire. L'immunomodulation peut aussi être un mécanisme allant à l'encontre de la prolifération de tumeurs (198).

L'extrait éthanolique de propolis exerce une activité inhibitrice dans le processus de différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th1, via les cytokines IL-2 et IFN- $\gamma$  (199). Cette action pourrait être utile pour traiter les colites dans le cadre d'une alimentation enrichie à la propolis. Elle est de plus la preuve que certains extraits de propolis ont la capacité d'augmenter la réaction immunitaire d'hypersensibilité retardée, médiée par les lymphocytes T. Cette réaction contribue à lutter, notamment, contre l'infection à HSV-1 (124). Le bon choix d'un extrait de propolis peut donc aider le système immunitaire à répondre par une meilleure réaction selon le type d'agression qu'il subit.

Paradoxalement, la propolis active également les fonctions des macrophages, et ce, de façon dose-dépendante (98). Cette augmentation de l'activité des macrophages est notamment mesurable par une augmentation *in vitro* de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui est relâché lorsque le macrophage combat un pathogène. Les constituants en cause dans cette activité en particulier sont l'acide cinnamique et l'acide caféique. Cependant, la même équipe qui met en évidence l'augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* obtient l'effet inverse *in vivo*, et de plus, note une diminution *in vitro* du NO, qui est lui aussi un marqueur de l'activité des macrophages (200). MM. Ivanovskan *et al.* (195) permettent d'ébaucher une explication en prouvant que l'acide cinnamique tend à inhiber la libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux, alors que l'acide caféique induit une augmentation de la production de métabolites. Tout se jouerait donc sur la balance entre certains composés présents dans l'échantillon de propolis utilisé pour les tests. Il y aurait aussi une diminution de la production

par les macrophages de prostaglandines et de leucotriènes. (201) Les autres études citées au cours de ce paragraphe ainsi que tout le long de ce chapitre sur l'immunité permettent toutefois de maintenir que la propolis exerce bien une action stimulante sur le macrophage. En plus de jouer un rôle dans leur activation, elle augmente aussi leur nombre de manière significative dans le cas d'une inflammation (194). Il a en outre été prouvé que l'action de l'extrait éthanolique de propolis augmente le phénomène de phagocytose des cellules phagocytaires en général lors d'une infection fongique (202). Cette action résulte en une meilleure efficacité de la défense immunitaire contre l'agent responsable de l'infection. (200)

La propolis active les lymphocytes NK, ou natural killer, qui combattent les cellules cancéreuses. Les NK sont activés par des cytokines, comme des interférons alpha, beta, gamma, ou les TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, TGF- $\beta$  mais leur activation par la propolis reste obscure. On suppose que les mastocytes activés par la propolis produisent des cytokines qui vont à leur tour activer les NK (203).

Certains extraits n'induisent aucun changement hématologique chez l'animal, tandis que d'autres augmentent le nombre de leucocytes et autres cellules de la lignée blanche. Un des extraits testés par MM. Machado *et al.* a même conduit à une réduction des plaquettes. (194)

Dans le modèle d'une inflammation avec granulome, on observe des variations dans les cellules présentes sur le site de l'inflammation. Le nombre de leucocytes augmente, et plus précisément, les cellules dont le nombre a le plus augmenté sont les lymphocytes et les neutrophiles. Cependant, dans un autre modèle inflammatoire, on a pu observer une diminution des neutrophiles. Dans tous les modèles, l'utilisation de la propolis tendrait à diminuer le nombre de neutrophiles impliqués par rapport aux autres leucocytes (194). On peut en tirer la conclusion, déjà évoquée lors du chapitre traitant de l'effet anti-inflammatoire de la propolis, que cette substance altère la migration des cellules tout en interférant avec leur recrutement de la moelle vers leurs sites d'action, qui sont le sang et les tissus. Cette interférence irait majoritairement dans le sens d'une augmentation, et expliquerait l'observation d'une augmentation des leucocytes dans le sang dans les modèles inflammatoires et infectieux ayant subi un traitement à la propolis. Dans un modèle d'infection virale, MM. Hayakari *et al.* (204) remarquent que le pré-traitement de cellules à la propolis avant une infection virale inhibe la production d'interleukine 8 ainsi que l'expression de CCL5, ce qui, en conséquence, mène à une diminution du chimiotactisme des lymphocytes polynucléaires.

L'action immunomodulatrice de la propolis s'exerce aussi via les récepteurs de type Toll, ou Toll-like receptors, TLR. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires. Ils interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des « motifs moléculaires conservés » chez de nombreux pathogènes. Ces motifs peuvent être des protéines, des oses ou des acides nucléiques. Ils enclenchent la réponse immunitaire par la synthèse de cytokines, qui vont elle-même induire une augmentation dans le sang et les tissus de cellules immunitaires, comme les lymphocytes ou les macrophages. D'après les travaux de MM. Orsatti *et al.*, l'extrait de propolis augmente l'expression des récepteurs de type Toll 2 et 4, TLR-2 et TLR-4, dans un modèle *in vivo* (la souris), notamment dans les cellules spléniques. La propolis active donc la première étape dans la réponse immunitaire innée via la régulation des toll-like récepteurs (205).

La propolis diminue la prolifération des splénocytes, qui sont des cellules immunitaires du tissu splénique capable d'évoluer en leucocyte (206).

Rappelons que l'effet de la propolis peut s'exercer sur la production de cytokines IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12p40, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES et KC, qui sont inhibés. L'expression de la protéine NF- $\kappa$ B est quant à elle inhibée (197).

Selon MM. Ansorge *et al.* (207), l'effet immunomodulateur de la propolis serait médié par les signaux MAP kinases Erk2 (enzymes qui ajoutent des groupements phosphate à d'autres protéines afin de les activer) qui induisent la croissance cellulaire.

Tout cela résulte en une action de la propolis en tant que substance stimulant l'immunité humorale et cellulaire : l'administration conjointe d'une fraction d'extrait de propolis avec un vaccin permet de faire augmenter considérablement la concentration circulante en immunoglobulines, comme nous le verrons plus tard en étudiant la possibilité d'utiliser la propolis comme adjuvant d'un vaccin. Il est donc évident que l'extrait de propolis a pour effet de stimuler la réponse immunitaire humorale. Mais ce produit naturel peut aussi stimuler la réponse immunitaire cellulaire, surtout via ses composés phénoliques. En effet, l'augmentation de l'expression de l'interféron gamma est un marqueur de cette réponse immunitaire cellulaire. (208)

Les deux principaux constituants responsables de l'activité immunomodulatrice de la propolis sont le CAPE et l'artépilline C. La propolis, ainsi que ces deux constituants, exercent tous trois leur activité au niveau des lymphocytes T et des macrophages. (198) Concernant les macrophages, la propolis ainsi que l'acide caféique seul sont capables d'exercer une action sur ces cellules en inhibant leur production de NO. Dans le cadre de cette action, il a même été prouvé que l'acide caféique seul pouvait avoir d'avantage de résultats que l'extrait de propolis dans sa totalité. (180) L'acide caféique possède donc bien une action sur l'activité du macrophage. L'artépilline et les composés phénoliques, enfin, qui possèdent comme nous l'avons vu une puissante action anti-inflammatoire, agissent aussi sur l'efficacité du système immunitaire par le biais des cytokines. Les composés actifs de la propolis dans le cadre de cette activité sont véritablement très nombreux. MM. Shimazawa *et al.* (209) estiment en fait le nombre de composés exerçant une activité immunomodulatrice de la propolis à pas moins de deux cent.

Quant au solvant utilisé dans l'extraction de la propolis, il ne doit pas être négligé, car il semblerait qu'il influence les paramètres de l'immunomodulation de la propolis. Les deux principaux extraits utilisés pour l'instant sont l'extrait hydro-éthanolique et l'extrait aqueux. Bien que leurs mécanismes soient apparemment similaires, il y a bien quelques différences. Ainsi, dans une étude menée par MM. Ramos *et al.* (210), on peut observer que l'extrait éthanolique inhibe moins l'augmentation de leucocytes que l'extrait aqueux, tout en continuant d'inhiber de façon significative la production de monoxyde d'azote.

En plus de l'utilisation de la propolis contre divers pathogènes, qui a été développée précédemment dans les chapitres traitant des infections fongiques, parasitaires, virales et bactériennes, plusieurs équipes de chercheurs ont proposé l'extrait de propolis comme un adjuvant dans la vaccination. Malgré les récents progrès technologiques dans le domaine de la vaccination, la plupart des vaccins n'ont une bonne efficacité qu'associés à des substances adjuvantes.

Les adjuvants jouent donc un rôle important dans les formulations de vaccins en augmentant leur immunogénicité. Or, on observe une activité de la propolis dans l'augmentation de l'immunogénicité des vaccins en tant qu'adjuvant (211) ou co-adjuvant (212).

En ce qui concerne l'effet en tant qu'adjuvant, je citerai une étude réalisée par MM. Fischer *et al.* (211), au cours de laquelle une fraction d'extrait de propolis verte brésilienne, fraction caractérisée par sa richesse en composés phénoliques, stimule les réponses immunitaires cellulaire et humorale lorsqu'elle est co-administrée avec un vaccin inactivé de Herpes simplex virus porcine type 1 chez des souris. La dose de 10mg augmente en effet considérablement l'efficacité du vaccin en augmentant ces réponses immunitaires cellulaire et humorale, et présente même de bien meilleurs résultats que l'utilisation de l'hydroxyde d'aluminium, un produit peu apprécié de l'opinion publique.

Lorsque l'on observe la production d'anticorps suite à l'administration du vaccin, le résultat obtenu à 1mg de fraction phénolique d'extrait de propolis est déjà significativement plus actif que cet adjuvant classique, et utilisé à la dose de 10mg, il est deux fois plus efficace. La protection des souris contre le HSV-1 porcine s'avère être bien corrélée aux anticorps produits. Plus étonnant encore, la fraction phénolique de propolis utilisée seule a montré plus d'efficacité que lorsqu'elle est associée à l'hydroxyde d'aluminium.

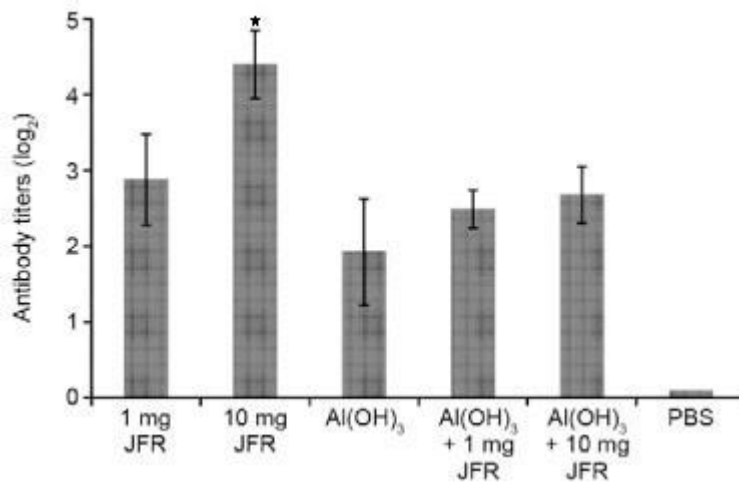


Figure 30: Titre d'anticorps (log<sub>2</sub>) de souris auxquelles est inoculé un vaccin inactivé d'HSV-1 porcine co-administré avec 1mg de fraction phénolique de propolis verte brésilienne (JFR), 10mg de cette même fraction, de l'hydroxyde d'aluminium (Al(OH)<sub>3</sub>), 1mg de fraction phénolique de propolis associée à l'hydroxyde d'aluminium et 10mg de fraction phénolique de propolis associée à l'hydroxyde d'aluminium. (211)

Les composés prénylés comme l'artépilline C (dérivée de l'acide cinnamique) sont là encore suspectés d'être les responsables majeurs d'une telle activité. (211)

Voyons à présent en quoi la propolis peut être un co-adjuvant dans la vaccination. L'extrait total de la propolis dans une solution classique eau-éthanol permet d'augmenter les réponses immunitaires humorale et cellulaire lorsqu'il est administré lors d'une vaccination à herpes simplex virus bovin de type 5 chez la souris, mais uniquement en administration conjointe avec de l'hydroxyde d'aluminium (212). La propolis seule n'a pas permis d'augmenter les concentrations en immunoglobulines, bien qu'elle ait stimulé l'immunité humorale, comme nous pouvons le déduire d'une augmentation de l'expression de l'interféron gamma. Il augmente donc l'immunogénicité du vaccin, mais uniquement lorsqu'il est déjà administré avec un adjuvant, c'est-à-dire en tant que co-adjuvant.

La propolis présente donc en conclusion des effets bien mesurables concernant l'immunité humorale aussi bien que cellulaire. Nous avons vu dans les précédents chapitres, traitant de son effet sur les pathogènes, qu'elle pouvait diminuer la charge infectieuse de certains de ces pathogènes *in vivo* en jouant un rôle dans la réponse immunitaire. Il devient clair, de plus, que l'utilisation d'extrait de propolis, surtout sa fraction phénolique, pourrait permettre des progrès dans le domaine de la vaccination en tant qu'adjuvant. Les propriétés immunomodulatrices de la propolis méritent donc amplement d'être étudiées afin de mieux définir le cadre de cette utilisation, et bien sûr, quel type d'extrait conviendrait le mieux à une action dans ce domaine, considérant que la composition de la propolis change en fonction de son lieu de récolte et d'autres facteurs, et que ce changement de composition induit une modification de son activité.

### **3.11. Effet cicatrisant**

La cicatrisation se manifeste d'abord par une inflammation aiguë, durant laquelle les cellules de l'inflammation migrent vers les tissus endommagés et les débris à phagocyter. Puis les fibroblastes et les cellules endothéliales prolifèrent et créent un tissu cicatriciel. (210) Le processus de guérison des plaies et des brûlures a lieu via une série d'événements coordonnés et médiés par les cytokines, elles-mêmes requérant l'action de plusieurs types de cellules. Les plaquettes arrivent en premier, suivies des neutrophiles et des macrophages, puis des fibroblastes, lymphocytes et des cellules endothéliales. De cette série d'événements soigneusement orchestrée dépend la réparation des tissus. Les infections lors de la cicatrisation restent un problème de nos jours malgré notre arsenal thérapeutique, principalement chez certaines personnes vulnérables comme les diabétiques et les immunodéprimés.

Parmi toutes les activités remarquables de la propolis, ses propriétés anti-inflammatoire et antibactérienne méritent une attention toute particulière si l'on veut pouvoir utiliser cette substance de la ruche dans le domaine de la cicatrisation. Les qualités d'un produit utilisable pour soigner les plaies et les brûlures sont, entre autres, d'être peu coûteux, sûr, indolore, capable de prévenir une infection, de faciliter une cicatrisation rapide et de ne nécessiter de changer les pansements trop souvent. (213)

Un film de biocellulose contenant de la propolis se montre efficace dans l'inhibition de la prolifération de tous les Staphylocoques testés, y compris les méthicilline-résistants, dans la guérison de blessures sur des rats. A noter qu'un témoin n'utilisant que du film de cellulose sans propolis ne mène à aucune activité antibactérienne. Cette efficacité contre les Staphylocoques est loin d'être anecdotique, car ils représentent les principaux pathogènes responsables d'infections lorsque la peau est lésée. Cette substance naturelle semble donc parfaitement indiquée pour lutter contre l'infection des blessures, indépendamment de toute action concernant la cicatrisation elle-même. (213)

La réparation épithéliale est plus rapide dans le groupe ayant reçu le film de biocellulose à la propolis, et les fibres de collagène sont non seulement plus denses, mais mieux organisées. Les vaisseaux sanguins sur le site de la blessure sont plus nombreux. (213)

Le traitement optimal des brûlures continue de représenter un challenge pour les médecins et les chirurgiens. Les qualités demandées à ce traitement répondent aux mêmes exigences que celles décrites pour le traitement des plaies. (214)

Dans le cas du soin apporté aux brûlures, on observe que le processus de guérison est plus développé lors d'une utilisation de la propolis (ici contenue dans un gel de poloxamer 407, MM. Berretta *et al.*). L'extrait de propolis utilisé ici est standardisé, ce qui offre l'avantage de pouvoir présenter des résultats reproductibles. On trouve dans les tissus endommagés d'avantage de nouveaux vaisseaux sanguins formés et plus de fibroblastes. Les cellules épithéliales sont mieux organisées et on note une présence plus importante des fibres de collagène, qui sont de plus mieux organisées elles aussi, comme c'était le cas précédemment dans le cadre des plaies. On observe enfin un grand nombre de cellules en phase de mitose lorsqu'un gel contenant de la propolis est appliqué sur la brûlure par rapport à un gel témoin, ne contenant pas de propolis. Il est donc clair que la propolis exerce une stimulation de la prolifération cellulaire, permettant une plus grande multiplication des fibroblastes, et par là même, une réparation des tissus plus efficace et plus rapide.

L'efficacité antibactérienne dans le cadre du soin des brûlures par un extrait de propolis est là encore prouvée, contre *Staphylococcus aureus*, dont une souche résistante à la méthicilline, et *Staphylococcus epidermitis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*, qui sont les pathogènes les plus fréquemment rencontrés lors de surinfections des brûlures et de plaies (214).

Cette action est dose-dépendante; les blessures guérissent mieux et plus vite avec un gel contenant 3.6% de propolis qu'avec un gel contenant 2.4% de propolis, lui-même plus efficace qu'un gel en contenant seulement 1.2%. La différence d'efficacité entre les concentrations 3.6% et 2.4% est cependant moindre, à ce stade, c'est surtout le nombre de renouvellements de l'application du gel qui permet d'observer une guérison plus précoce. Cependant, l'action antibactérienne, elle, ne se manifeste que lors de l'utilisation du gel contenant 3.6% de propolis. (214)

En conclusion, la propolis semble être une excellente solution thérapeutique pour soigner plaies et brûlures, au vu de son action antibactérienne, qui prévient les infections, mais aussi de son action immunomodulatrice qui joue un rôle dans le processus inflammatoire. La stimulation de l'angiogénèse et de la multiplication des fibroblastes permet une réparation plus rapide des tissus lésés. Les tests *in vivo* cités lors de ce chapitre relatent bel et bien une action bénéfique lors de l'utilisation de ce produit naturel.

### **3.12. Restauration des nerfs lésés**

Un groupe d'étude, composé de MM. Yüce *et al.* (215), met en évidence l'efficacité de la propolis dans la réparation de nerfs chez le rat. Bien que cette action soit encore assez peu documentée à ce jour, on ne peut effectuer un tour des propriétés thérapeutiques de la propolis sans l'évoquer.

Dans un groupe de rats dont le nerf sciatique a été écrasé, un extrait de propolis a été administré à la dose de 200 mg/kg chaque jour. Après 28 jours, comparé au groupe de contrôle, le groupe traité à la propolis montre clairement de meilleurs résultats sur le plan fonctionnel, notamment pour ce qui est de la marche. La conclusion qu'en tirent MM. Yüce *et*



*al.* est que la propolis devrait être utilisée en complément du traitement de routine pour les dommages infligés aux nerfs chez l'Homme.

### **3.13. Régénération du tissu osseux**

MM. Uçan *et al.* (216) se sont, eux, penchés sur l'effet régénératif de la propolis sur un tissu osseux endommagé, en se focalisant sur un de ses composants les plus importants : le CAPE.

Afin de mettre en évidence cette propriété, ils ont étudié son impact sur des rats ayant le crâne endommagé. Le CAPE est alors administré à la dose de 10µmol/kg en injection intrapéritonéale chaque jour. La régénération des os et l'activité des ostéoblastes sont alors évaluées. Les résultats mettent en évidence significative dans ces paramètres. Il semblerait donc que le traitement des fractures bénéficierait d'un apport en propolis en sus des mesures prises habituellement.

### **3.14. Effet antioncotique**

#### **Mise en évidence de l'effet antioncotique**

L'effet anti-oncotique de la propolis peut déjà s'observer au niveau de la prévention des mutations. Ainsi, M. Valadares, suite à une étude sur des drosophiles, tire la conclusion que la propolis a un effet d'anti-génotoxicité. Cette conclusion a été tirée grâce à un test impliquant l'effet mutagène de la doxorubicine sur la drosophile. Cet effet anti-mutagène est dose-dépendant (217). MM. Rursso *et al.* (182) ont prouvé que la propolis exerçait un effet anti-prolifératif sur les cellules de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale humaine, contre les cellules de l'adénocarcinome du côlon en contre les cellules du cancer de la prostate non-sensible aux androgènes. Cet effet est bien mesurable et on peut constater qu'il touche de nombreux types de cellules cancéreuses.

#### **Mécanisme d'action**

Comme nous le verrons, les propriétés antitumeur de la propolis proviennent de mécanismes très variés, tels que la suppression de la prolifération des cellules cancéreuses via l'effet anti-inflammatoire de la propolis, la diminution de la population de cellules cancéreuses, le blocage de voies de signalisations spécifiques aux oncogènes, un effet antiangiogénique, et la modification du microenvironnement de la tumeur. La bonne biodisponibilité de la voie orale et le profil sûr de la propolis en font un adjuvant idéal pour les régimes anticancer (198). Nous verrons que la majeure partie de l'action antiproliférative de la propolis résulte d'une restauration du signal d'apoptose.

Un des mécanismes d'action proposé est que la propolis inhibe le développement des tumeurs en stimulant l'immunité cellulaire, et notamment en augmentant le ratio

lymphocytes/polynucléaires (218). Mais comme nous le verrons, cette activité dépend de multiples constituants de la propolis qui agissent sur de nombreuses cibles thérapeutiques.

Pour commencer, l'extrait de propolis réduit la viabilité des cellules cancéreuses. C'est un effet qui a été prouvé dans plusieurs études. Pour exemple, dans le but d'étudier la possibilité d'utiliser la propolis contre le cancer de la prostate, MM. Barlak *et al.* (219) ont évalué le profil d'expression de cellules du cancer de la prostate de lignée PC-3 change lorsqu'on les met à incuber avec du dimethyl sulfoxyde ou des extraits aqueux de propolis turque. Le dimethyl sulfoxyde et l'extrait aqueux de propolis de 20µg/mL ont réduit la viabilité cellulaire de 24,5% et 17,7% respectivement. On observe donc bien une efficacité de la propolis, plus faible que celle de la molécule de référence, mais dans le même ordre de grandeur. Il faut toutefois garder à l'esprit que ce résultat a été obtenu *in vitro*, des essais cliniques seraient nécessaires pour évaluer l'importance d'ajouter la propolis au traitement dans le cas du cancer de la prostate, mais l'effet sur les cellules cancéreuses est indéniable.

MM. Li *et al.* (220) lèvent un pan supplémentaire de l'action antiprolifératif de la propolis en étudiant son impact sur les cyclines. La propolis régule en effet les protéines d'expression des cyclines D1, B1 et de la cycline dépendante des kinases, la CDK. Elle régule également la protéine p21, un inhibiteur de la caséine kinase, ou CKI, dont la transcription est dépendante du gène p.52. Cette action sur la protéine p.21 est d'une grande importance, car la p21 inhibe les complexes Cdk2-CyclineE, Cdk2-CyclineA et Cdk1-Cycline B en s'associant avec la cycline, ce qui bloque l'accès à l'ATP, ou en diminuant le taux de CAK.

D'autres études, comme celle de MM. Szliszka *et al.* (221), mettent en évidence la sensibilisation de cellules TRAIL-résistantes par un traitement à l'extrait éthanolique de propolis verte brésilienne via une augmentation de l'expression de TRAIL-R2 et de l'activité du NF-κB. Le pourcentage de cellules ayant subi l'apoptose a augmenté de 65,8±/ 1,2%. Il semblerait que l'Artépilline C joue un rôle majeur dans la promotion de cette voie des TRAIL, ce qui en fait une substance susceptible de jouer un rôle dans l'amélioration de la chimiothérapie en administration conjointe, l'artépilline C permettant en effet d'augmenter l'efficacité du traitement sans induire d'effets secondaires, car la voie des TRAIL est très spécifique. (222)

Les TRAIL sont des cytokines actives sous forme de trimères, capables d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Leur grande spécificité fait de ces protéines des cibles très intéressantes pour la recherche médicale. Au niveau moléculaire, les TRAIL lient les récepteurs de mort DR4 et DR5, ce qui donne lieu à une multimérisation des récepteurs et des ligands ainsi qu'au recrutement de la protéine adaptatrice FADD et de la pro-caspase 8 pour constituer la plateforme d'activation des caspases appelé DISC (death-inducing signaling complex). Ce complexe permet le rapprochement et l'activation par auto-clivage des pro-caspases 8 conduisant à la mort de la cellule par activation de la caspase 3 (voie extrinsèque). Dans certaines cellules, cela donne aussi lieu à une boucle d'amplification du signal apoptotique impliquant l'activation de la voie mitochondriale, ou voie intrinsèque.

Comme nous l'avons vu lors du chapitre traitant de l'effet de la propolis sur le système immunitaire, elle active les cellules Natural Killer, NK. Or, ces cellules sont des lymphocytes qui tuent les cellules cancéreuses. Rappelons que leur activation est probablement due à l'activation des macrophages, qui vont libérer des cytokines activant à leur tour les lymphocytes NK (203).

La propolis possède un effet anti-métastatique chez la souris et un considérable effet cytotoxique sans résistance croisée dans les lignées de cellules tumorales humaines chimiorésistantes.

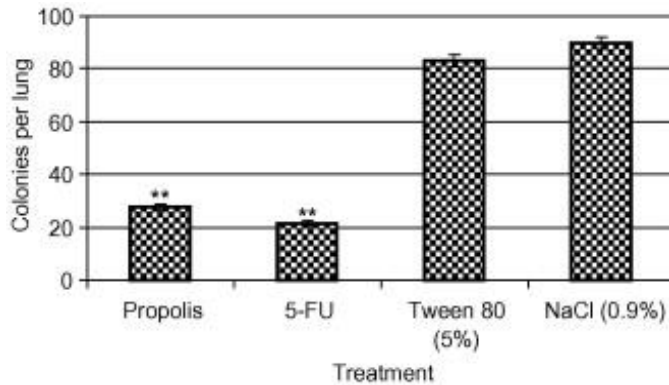


Figure 31: Effet anti-tumoral de la propolis cubaine *in vivo*. Inoculation à des souris auxquelles ont été inoculées des cellules tumorales d'Ehrlich (223).

Nous avons constaté dans le chapitre traitant de la cicatrisation qu'un échantillon adapté de propolis pouvait faciliter l'angiogénèse. D'autres échantillons peuvent au contraire aller à l'encontre de ce processus dans le cadre de l'angiogénèse autour de la cellule cancéreuse. (198)

Grâce aux travaux de MM. Banksota *et al.* (224), on peut définir quels composés, dans un extrait de propolis, sont responsables de l'activité antiproliférative de la propolis. Leur efficacité a été testée sur des lignées de cancer du côlon murines, de mélaome murin, de fibrosarcome humain et d'adénocarcinome du poumon humain. Les composés testés regroupent quatre flavonoïdes (1-4), sept dérivés de l'acide cinnamique (5-11) et deux dérivés du glycérol (12,13).

Les composés 9, 10 et 11 possèdent un potentiel d'activité antiproliférative, avec un  $EC_{50}$  de 0,288, 1,76 et 0,11  $\mu$ M (respectivement) pour le carcinome du côlon murin. L'activité antioxydante de ces caféates peut jouer un rôle important dans leur activité antiproliférative.

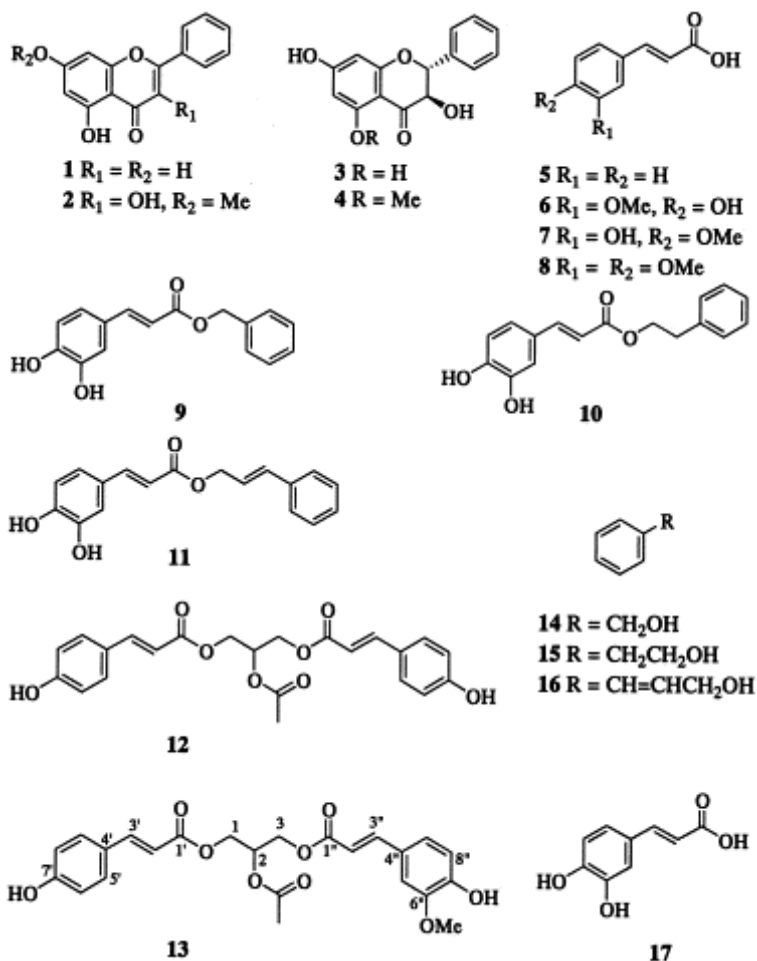


Figure 32: Structure des composés testés pour leur activité antiproliférative (224)

Parmi les molécules ayant une action dans le processus menant à la destruction des cellules cancéreuses, on trouve la plukénétione A, qui induit un arrêt du cycle de la cellule du carcinome du côlon en phase G0/G1, ainsi qu'une fragmentation de son ADN. En présence de cette molécule, les activités de la topoisomérase I et de l'ADN polymérase sont inhibées, ainsi que l'expression de la topoisomérase-II-bêta, du récepteur EGF et des gènes des protéines liés aux résistances contre les médicaments utilisés dans le cadre d'une thérapie contre ce cancer. La plukenetione A contribue à l'effet antitumoral de la propolis, principalement en visant la topoisomérase I et l'ADN polymérase (223).

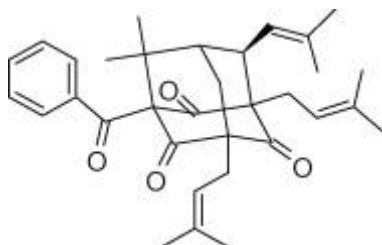


Figure 33: Plukénétione A (223)

Comme nous l'avons vu un peu plus tôt, l'Artépilline C est aussi un constituant important de la propolis en ce qui concerne une éventuelle utilisation dans l'amélioration de la

chimiothérapie, car elle joue un rôle majeur dans la promotion de la voie des TRAIL, permettant ainsi d'augmenter l'efficacité d'un traitement contre les cellules cancéreuses sans induire d'effets secondaires (222).

L'un des composés les plus actifs de la propolis dans le traitement du cancer est le CAPE. MM. Park *et al.* (225) mettent en lumière l'activité remarquable du CAPE sur un type de phospholipase. Leurs travaux prouvent que ce composé supprime l'expression de la phospholipase D 1 au niveau de la transcription via l'inhibition des promoteurs liés au NFκB. L'augmentation de l'expression de la phospholipase D (PLD) est liée fonctionnellement avec les signaux oncogènes et la genèse des tumeurs. Le CAPE a aussi pour activité de se lier à un résidu Cys837 de la PLD 1 et d'inhiber l'activité enzymatique de cette phospholipase. Notons que cette activité ne se manifeste pas chez les analogues du CAPE. Finalement, on peut conclure que l'activité du CAPE sur la phospholipase D 1 peut contribuer à un effet anti-néoplasique. (225)

Si la propolis a une activité antiproliférative, son intérêt dans le domaine du traitement du cancer vient aussi de son potentiel à inhiber le phénomène d'invasion par les cellules cancéreuses. Là encore, on se focalise sur le CAPE.

Ainsi, MM. Lee *et al.* (226) vérifient dans une étude les effets du CAPE sur le phénotype invasif de cellules du carcinome hépatocellulaire humain SK-Hep1. Les résultats sont édifiants. On observe que le CAPE a effectivement inhibé l'invasion par les cellules SK-Hep1 de façon dose-dépendante. L'expression constitutive de MMP-2 et MMP-9 dans les cellules SK-Hep1 a presque été totalement inhibée par un traitement avec 12,5μM de CAPE. Or, les niveaux de métalloprotéines de matrice MMP-2 et/ou MMP-9 sont associés aux phénotypes invasifs des cellules cancéreuses.

Le CAPE a également inhibé l'activité liante du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) à l'ADN dans les cellules SK-Hep1.

D'autres études prouvent que ce composé supprime l'expression de la phospholipase D 1 au niveau de la transcription via l'inhibition des promoteurs liés au NFκB. L'augmentation de l'expression de la phospholipase D (PLD) est liée fonctionnellement avec les signaux oncogènes et la genèse des tumeurs. Le CAPE a aussi pour activité de se lier à un résidu Cys837 de la PLD 1 et d'inhiber l'activité enzymatique de cette phospholipase. Notons que cette activité ne se manifeste pas chez les analogues du CAPE. Finalement, on peut conclure que l'activité du CAPE sur la phospholipase D 1 peut contribuer à un effet anti-néoplasique. (225)

### **Mode d'administration**

Le mode d'administration de la propolis devra être soigneusement étudié si l'on souhaite pouvoir utiliser la propolis dans le cas de tumeurs chez l'humain. Certaines voies semblent liées à une meilleure efficacité que d'autres. Si l'on prend l'exemple de l'étude réalisée par MM. Suzuki *et al.* (218), on observe une nette différence entre la voie orale et la voie sous-cutanée. Dans un test où un extrait aqueux de propolis est administré à un stade précoce d'évolution des tumeurs chez des souris, la voie sous-cutanée a permis d'induire une réduction marquée de ces tumeurs, tandis que la voie orale n'a pas été efficace.

## **Utilité de la propolis dans le cadre d'une chimiothérapie contre le cancer**

Si la propolis montre un effet sur les cellules cancéreuses elles-même, son utilité dans l'arsenal thérapeutique pourrait bien, dans ce domaine encore, se trouver en tant qu'auxiliaire des traitements actuels. Dans un modèle de carcinome chez la souris, en plus des effets que la propolis montre indépendamment de tout traitement, son extrait aqueux augmente de façon significativement la régression des tumeurs lorsqu'il est administré par voie orale avec le 5-fluorouracile ou la mitomycine C, si l'on compare les résultats obtenus avec ceux de ces médicaments seuls (218). De plus, l'administration de cet extrait aqueux diminue la cytopénie induite par le 5-fluorouracile, ce qui permet de rétablir le nombre de leucocytes et d'érythrocytes. Aucun effet n'a été remarqué quant au comptage des plaquettes. Lorsqu'on administre l'extrait aqueux de propolis avec la mitomycine C, on obtient cette fois une diminution de la cytopénie induite pour les leucocytes, les érythrocytes et les plaquettes. Ces résultats suggèrent que la propolis serait un outil thérapeutique remarquable dans les traitements de chimiothérapie, permettant d'augmenter leur efficacité mais pas leurs effets secondaires, tout en réduisant la cytopénie induite, qui est un effet secondaire majeur de la chimiothérapie.

### **3.15. Effet protecteur de la muqueuse gastrique**

MM. Barros *et al.* [106] décrivent un effet gastroprotecteur de l'extrait éthanolique de la propolis verte brésilienne. L'administration d'acide caféique, férulique, p-coumarique et cinnamique diminuent significativement le nombre de lésions de l'estomac ainsi que leur étendue dans le modèle de pylore ligaturé et en utilisant pour doses d'administration 50 et 2250mg/kg. De plus, le pourcentage d'inhibition des ulcères est significativement supérieur. Ces composés testés ont également eu pour action de réduire le volume des sucs gastriques ainsi que leur acidité. Le pH gastrique a donc augmenté, sauf concernant l'acide p-coumarique, pour lequel aucune différence significative de pH n'a été observée à 50mg/kg par rapport au contrôle. Un effet émerge à 250mg/kg. Cette concentration reste bien en-deça de la toxicité, qui est relevée à 2 000 mg/kg.

Parmi les composés exerçant une activité susceptible de réduire le risque d'ulcère gastrique, on retrouve aussi l'apigénine. (116)

Afin de compléter cette connaissance de l'effet anti-ulcère de la propolis, je propose d'étudier un modèle *in vivo*, chez le rat, où l'extrait éthanolique de propolis verte brésilienne permet de réduire les ulcères induits par l'éthanol et l'indométhacine. On observe la même diminution des lésions pour des doses de 50, 250 et 500 mg/kg. Le volume des sécrétions gastriques a là encore diminué, ainsi que leur acidité. (111)

### **3.16. Effet anti-UV**

Les parutions scientifiques rapportent à la fois une activité protectrice de la propolis contre les UVA et les UVB.

L'action anti-UVA a été reportée notamment dans un test de nanoémulsions basées sur un extrait aqueux de propolis et de lycopène. Les auteurs notent que le mécanisme de protection contre les UVA met en jeu les propriétés anti-oxydantes, qui, en participant à la synthèse de prostaglandines et de phospholipides membranaires, exacerbe les mécanismes de protection de la peau. La formulation testée ici par Mmes Butnariu *et al.* ne présente ici pas d'irritation chez les rats sur lesquels elle a été testée. (227)

Tournons-nous à présent vers les connaissances actuelles sur la protection qu'offre la propolis à l'égard des UVB. L'administration topique d'extrait de propolis roumaine aux concentrations de 3 et 21.5 mg de polyphénols /cm<sup>2</sup>, indépendamment du temps d'administration, atténue significativement la formation de malondialdéhyde et restaure l'activité de la glutathion peroxydase après une exposition aux UVB. Cet effet s'observe aussi bien lorsque la propolis a été administrée avant ou après l'exposition. On note une réduction significative de l'hyperplasie épidermique ainsi que de l'inflammation dermique. De plus, on peut déduire de la réduction de la formation de dimères de cyclobutane pyrimidine que la propolis exerce un effet antigénotoxique lors d'une exposition du sujet aux UVB (228).

### 3.17. Effet laxatif

Afin de tester des extraits éthanolique et aqueux de propolis verte brésilienne MM. Kakino *et al.* (229) ont réalisé une administration orale de ces extraits à différents dosages à des souris dont on a provoqué une constipation par l'administration de deux types de drogues, le loperamide (un agoniste des récepteurs opioïdes  $\mu$ ) et la clonidine (agoniste des récepteurs  $\alpha$ -2 adrénergiques). Cette équipe a également fait des recherches concernant l'effet de l'extrait aqueux sur le transit gastro-intestinal et le degré de contraction de l'iléum pour découvrir le mécanisme d'action de cet extrait.

Le traitement à l'extrait aqueux, et non celui à l'extrait éthanolique, a augmenté significativement le poids des selles chez les souris saines. L'extrait aqueux a restauré la fréquence et le poids des selles dans la constipation induite par la clonidine, mais pas par le loperamide. Il n'affecte pas le transit gastro-intestinal, mais augmente considérablement le degré de contraction de l'iléum isolé de cochon d'inde. Cette augmentation de la contraction est inhibée par un antagoniste des récepteurs à l'acétylcholine (atropine), mais pas par un récepteur des récepteurs 5-HT (GR113808).

On peut en conclure que l'extrait aqueux de propolis a un effet laxatif sur les souris saines et celles dont on a induit la constipation par clonidine. Cet effet laxatif peut être expliqué par une augmentation de la contraction basale de l'iléum via une activation des récepteurs à l'acétylcholine

Cette étude, en comparant l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique et en procédant par élimination logique des composants potentiellement actifs, laisse penser que ce sont des composants hydrophiles, dont l'acide férulique et isoférulique, mais pas les métabolites de type acide cafféique et acide quinique, qui seraient les composants actifs dans cette action laxative.

Lors des tests, aucune diarrhée induite par la propolis n'a été relevée, ce qui peut s'expliquer par son mécanisme pharmacologique particulier : l'extrait aqueux de propolis n'inhibe pas la réabsorption d'eau par l'intestin.

### 3.18. Effet hépatoprotecteur

Les maladies hépatiques sont un des facteurs de morbidité chez les diabétiques de type 2. Dans un modèle *in vivo* où de la streptozotocine est administrée à des rats dans le but de leur infliger des lésions hépatiques. La streptozotocine provoque des dommages hépatiques via une hyperglycémie, ce qui est effectivement très proche du modèle d'un sujet diabétique de type 2. Avec une dose en propolis de 300mg/kg/jour, on observe sur les coupes histologiques des rats sacrifiés moins de signes de toxicité de la streptozotocine, qui se manifestent par une infiltration de leucocytes et une prolifération des cellules de Küpffer. Le traitement à la propolis mène à une apparente réparation des hépatocytes dégradés. La propolis peut donc permettre de diminuer les dommages hépatiques chez le sujet diabétique de type deux, et possède une action hépatoprotectrice contre les dommages que peuvent subir les hépatocytes dans un modèle d'hyperglycémie induite chez le rat (230).

### 3.19. Effet sur le muscle lisse

MM. Paulino *et al.*, dans un modèle *in vitro* avec un extrait éthanolique de propolis, observent une inhibition des contractions des muscles lisses de la trachée induits par histamine ( $IC_{50} = 50 \pm 5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), capsaïcine ( $IC_{50} = 26.8 \pm 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), KCl à 80 mM ( $IC_{50} = 27.8 \pm 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), et carbachol ( $IC_{50} = 54 \pm 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (176). Il semblerait que la propolis exerce une action myorelaxante, encore que la documentation à ce sujet reste encore rare (ici, ces résultats n'ont été obtenus que dans le contexte d'une étude, plus large, sur l'effet analgésique de la propolis).

### 3.20. Effets secondaires

L'un des atouts de la propolis est sa très faible toxicité. Chez le rat, la DL50 d'un extrait concentré de propolis a été évaluée à 15g/kg. Selon l'Afssa, la dose la plus élevée sans effets indésirables est de 1400 mg/kg chez l'animal et une supplémentation de 1,95g/j pendant 30 jours n'a pas entraîné d'effets indésirables chez l'Homme (4).

En effet, certains composants de la propolis ont été identifiés comme possédant une cytotoxicité à forte dose (35). MM. Díaz-Carballo *et al.* (223) ont identifié parmi elles le mucronatol et le némorosone.



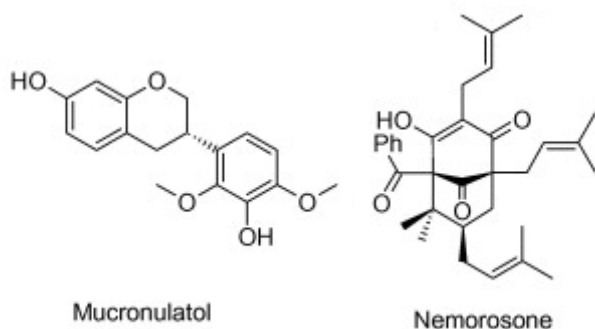


Figure 34: Mucronatol et némososone. (223)

Il a été observé des allergies de contact, principalement dues à des dérivés d'acide cinnamique, et surtout à un composé particulier : le 3,3-diméthylallyl caffeate (231). La littérature scientifique reporte en effet des cas d'allergies à la propolis, avec pour symptôme décrit une dermatite systémique lors d'ingestion de ce produit (232), mais aussi des érythèmes, des prurits et des éruptions de vésicules érythémateuses, ainsi qu'un eczéma de contact lors d'une utilisation topique, comme ce fut le cas pour un homme de 46 ans sur lequel des patch tests ont confirmé que l'origine de la réaction allergique était bien la propolis (233). On rapporte également des cas de dermatites hyperkératosiques, des stomatites lors d'ingestion de propolis, et de l'eczéma vulvaire lors d'un usage topique.

Un cas d'œdème laryngé avec choc anaphylactique a été reporté lors d'une utilisation de la propolis en topique dans le traitement d'une pharyngite (234). On reporte également un cas où le patient traité eut besoin d'une hémodialyse après une souffrance rénale causée par un traitement par voie orale à la propolis (3).

Il est déconseillé d'utiliser le Baume du Pérou conjointement à la propolis, car ces deux substances ont plusieurs composés chimiques en commun et leur utilisation conjointe renforce le risque de réaction allergique (3).

Les dermatologues et les médecins généralistes souhaitant utiliser cette substance naturelle doivent donc être informés de cette possibilité de réaction. Le traitement des réactions cutanées dues à l'usage topique de propolis implique de laver la zone avec de l'eau et du savon. On peut ensuite utiliser des corticoïdes en topique (3).

MM. Gardana *et al.* (235) proposent d'atténuer les risques d'allergie en hydrolysant les esters caféates, qui sont les principaux composants responsables des allergies à la propolis, en les soumettant à l'action de la cinnamoyle estérase issue de *Lactobacillus helveticus*. Bien que cette hydrolyse diminue probablement l'activité de la propolis, ces auteurs se montrent optimistes en arguant que le contenu en flavonoïdes ne diminue pas. Cela pourrait être un axe à développer.

Enfin, la propolis peut modifier les résultats biologiques d'échantillons d'urines. L'inhibition de l'aromatase par la chryisine peut bloquer la conversion d'androgènes en oestrogènes, avec pour conséquence une augmentation de la testostérone mesurée par les laboratoires d'analyses médicales (3).

### **3.21. Doses thérapeutiques de la propolis**

Dans une utilisation chez l'Homme, la monographie de la propolis préconise la dose de 250 mg de propolis trois fois par jour pour une utilisation orale antibactérienne, 10mL de propolis à 0.2-10% pour des bains de bouche, des crèmes à 5% contre les cervicites aiguës, ainsi qu'une forme contenant 3% de propolis contre l'herpès génital dans le cadre d'un traitement topique. Dans le cadre d'une vaginite, il est conseillé d'utiliser un lavage à la propolis aqueuse à 5% (3).

# Conclusion

La propolis est une alternative thérapeutique que l'on peut utiliser dans de nombreuses pathologies humaines, qu'elles soient bénignes (la propolis présente une efficacité tout à fait remarquable pour le traitement de l'herpès labial et génital, ainsi que de la candidose génitale) ou plus morbides (bien qu'il ne soit pas suffisant pour traiter différents types de cancer, il permet d'augmenter l'efficacité des traitements existants et d'en diminuer les effets secondaires). Sa grande complexité d'activité s'explique en partie par la synergie de ses composants, à l'instar de nombreux composés naturels. Mais d'autres facteurs interviennent pour faire varier sa composition d'un échantillon à l'autre, comme la flore locale, l'espèce, voire la variété, d'abeille productrice.

Il convient de déterminer dans quel cas l'utiliser, et quel type de propolis sous quelle forme sera réellement utile. Pour cela, il faut pouvoir déterminer quelles espèces chimiques contiennent la propolis récoltée. Dans les pays où la propolis est commercialisée, on trouve effectivement des problèmes de contrôle qualité. Prochainement, une vieille question devra être résolue : quelle propolis est la plus efficace pour quelle maladie ? De plus, les propriétés pharmacologiques précises de la propolis doivent être connues.

Pour cela, on utilise des méthodes chromatographiques afin de séparer les complexes de propolis en fractions. Le fait d'isoler les composés chimiques de la propolis permet de les quantifier et de les identifier. Certaines techniques spectrométriques peuvent être appliquées pour la caractérisation des échantillons. Il semblerait que l'idéal soit de coupler des techniques chromatographiques à une spectrométrie de masse.

Les domaines d'utilisation de la propolis sont très variés. Outre son activité bactériostatique et bactéricide qui est de loin la plus largement documentée, la propolis permet de combattre efficacement de nombreux champignons pathogènes et virus et exerce également un effet inhibiteur sur certains parasites. Elle est immunomodulatrice, et cette propriété est liée à une autre : l'effet anti-inflammatoire. La propolis agit contre la douleur et est un anesthésique local lorsqu'on l'administre en voie sous-cutanée. Elle est antioxydante et cicatrisante, et peut même permettre une réparation plus rapide des nerfs et des os lésés. Son effet antiprolifératif sur les cancers est d'autant plus prometteur qu'il est associé à une diminution de la cytopénie secondaire aux traitements existants. Lors d'un usage thérapeutique de propolis, il faut toutefois agir avec prudence, car des réactions allergiques ont déjà été enregistrées, bien qu'elles restent assez rares. L'idéal serait peut-être de pratiquer de petites applications cutanées en guise de test avant d'utiliser pleinement ce produit.

Conscient des multiples avantages que représente l'utilisation de la propolis dans le domaine médical, le Japon en est d'ores et déjà un fervent utilisateur. C'est même le pays qui utilise le plus au monde la propolis dans un cadre thérapeutique, et celui déposant le plus de brevet concernant ce produit de la ruche, suivi de loin par les Etats-Unis, l'Allemagne et la Hongrie.

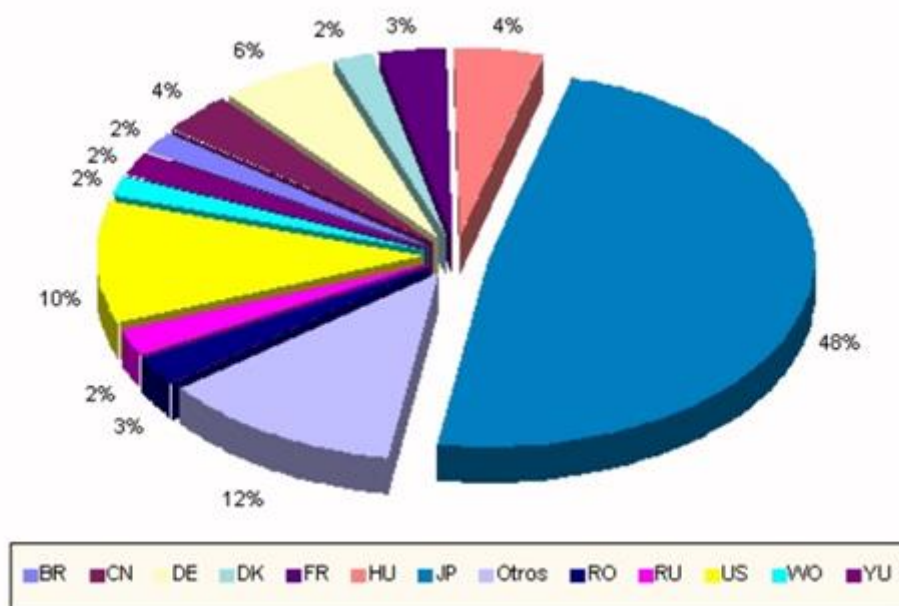


Figure 35: Répartition de la déposition de brevets concernant la propolis selon les pays. (236)

BR : Brésil - CN : Chine - DE : Allemagne - DK : Danemark - FR : France - HU : Hongrie – JP : Japon - Otros : Autres pays - RO : Roumanie - RU : Russie - US : Etats-Unis – WO : demande de dépôt de brevet internationale – YU : correspond au code pour l’ancienne Yougoslavie.

La propolis brésilienne compose une grande part de celle qu’utilise le Japon (80% de la propolis importée par le Japon est brésilienne).

Le premier brevet d’invention déposé pour l’usage thérapeutique de la propolis était cependant allemand (DD1972072165709: “Composition for treating periodontopathy”) en 1972. Dans les années 70, seule l’Europe déposait des brevets sur l’utilisation de la propolis, puis elle fut rejointe par les Etats Unis dans les années 80. Depuis la conférence de Nagoya en 1985, l’utilité de la propolis dans le domaine médical commença à se faire connaître au Japon qui va dès lors commencer à poser des brevets.

Les brevets déposés sur ce sujet sont le reflet d’une utilisation croissante de la propolis. Une recherche sur différentes bases de données a donné pour résultat ce graphique, qui représente le nombre de brevets déposés sur des produits utilisant la propolis selon l’année.

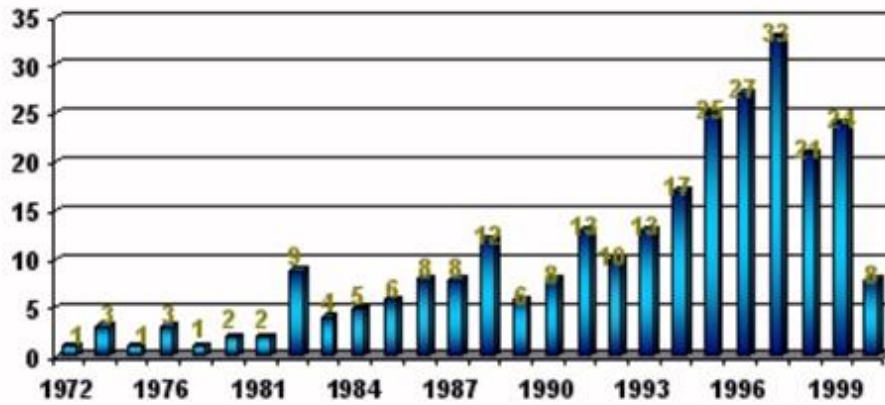


Figure 36: nombre de brevets déposés sur des produits utilisant la propolis, valeur absolue. (236)

Selon l'International Patent Classification (IPC), la classification internationale des brevets, la plupart des brevets déposés correspondent à l'IPC : A61K : Préparations à but médical, stomatologique ou hygiénique et A23L : nourriture, supplément nutritionnel ou boisson. Le A61K représente 53,6% des 138 documents étudiés entre 1995 et 2000.

La répartition de ces brevets selon le domaine d'utilisation est la suivante. La catégorie « Medical Properties » regroupe les produits qui ont de multiples usages médicaux ou dont l'usage médical n'est pas clairement défini.

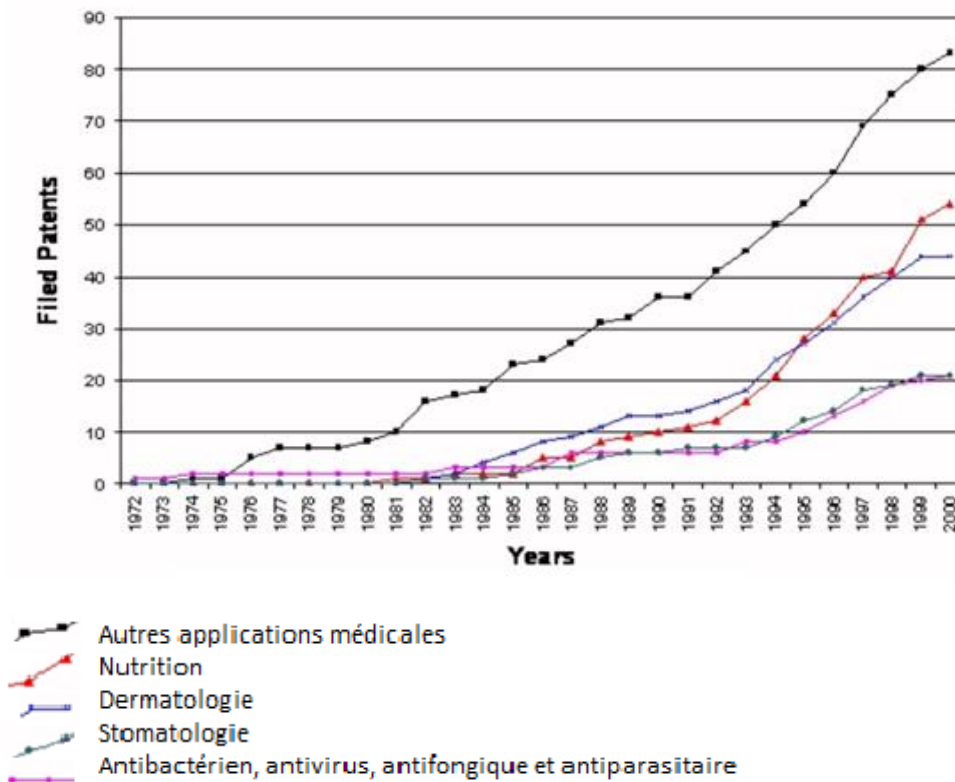


Figure 37: brevets déposés par année selon le domaine d'utilisation de la propolis. (236)

Jusqu'en 1993, les brevets concernaient essentiellement des méthodes de préparation de la propolis ou des formulations susceptibles d'en contenir afin de conserver ses propriétés. Mais depuis, les brevets protègent d'avantage les produits que les méthodes d'extraction :

La possibilité d'utiliser la propolis à des fins thérapeutiques pose également la question de la préservation des abeilles dans le monde. Comme on le sait, la population d'abeilles décroît actuellement de façon considérable. Ainsi, dans un rapport remis en octobre 2008, le député Martial Saddier propose au premier ministre d'inscrire l'abeille mellifère au Patrimoine Mondial de l'Unesco. Une récente étude réalisée en Grande Bretagne et aux Pays Bas, réalisée par Jacobus Biesmeijer et ses collègues, atteste d'un appauvrissement de la richesse biologique des populations d'abeilles sauvages : de 30 à 60% en nombre d'espèces, dans 52% des zones étudiées en Grande Bretagne et 67% des zones étudiées aux Pays-Bas. Si la propolis peut offrir de nouvelles possibilités à la médecine, elle pose aussi la question de l'appauvrissement de notre patrimoine naturel via la diminution de la biodiversité (237).

# Bibliographie

1. **M.P., Rolin.** Intérêt thérapeutique et diététique des produits de la ruche. 1984.
2. **Y., Donatieu.** *La propolis*. 1981.
3. **Nelsen J., Ulbricht C., Cohan R.P., Basch E., Hashmi S., Bent S., Rogers A., Weissner W.** Propolis- Natural Standard Monograph. [En ligne] 2007. [www.naturalstandard.com](http://www.naturalstandard.com).
4. **Cardinault N., Cayeux M.O., Percie du Sert P.** La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*. 2012, pp. n. 10, p.298-304.
5. **Cuesta-Rubio O., Piccinelli A.L., Fernandez M.C., Hernández I.M., Rosado A., Rastrelli L.** Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis. . *J Agric Food Chem* . 2007, pp. n. 5, p. 7502-7509. .
6. **A., Spürgin.** *Guide de l'abeille*. s.l. : Delachaux & Niestlé, 2010.
7. **M., Ricard.** *Je fais mon miel*. Paris : Hachette pratique, 2010.
8. **H., Clément.** *Le traité rustica de l'apiculture*.
9. **E., Schivre.** L'abeille, ses produits de sécrétion et leurs utilisations thérapeutiques. 2006.
10. **Biri, Melchior.** *Le grand livre des abeilles*. s.l. : De Vecchi, sept. 2002.
11. **J., Kevitz.** Une immunité très sociale. *Abeilles & Cie*. 2012, pp. n. 137, p.32.
12. **Salatino A., Teixeira EW., Negri G., Message D.** Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2005, pp. 2, 33-8.
13. **Teixeira EW., Negri G., Meira RM., Message D., Salatino A.** Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2005, pp. 2, 85-92.
14. **MC., Marcucci.** Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995, pp. 26, 83-99.
15. **Darrigol, Jean-Luc.** *Le miel pour votre santé, propriétés thérapeutiques du miel, du pollen, de la gelée royale et de la propolis*. St Jean-de-Braye : Editions Dangles, 1979.
16. **Silici S., Kultuca S.** Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacol*. 2005, pp. 99, 69-73. .
17. **Castaldo S., Capasso F.** Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002, pp. 73, 1-6. .
18. **Liberio S.A., Pereira A.L., Dutra R.P., Reis A.S., Araújo M.J.A.M., Mattar N.S., Silva L.A., Ribeiro M.N.S., Nascimento F.R.F., Guerra R.N.M., Monteiro-Neto V.** Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary and Alternative Medicine* . 2011, pp. n. 11, p. 108.
19. **Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S.** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* . 1999, pp. n. 64(3), p. 235-240.
20. **Quezada-Euan J.J.G., de Jesus May-Itza W., Gonzalez-Acereto J.A.** Meliponiculture in Mexico: problems and perspectives for development. *Bee World* . 2001, pp. n. 82, p. 160-167.
21. *Propolis production by differents methods*. **Inoue, H. Tiemi, et al.** 2007, Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal, pp. VOL. 15, No 2, pp. 65-69.

22. **A., Nicolas.** Cire d'abeille et propolis. 1947.
23. **Negri G., Marcucci M.C., Salatino A., Salatino M.L.F.** Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2000, p. v.11 n.5.
24. **Trusheva B., Todorov I., Ninova M., Najdenski H., Daneshmand A., Bankova V.** Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal*. 2010, pp. vol. 4, n.8.
25. *Analytical method applied to diverse types of Brazilian propolis.* **Alexandra CHF Sawaya, Ildenize Barbosa, da Silva Cunha, Maria C Marcucci.** 2011, Chemistry Central Journal.
26. **Park YK, Ikegaki M.** Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosi Biotech Biochem* . 1998, pp. 62:2230-2232.
27. **Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, Povia GS, Carvalho PO.** Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc*. 2004, pp. 15:964-970.
28. **Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Sforcin JM., Frete X., Kujungiev A., Maimoni-Rodella R., Popov S.** Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. . *Z. Naturforsch.* 1999, pp. 54, 401-5.
29. **Fernandes Jr. A., Leomil L., Fernandes AAH., Sforcin JM.** The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Anim. Toxins*. 2001, pp. 7, 173-82.
30. **Miyake T., Nakamura S.** *Solid product containing propolis components, and preparation and uses thereof.* US5561116 A 1994.
31. **Monti M., Berti E., Carminati G., Cusini M.** Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. 1983, pp. 9, 163.
32. **Perreau, F.** *La propolis démystifiée.* Aix-en-provence : LA SOURCE, 1985.
33. **Milena P. Popova, Ioanna B. Chinou, Ilko N. Marekov, Vassya S. Bankova.** Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*. Juill. 2009, pp. vol. 70, iss 10, p.1262-1271.
34. **Haile K., Kebede T., Dekebo A.** A comparative study of volatile components of propolis (bee glue) collected from Haramaya University and Assela Beekeeping centers, Ethiopia. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2012, pp. 26(3), p. 353-360.
35. **Cechinel-Filho V., Yunes R.A.** Estratégias for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. *Química Nova*. 1998, pp. n. 21, p. 99–105.
36. **Negri G., Marcucci M.C., Salatino A., Salatino M.L.F.** Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*. 1998, pp. n.29, p.305-314.
37. **V. Bankova, R. Christov, G. Stoev, S.J. Popov, S. J. Chromatogr.** 1992, 607, 150. Determination of phenolics from propolis by capillary-gas chromatography. *Chromatograph*. 1992, pp. n.607, p.150-153.
38. **J.A., Lobo.** Morphometric isozymic and mitochondrial variability of Africanized honeybees in Costa Rica. *Heredity* . 1995, pp. n. 75, p. 133–141.
39. **Pereira A.S., Poças E.S.C., Ramos M.F.S., Cardoso J.N., Aquino Neto F.R.** Aplicação da Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e de Alta Temperatura no Estudo da Composição química de Própolis Brasileira. *Livro de Resumos do I Simpósio Brasileiro Sobre Própolis e Apiterápicos*. 1999, p. p. 38.
40. **Fernandes Jr. A., Sugizaki M.F., Fogo M.L., Funari S.R.C., Lopes C.A.M.** In Vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of venomous animals and toxins*. 1995, p. v.1 n.2.
41. **NMF., Alcici.** Heavy metals in propolis: practical and simple procedures to reduce the lead in the Brazilian propolis. *Chemical Abstracts*. 1996, pp. 127, 236-7.



42. **Bankova V., Christov R., Popov S., Marcucci M.C., Tswetkova I., Kujumgiev A.** Antibacterial activity of essential oils from Brazilian Propolis. *Fitotherapy*. 1999, pp. n.70, p.190-193.
43. **Bankova V., Christov R., Kujumgiev A., Marcucci M.C., Popov S.** Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. *Z Naturforsch*. 1995, pp. n. 50c, p.167-172.
44. **Marcucci M.C., Sawaya A.C.H.F., Custodio A.R., Paulino N., Eberlin M.N.** HPLC and ESI-MS typification: new approaches for natural therapy with Brazilian propolis. *Scientific evidence of the use of propolis in Ethnomedicine*. Kerala, Inde : Transworld Research Network, 2008, pp. 33-54.
45. **Sawaya AC.H.F., Tomazela D.M., Cunha I.B.S., Bankova V.S., Marcucci M.C., Custódio A.R., Eberlin M.N.** Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*. 2004, pp. n. 129, p. 739-744.
46. **Sforcin J.M., Novelli E.L.B., Funari S.R.C.** Saesonal effet of Brazilian propolis on seric biochemical variables. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 2002, pp. v.8, n.2, p.244-254.
47. **Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T.** Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004, pp. 84, 329-39.
48. **V., Bankova.** Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol*. 2005, pp. 100, 114-7.
49. **Sforcin J.M., Funari S.R.C., Novelli E.L.B.** Serum biochemical determinations of propolis-treated rats. *J. Venom. Anim. Toxins*. 1995, p. vol. 1 n. 1.
50. **Steinebach O.M., Wolterbeek H.T.** Role of cytosolic copper, metallothionein and glutathione in copper toxicity in rat hepatoma tissue culture cells. *Toxicology*. 1994, pp. n. 92, p.75-90.
51. **Cohen L., Djordjevich J., Jacibsen S.** The contribution of isoenzymes of serum lactic dehydrogenase (LDH) to the diagnosis of specific organ injury. *Med. Clin. North Am*. 1996, pp. n. 50, p.193-205.
52. **Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Popov S., Sforcin J.M., Funari S.R.C.** Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. . *Apidologie*. 1998, pp. n. 29, p. 361-7.
53. **E.L., Ghisalberti.** Propolis. A review. . *Bee World*. 1979, pp. n. 60, p. 59-84.
54. **Oksuz H., Duran N., Tamer C., Cetin M., Silici S.** Effect of propolis in the treatment of experimental Staphylococcus aureus keratitis in rabbits. . *Ophthalmic Res*. . 2005, pp. n. 37, p. 328–334.
55. **B., Havsteem.** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacology potency. . *Biochem. Pharmacol*. . 1983, pp. n. 32, p. 1141–1148.
56. **Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Calder P.C.** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. . *Microbiol. Res*. 1997, pp. p. 152, n.239–246.
57. **Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A.** Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, pp. vol. 47, no. 10, pp. 3357–3.
58. **Tajaisi-Kikuni NB., Schilcher H.** Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*. 1994, pp. 60, 222-7.
59. **Mirzoeva OK., Grishanin RN., Calder PC.** ntimicrobial action of propolis and some of its components: the effects of growth, membrane potential and mobility of bacteria. *Microbiological Res*. 1997, pp. 152, 239-46.
60. **Krol W., Scheller S., Shani J., Pietsz G., Czuba Z.** Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of Staphylococcus aureus. *Arzneimittelforschung*. 1993, pp. n. 43, p.607-609.

61. **Seidel V., Peyfoon E., Watson D.G., Fearnley J.** Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. . *Phytother. Res.* . 2008, pp. n. 22, p. 1256–1263.
62. **Kujumgiev A., Tsvetkova I., Seredjieva YU., Bankova V., Christov R., Popov S.** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. . *J. Ethnopharmacol.* 1999, pp. 64, 235-40.
63. **Stepanovic S., Antic N., Dakic I., Svabic-Vlahovic M.** In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiology Research.* 2003, pp. n. 158, p. 353-357.
64. **AL-Waili N., Al-Ghamdi A., Ansari M.J., Al-Attal Y., Salom K.** Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *Int J Med Sci.* 2012, pp. n. 9(9), p. 793-800.
65. **Nostro A., Cellini L., di Bartolomeo S., Cannatelli M.A., di Campi E., Procopio F., Grande R., Marzio L., Alonzo V.** Effects of combining extracts (from propolis or Zingiber officinale) with clarithromycin on Helicobacter pylori. . *Phytother. Res.* 2006, pp. n. 20, p. 187–190.
66. **Orsi R.O., Fernandes A., Bankova V., Sforcin J.M.** The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against Salmonella Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Natural Product Research.* . 2012, pp. n. 26(5), p. 430–437.
67. **Orsi R.O., Fernandes Junior A., Bankova V., Sforcin J.M.** Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics acting on the bacterial DNA and folic acid. *Nat. Prod. Res.* 2012, pp. n.26, p.344-349.
68. **Fernandes Jr. A., Balestrin E.C., Betoni J.E.C., Orsi R.O., da Cunha M.R.S., Montelli A.C.** Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005, pp. n. 100, p.563–566.
69. **Gordon J.R., Lowy F.D.** Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Clinic Infections Diseases.* 2008, 46, 350–359, pp. n. 46, p.350-359.
70. **Wojtyczka R.D., Dziedzic A., Idzik D., Kępa M., Kubina R., Kabała-Dzik A., Smoleń-Dzirba J., Stojko J., Sajewicz M., Wąsik T.J.** Susceptibility of Staphylococcus aureus Clinical Isolates to Propolis. *Molecules.* 2013, pp. n. 18, p.9623-9640.
71. **Esimone C.O., Iroha I.R., Ibezim E.C., Okeh C.O., Okpana E.M.** In vitro evaluation of the interaction between tea extracts and penicillin G against Staphylococcus aureus. . *Afr. J. Biotechnol.* 2006, pp. n. 5, p. 1082–1086.
72. **DC., Shanson.** Staphylococcal infections in hospital. . *The British Journal of Hospital Medicine.* . 1986, pp. n. 35(5), p. 312-320.
73. **Staphylococcus: Molecular Genetics. Queck SY, Otto M.** Norfolk, UK : s.n., 2008. Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci; Caister Academic Press.
74. **Mantovani R.P., Rall V.L.M., Batalha J.E.N., Fernandes A.A.H., Fernandes A.** Anti-coagulase-negative Staphylococcus activity of ethanolic extracts of propolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by the E-test method. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases.* 2008, pp. n. 14(2), p.357–365.
75. **Najmadeen HH, Kakamand FAK.** Antimicrobial activity of propolis collected in different regions of Sulaimani province-Kurdistan region/Iraq. *Journal of Duhok University.* . 2009, pp. n. 12(1), p.233–239.
76. **Orozco A.L., Acevedo J.G.A., Martinez M.M.C., et al.** Antibacterial comparative study between extracts of mexican propolis and of three plants which use Apis mellifera for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* . 2010, pp. n. 9(8), p.1250–1254.
77. **Wojtyczka R.D., Kępa M., Idzik D., Kubina R., Kabała-Dzik A., Dziedzic A., Wąsik T.J.** In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Polish Propolis against Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis Strains. *Hindawi Publishing Corporation.* 04 Oct. 2013.
78. **Rowe NH, Aron SM, Clark DC, Gume KE.** Effect of age, sex, race and economic statute on dental caries experience of the permanent dentition. *Paediatrics.* 1996, pp. n. 57, p. 457-461.

79. **Ikeda T., Sandham H.J., Bradley E.L.** Changes in Strept. mutans and Lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children. *Arch. Oral. Biol.* 1973, pp. n. 18 p. 555-566.
80. **P.H.C., Keyes.** Present and future methods for dental caries control. *J. Am. Coll. Dent.* . 1998, pp. p. 111, n. 243-249.
81. **Ophori E.A., Eriagbonye B.N., Ugbodaga P.** Antimicrobial activity of propolis against Streptococcus. *African Journal of Biotechnology.* 2010, pp. n. 9(31), p. 4966-4969 .
82. **Erkmen O., Özcan M.M.** Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *Journal of Medicinal Food.* 2008, pp. n. 11 (3), p. 587-592.
83. **ANSES.** Fiche Bacillus Cereus. [En ligne] [Citation : 11 Janvier 2014.] <http://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC-Fi-FicheBacillusCereus.pdf>.
84. **Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R.** The spatial architecture of Bacillus subtilis biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *PLoS One.* . 2011 , p. 6(1):e16177.
85. **Righi A.A., Alves T.R., Negri G., Marques L.M., Breyer H., Salatino A.** Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2011, pp. n. 91(13), p. 2363–2370.
86. **Siripatrawan U., Vitchayakitti W., Sanguandeeikul R.** Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology.* 2013, pp. n. 48(1), p. 22–27.
87. **Onlen Y., Tamer C., Oksuz H. et al.** Comparative trial of different antibacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on Pseudomonas keratitis in rabbits. *Microbiol. Res.* 2007, pp. n. 162, p. 8-62.
88. **Musa T.N., Salih N.M., Ulaiwi W.S.** Detection of Some Active Compounds in Aqueous and Ethanolic Extracts of Iraqi Propolis and Examine Their Antibacterial Effects. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2012, pp. n. 11(1), p. 83-87.
89. **Helaly G.F., El-Aziz A.A.A., Sonbol F.I., El-Banna T.E., Louise N.L.** Dexpanthenol and propolis extract in combination with local antibiotics for treatment of Staphylococcal and Pseudomonas wound infections. *Archives of Clinical Microbiology.* 2011, p. Volume 2(4).
90. **Yang H.Y., Chang C.M., Chen Y.W., Chou C.C.** Inhibitory effect of propolis extract on the growth of Listeria monocytogenes and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2006, pp. n. 86(6), p. 937-943.
91. **ANSES.** Fiche Listeria Monocytogenes. [En ligne] [Citation : 11 Janvier 2014.] <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Listeria.pdf>.
92. **Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B.** Salmonella Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 2000 , pp. vol. 38 no. 7, p. 2465-2467.
93. **Ohl M.E., Miller S.I.** . Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. *Ann. Rev. Med.* 2001, pp. n. 52, p. 259-274 .
94. **Stoner M.C., Forsythe R., Mills A.S., Ivatury R.R., Broderick T.J.** . Intestinal perforation secondary to Salmonella Typhi: case reported and review of the literature. *Amer. Surg.* 2000, pp. n. 66, p. 219-22.
95. **Orsi R.O., Sforcin J.M., Rall V.L.M., Funari S.R.C., Luciano B., Fernandes JR A.** Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* . 2005, p. vol.11 no.2 .
96. **Orsi R.O., Sforcin J.M., Funari S.R.C., Fernandes Junior A., Bankova V.** Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella Typhi. *Braz. J. Microbiol.* 2006, p. vol.37 no.2 .
97. **Murugan S., Devi P.U., Selvi S., Cmnnaswamy P., Mani K.R.** Antimicrobial potential of Ethanolic Extracts of Indian Propolis (EEIP's) against human pathogens. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences.* 2008, pp. n. 10 (3) , p. 557-561.

98. **Orsi R.O., Sforcin J.M., Funari S.R.C., Bankova V.** Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology*. 2005, pp. n. 5 (2) , p. 359-368.
99. **de Andrade Ferreira F.B., Torres S.A., da Silva Rosa O.P., Ferreira C.M., Garcia R.B., Marcucci M.C., Gomes B.P.F.A.** Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2007, pp. n. 104 (5) , p. 709-716.
100. **Boyanova L., Kolarov R., Gergova G., Mitov I.** In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* . 2006, pp. n. 12 (4) , p. 173-177.
101. **ANSES.** Fiche E. coli. [En ligne] [Citation : 22 Janvier 2014.] <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Ecoli.pdf>.
102. **Fernandes Jr. A. , Lopes C.A.M., Sforcin J.M., Funari S.R.C.** Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Venom. Anim. Toxins* . 1997, p. vol. 3 n. 2.
103. **Netíková L., Bogusch P., Heneberg P.** Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. *Journal of Food Science*. 2013, pp. n. 78 (9) , p. M1421-M1429.
104. **Lavigne J.P., Vitrac X., Bernard L., Bruyère F., Sotto A.** Propolis can potentialise the anti-adhesion activity of proanthocyanidins on uropathogenic *Escherichia coli* in the prevention of recurrent urinary tract infections. *BMC Research Notes* . 2011, pp. n. 4, p.522 .
105. **Moncla B.J., Guevara P.W., Wallace J.A., Marcucci M.C., Nor J.E., Bretz W.A.** The inhibitory activity of typified propolis against *Enterococcus* species. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*. 2012, pp. n. 67 C (5-6) , p. 249-256.
106. **Jahromi M.Z., Toubayani H., Rezaei M.** Propolis: A new alternative for root canal disinfection. *Iranian Endodontic Journal* . 2012, pp. n. 7 (3) , p. 127-133.
107. **Kayaoglu G., Ömürlü H., Akca G., Gürel M., Genay O., Sorkun K., Salih B.** Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics* . 2011, pp. n. 37 (3) , p. 376-381.
108. **Cui K., Lua W., Zhua L., Shena X., Huang J.** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, inhibits *Helicobacter pylori* peptide deformylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, pp. n. 435(2), p. 289-294.
109. **Bonvehí J.S., Gutiérrez A.L.** The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, pp. n. 28(4), p. 1351-1358.
110. **Mkrtchyan, Z.G.** Methods and means of *Helicobacter pylori* eradication in the oral cavity. *New Armenian Medical Journal* . 2011, pp. n. 5 (3) , p. 41-45.
111. **Barros M.P., Lemos M., Maistro E.L., Leite M.F., Sousa J.P.B., Bastos J.K., Andrade S.F.** Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology* . 2008, pp. n. 120 (3) , p. 372-377.
112. **Skiba M., Szliszka E., Kunicka M., Król W.** Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on interleukin 8 release by human gastric adenocarcinoma cells (AGS) infected with *Helicobacter pylori*. *Central-European Journal of Immunology* . 2011, pp. n. 36 (2) , p. 65-69.
113. **Elaine C.E. Gebara, Luiz A. Lima, Marcia P.A. Mayer.** Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian journal of microbiology*. déc. 2002.
114. **Schnitzler P., Neuner A., Nolkemper S., Zundel C., Nowack H., Sensch K.H., Reichling J.** Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research* . 2010, pp. n. 24 (1) , p. S20-S28.

115. **Vilela C.O., Fischer G., de Castro C.C., Nunes C.F., Hübner S.O., Raffi M.B., Salles S.E., Vargas G.D.** Virucidal activity of green propolis against avipoxvirus in chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. *African Journal of Microbiology Research* . 2011, pp. n. 5 (9) , p. 1075-1082.
116. **Diaz NJ., Queveno AO., Luna SB.** Determination of Fe, Mn, Zn, and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. *Rev. CENIC. Ciências Químicas*. 1997, pp. 28, 93-5.
117. **Shimizu T., Hino A., Tsutsumi A., Yong K.P., Watanabe W., Kurokawa M.** Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* . 2008, pp. n. 19 (1) , p. 7-13.
118. **Serkedjieva J., Manolova N., Bankova V.** Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products* . 1992, pp. n. 55 (3) , p. 294-297.
119. **Kuwata K., Urushisaki T., Takemura T., Tazawa S., Fukuoka M., Hosokawa-Muto J., Araki Y.** Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* . 2011 , p. art. n. 254914.
120. **InVS.** Actualités / Infection à VIH et sida. [En ligne] [Citation : 23 Janvier 2013.] <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infection-a-VIH-et-sida/Actualites>.
121. **Gekker G., Hu S., Spivak M., Lokensgard J.R., Peterson P.K.** Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology* . 2005, pp. n. 102 (2) , p. 158-163.
122. **Burke T.R. Jr, Fesen M.R., Mazumder A. et al.** Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J. MEd Chem*. 1995, pp. n. 38, p. 218-31.
123. **Ito J., Chang F.-R., Wang H.-K., Park Y.K., Ikegaki M., Kilgore N., Lee K.-H.** Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products* . 2001, pp. n. 64 (10) , p. 1278-1281.
124. **Kurokawa M., Shimizu T., Takeshita Y., Takamori Y., Kai H., Sawamura R., Yoshida H., Shiraki K.** Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* . 2011 , p. art. n. 976196.
125. **Huleihel M., Isanu V.** Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Israel Medical Association Journal* . 2002, pp. n. 4 (11) , p. 923-927.
126. **Amoros M., Simões C.M.O., Girre L., Sauvager F., Cormier M.** Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* . 1992, pp. n. 55 (12) , p. 1732-1740.
127. **Nolkemper S., Reichling J., Sensch K.H., Schnitzler P.** Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* . 2010, pp. n. 17 (2) , p. 132-138.
128. **Vynograd N., Vynograd I., Sosnowski Z.** A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* . 2000, pp. n. 7 (1) , p. 1-6.
129. **Lefkovits I., Su Z.-Z., Fisher P.B., Grunberger D.** Caffeic acid phenethyl ester profoundly modifies protein synthesis profile in type 5 adenovirus-transformed cloned rat embryo fibroblast cells. *International Journal of Oncology* . 1997, pp. n. 11 (1) , p. 59-67.
130. **P.L., Fidel Jr.** Vaginal candidiasis: review and role of local mucosal immunity. *AIDS Patient Care and STDs*. 1998, pp. vol. 12, n. 5, p. 359–366.
131. **Breger J., Fuchs B.B., Aperis G., Moy T.I., Ausubel F.M., Mylonakis E.** Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathogens* . 2007, pp. n. 3 (2) , p. 0168-0178.

132. **Berretta A.A., De Castro P.A., Cavaleiro A.H., Fortes V.S., Bom V.P., Nascimento A.P., Marquele-Oliveira F., Goldman G.H.** Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* . 2013 , p. art. no. 641480.
133. **Finger D., Machado C.S., Torres Y.R., Quináia S.P., Thomaz A.C.G., Gobbo A.R., Monteiro M.C., Eberlin M.N.** Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis. *Journal of Food Quality* . 2013, pp. n. 36 (5) , p. 291-301.
134. **De Castro S.L., Bom V.L.P., Brown N.A., Almeida R.S.C.D., Ramalho L.N.Z., Savoldi M., Goldman M.H.S., Goldman G.H.** Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*. 2013, pp. n. 60 , p. 74-86.
135. **D'Auria F.D., Tecca M., Scazzocchio F., Renzini V., Strippoli V.** Effect of Propolis on Virulence Factors of *Candida albicans*. *Journal of Chemotherapy* . 2003, pp. n. 15 (5) , pp. 454-460.
136. **Nizami D., Mustafa M., Gulbol D.G., Burcin O., Yusuf O.** Synergistic activities of two propolis with amphotericin B against some azole-resistant candida strains. Part II. *Proceedings of the 3rd International Conference on Advanced Materials and Systems*. 2010 , pp. ICAMS p. 217-222.
137. **Shokri H., Khosravi A.R., Yalfani R.** Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. . *Gynaecol Obstet*. 2011, pp. n. 114(2), p.158-159.
138. **Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu M.T.** Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* . 2001, pp. n. 44 (9-10) , p. 375-378.
139. **Mousavi M.S., Keshavarz T., Montaseri H., Pakshir K., Yazdani M., Zare N., Afrouzan H.** A comparative study on the therapeutic effect of the propolis vaginal cream and clotrimazole on candida vulvovaginitis in reproductive aged women. *Journal of Isfahan Medical School* . 2011, pp. n. 28 (117) , p. 863-871.
140. **Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D.** Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, pp. vol. 67, no. 7, pp. 2982–2992.
141. **Zomorodian K., Haghighi N.N., Rajae N. et al.** Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Medical Mycology*. 2011, pp. vol. 49, no. 2, pp. 208–211.
142. **Capistrano H.M., De Assis E.M., Leal R.M., Alvarez-Leite M.E., Brener S., Bastos E.M.A.F.** Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida* -associated denture stomatitis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* . 2013 , p. art. no. 947980.
143. **Buchta V., Černý J., Opletalová V.** In vitro antifungal activity of propolis samples of Czech and Slovak origin. *Central European Journal of Biology* . 2011, pp. n. 6 (2) , p. 160-166.
144. **Diba K., Mousavi B., Mahmoudi M., Hashemi J.** In-vitro anti fungal activity of Propolis alcoholic extract on *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. *Tehran University Medical Journal* . 2010, pp. n. 68 (2) , p. 80-86.
145. **M., Özcan.** Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by Pollen and Propolis Extracts. *Journal of Medicinal Food* . 2004, pp. n. 7 (1) , p. 114-116.
146. **Cafarchia C., De Laurentis N., Milillo M.A., Losacco V., Puccini V.** Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parassitologia*. 1999, pp. n. 41 (4) , p. 587-590.
147. **Silíci S., Koc A.N., Mistik S.** Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Annals of Microbiology*. 2007, pp. n. 57 (2) , p. 269-272.
148. **Gomes R.F., Teixeira K.I.R., Cortés M.E., Santos V.R.** Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. *Brazilian Journal of Oral Sciences* . 2007, pp. n. 6 (22) , p. 1387-1391.
149. **Oliveira A.C.P., Shinobu C.S., Longhini R., Franco S.L., Svidzinski T.I.E.** Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* . 2006, pp. n. 101 (5) , p. 493-497.

150. **Khosravi A.R., Shokri H., Nikaein D., Mansouri P., Erfanmanesh A., Chalangari R., Katalin M.** Yeasts as important agents of onychomycosis: In vitro activity of propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* . 2013, pp. n. 19 (1) , p. 57-62.
151. **Monzote L., Cuesta-Rubio O., Fernandez M.C., Hernandez I.M., Fraga J., Pérez K., Kerstens M., Maes L. , Cos P.** In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* . 2012, pp. n. 107 (8) , p. 978-984.
152. **Ayres D.C., Marcucci M.C., Giorgio S.** Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . 2007, p. vol.102 no.2.
153. **Santana L.C.L.R., Carneiro S.M.P., Caland-Neto L.B., Arcanjo D.D.R., Moita-Neto J.M., Citó A.M.G.L., Carvalho F.A.A.** Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Natural Product Research*. 2013.
154. **Machado G.M.D.C., Leon L.L., De Castro S.L.** Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* . 2007, pp. n. 102 (1) , p. 73-77.
155. **Pontin K., Da Silva Filho A.A., Santos F.F., Silva M.L.A.E., Cunha W.R., Nanayakkara N.P.D., Bastos J.K., De Albuquerque S.** In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitology Research* . 2008, pp. n. 103 (3) , p. 487-492.
156. **Da Silva F.B., Thomé G.D.S., Cataneo A.H.D., Miranda M.M., Felipe I., Andrade C.G.T.D.J., Watanabe M.A.E., Conchon-Costa I.** Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, p. art. no. 673058.
157. **Ayres D.C., Fedele T.A., Marcucci M.C., Giorgio S.** Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2011, pp. n. 53, p. 329–334.
158. **Ferreira F.M., Castro R.A.O., Batista M.A., Rossi F.M.O., Silveira-Lemos D., Frézard F., Moura S.A.L., Rezende S.A.** Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*. 2013, pp. p. 1-11 .
159. **Xu B.H., Shi M.Z.** An in vitro test of propolis against *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases* . 2006, pp. n. 24 (6) , p. 477-478.
160. **Fidalgo L.M., Ramos I.S., Parra M.G., Cuesta-Rubio O., Hernández I.M., Fernández M.C., Piccinelli A.L., Rastrelli L.** Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Natural Product Communications* . 2011, pp. n. 6 (7) , p. 973-976.
161. **Dantas A.P., Salomão K., Barbosa H.S., De Castro S.L.** The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006, pp. n. 101 (2) , p. 207-211.
162. **Higashi K.O., De Castro S.L.** Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology* . 1994, pp. n. 43 (2) , p. 149-155.
163. **De Castro S.L., Salomão K., De Souza E.M., Henriques-Pons A., Barbosa H.S.** Brazilian green propolis: Effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* . 2011 , p. art. no. 185918.
164. **Dantas A.P., Olivieri B.P., Gomes F.H.M., De Castro S.L.** Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology* . pp. n. 103 (2) , p. 187-193.
165. **Otoguro K., Iwatsuki M., Ishiyama A., Namatame M., Nishihara-Tsukashima A., Kiyohara H., Hashimoto T., Asakawa Y., Ōmura S., Yamada H.** In vitro antitrypanosomal activity of some phenolic compounds from propolis and lactones from Fijian Kawa (*Piper methysticum*). *Journal of Natural Medicines* . 2012, pp. n. 66 (3) , p. 558-561.

166. **Gresslera L.T., Da Silvaa A.S., Machadob G., Rosaa L.D., Dornelesa F., Gresslera L.T., Oliveirab M.S., Zanettea R.A., De Vargasb A.C.P., Monteiroa S.G.** Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. *Research in Veterinary Science* . 2012, pp. n. 93 (3) , p. 1314-1317.
167. **Falcão S.I., Vale N., Cos P., Gomes P., Freire C., Maes L., Vilas-Boas M.** In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. *Phytotherapy Research* . 2013.
168. **Syamsudin, Dewi, R.M., Kusmardi.** Immunomodulatory and in vivo antiplasmodial activities of propolis extracts. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* . 2009, pp. n. 4 (3) , p. 75-79.
169. **Busatti H.G.N.O., Santos J.F.G., Gomes M.A.** The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? *Biologics* . 2009, pp. n. 3, p. 273–287.
170. **David E.B., De Carvalho T.B., Oliveira C.M.B.D., Coradi S.T., Sforcin J.M., Guimares S.** Characterisation of protease activity in extracellular products secreted by *Giardia duodenalis* trophozoites treated with propolis. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. 2012, pp. n. 26 (4), p. 370-374 .
171. **Freitas S.F., Shinohara L., Sforcin J.M., Guimarães S.** in vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*. 2006, pp. n. 13 (3) , p. 170-175.
172. **Abdel-Fattah N.S., Nada O.H.** Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 2007, pp. n. 37(2), p.691-710.
173. **De Campos R.O.P., Paulino N., Da Silva C.H.M., Scremin A., Calixto J.B.** Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1998, pp. n. 50(10), p. 1187–1193.
174. **Dulcetti Jr. O., Andreucci V.C., Cunha I.B.D.S., Araujo C.E.P.c, De Oliveira F., Marcucci M.C.** Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of a sample of Brazilian propolis. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2004, pp. n. 23 (3), p. 285-291.
175. **Paulino N., Teixeira C., Martins R., Scremin A., Dirsch V.M., Vollmar A.M., Abreu S.R.L., De Castro S.L., Marcucci M.C.** Evaluation of the Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of a Brazilian Green Propolis. *Planta Med*. 2006, pp. n. 72(10), p. 899-906.
176. **Paulino N., Dantas A.P., Bankova V., Longhi D.T., Scremin A., De Castro S.L., Calixto J.B.** Bulgarian Propolis Induces Analgesic and Anti-inflammatory Effects in Mice and Inhibits In Vitro Contraction of Airway Smooth Muscle. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2003, pp. n. 93(3), p. 307-313.
177. **Paintz M., Metzner J.** On the local anaesthetic action of propolis and some of its constituents. *Pharmazie*. 1979 , pp. n. 34(12), p. 839-41.
178. **Ghisalberti E.L., Jefferies P.R., Lanteri R.** Potential Drugs from Propolis. *Mass Spectrometry in Drug Metabolism*. 1977, pp. n. de 1977, p 111-130.
179. **Daleprane J.B., Abdalla D.S.** Emerging roles of propolis: Antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, pp. vol. 2013, Article ID 175135, 8 pages.
180. **Búfalo M.C., Ferreira I., Costac G., Francisco V., Liberalb J., Cruzb M.T., Lopesb M.C., Batistac M.T., Sforcina J.M.** Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-κB and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013, pp. n.149 (1), p. 84–92.
181. **Rebiai A., Lanez T., Belfar M.L.** Total polyphenol contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of algerian propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014, pp. n. 6(1), p. 395-400.
182. **Russo A., Cardile V., Sanchez F., Troncoso N., Vanella A., Garbarino J.A.** Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*. 2004, pp. v.76(5), p. 545–558.
183. **Krol W., Scheller S., Czuba Z., Matsuno T., Zydowicz G., Shani J., Mos M.** Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J. Ethnopharmacol*. 1996, pp. n. 55 , p. 19.



184. Scheller S., Wilczok T., Imielski S., Krol W., Gabrys J., Shani J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *International Journal of Radiation Biology*. 1990, pp. n. 57(3), p. 461–465.
185. Frozza C.O., Garcia C.S., Gambato G. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, pp. n. 52, p. 137–142.
186. Simoes-Ambrosio L.M., Gregorio L.E., Sousa J.P., Figueiredo-Rinhel A.S., Azzolini A.E., Bastos J.K., Lucisano-Valim Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*. 2010, pp. n. 81, p. 1102.
187. Lopesa A.A., Ferreirab T.S., Nesib R.T., Lanzettia M., Piresa K.M., Silvaca A.M., Borgesc R.M., Silvaca A.J.R., Valençab S.S., Portoa L.C. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013, pp. n. 21 (24), p. 7570–7577.
188. Izuta H., Shimazawa M., Tsuruma K., Araki Y., Mishima S., Hara H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009, pp. vol. 9, article 45.
189. Naik D.G., Mujumdar A.M., Vaidya H.S. Anti-inflammatory activity of propolis from Maharashtra, India. *Journal of Apicultural Research*. 2013, pp. n.52 (2) p.35-43.
190. Naito Y., Yasumuro M., Kondou K., Ohara N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytoth Res.* . 2007, pp. n. 21, p.452–456.
191. Surh YJ., Chun KS., Cha HH., Han SS., Keum YS., Park KK., Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NK-kB activation. *Mutat. Res.* . 2001, pp. 480-481, 243-68.
192. Missima F. & Sforcin, J. M. Evid. Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. *Based Complement Alternat. Med*. 2008, pp. 5(1):71-5.
193. Moura S.A.L., Negri G., Salatino A., Lima L.D.C., Dourado L.P.A., Mendes J.B. Aqueous extract Brazilian propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2009, pp. n. 18, p. 1–9.
194. Machado J.L., Assunção A.K.M., Da Silva M.C.P., Dos Reis A.S., Costa G.C., Arruda D.S., Rocha B.A., Leite Vaz M.M.O.L., Paes A.M.A., Guerra R.N.M., Berretta A.A., Nascimento F.R.F. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, pp. Volume 2012, Article ID 157652, 10 pages.
195. Ivanovska N., Stefano Z., Valeva V., Neychev H. Immunomodulatory action of propolis: A comparative study on cinnamic and caffeic acid lysine derivates. *Biol. Immun*. 1993, pp. 46, 115-7.
196. Krol W., Scheller S., Czuba Z., Matsumo T., Zydowicz G., Shani J., Mos M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J. Ethnopharmacol*. 1996, pp. n. 55, p. 19-25.
197. Szliszka E., Mertas A., Czuba Z.P., Król W. Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, pp. Volume 2013, Article ID 735176, 11 pages.
198. Chan G.C.-F., Cheung K.-W., Sze D.M.-Y. The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2013, pp. n. 44(3), p. 262-273.
199. Missima F., Pagliarone A.C., Orsatti C.L., Araújo Jr. J.P., Sforcin J.M. The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytotherapy Research*. 2010, pp. n. 24(10), p. 1501–1507.

200. Orsi R.O., Funari S.R.C., Soares A.M.V.C., Calvi S.A., Oliveira S.L., Sforcin J.M., Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of venomous animals and toxins*. 2000, p. v.6 n.2.
201. Miyataka H., Nishiki M., Matsumoto H., Fijimoto T., Matsuka M., Satoh T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol. Pharm. Bull.* 1997, pp. n. 20, p. 496-501.
202. Possamai M.M., Honorio-França A.C., Reinaque A.P.B., França E.L., Souto P.C.D.S. Brazilian propolis: A natural product that improved the fungicidal activity by blood phagocytes. *BioMed Research International* . 2013 , p. art. no. 541018.
203. Sforcin JM., Kaneno R., Funari SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins*. 2002, pp. 8, 19-29.
204. Hayakari R., Matsumiya T., Xing F., Tayone J.C., Dempoya J., Tatsuta T., Aizawa-Yashiro T., Imaizumi T., Yoshida H., Satoh K. Effects of Brazilian green propolis on double-stranded RNA-mediated induction of interferon-inducible gene and inhibition of recruitment of polymorphonuclear cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, pp. n. 93(3), p. 646–651.
205. Orsatti C.L., Missima F., Pagliarone A.C., Bachiega T.F., Búfalo M.C., Araújo J.P.Jr, Sforcin J.M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*. 2010, pp. n. 24(8), p. 1141–1146.
206. Sá-Nunes A., Faccioli L.H., Sforcin J.M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- $\gamma$  production. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, pp. n. 87(1), p. 93–97.
207. Ansoerge S., Reinhold D., Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. . *Z Naturforsch* . 2003, pp. n. 58, p.580-589.
208. Fischer G., Conceição F.R., Leitea F.P.L., Dummera L.A., D'Avila Vargas G., De Oliveira S., Dellagostina O.A., Paulino N., Paulino A.S., Vidor T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*. 2006, pp. n. 25(7), p. 1250–1256.
209. Shimazawa M., Chikamatsu S., Morimoto N., Mishima S., Nagai H., Hara H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. . *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005, pp. n. 2, p. 201-207.
210. Ramos, A. F. N. & Miranda, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 2007, pp. 13(4):697-710.
211. Fischer G., Paulino N., Marcucci M.C., Siedler B.S., Munhoz L.S., Finger P.F., Vargas G.D., Hübner S.O., Vidor T., Roehe P.M. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . 2010, p. vol.105 no.7 .
212. Fischer G., Cleff M.B., Dummer L.A., Paulino N., Paulino A.S., de Oliveira Vilela C., Campos F.S., Storch T., D'Avila Vargas G., de Oliveira Hübner S., Vidor T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. . *Vet Immunol Immunopathol* . 2007, pp. n. 116, p. 79-84. .
213. Da Silva F.B., Barud H., De Araújo Júnior A.M., Saska S., Mestieri L.B., Campos J.A.D.B., De Freitas R.M., Ferreira N.U., Nascimento A.P., Miguel F.G. Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, pp. Volume 2013, Article ID 703024, 10 pages.
214. Berretta A.A., Nascimento A.P., Bueno C.P.P, De Oliveira M.M., Vaz L.L., Marchetti J.M. Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. *Int J Biol Sci* . 2012, pp. n. 8(4), p. 512–521.

215. **Yüce S., Cemal Gökçe E., Işkdemir A., Koç E.R., Cemil D.B., Gökçe A., Sargon M.F.** An experimental comparison of the effects of propolis, curcumin, and methylprednisolone on crush injuries of the sciatic nerve. *Annals of Plastic Surgery*. 5 Dec 2013.
216. **Uçan M., Koparal M., Ağaçayak S., Atilgan S., Gunay A., Ozgoz M., Yaman F.** Influence of caffeic acid phenethyl ester on bone healing in a rat model. *Journal of International Medical Research*. 2013, pp. n. 41(5), p.1648-1654.
217. **Valadares, Bruno Lassmar Bueno.** Antirecombinagenic activity of propolis against recombinagenic activity of doxorubicin in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.* 2002, p. v.25 n.3.
218. **Suzuki I., Hayashi I., Takaki T., Groveman D.S., Fujimiya Y.** Antitumor and Anticytopenic Effects of Aqueous Extracts of Propolis in Combination with Chemotherapeutic Agents. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2004, pp. n. 17 (5), p. 553-562.
219. **Barlak Y., Deger O., Çolak M., Karatayl S.C., Bozday A.M., Yücesan F.** Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science*. 2011, pp. n. 9, p. 74 .
220. **Li H., Kapur A., Yang J.X., Srivastava S., McLeod D.G., Paredes-Guzman J.F., Dausch A., Park Y.K., Rhim J.S.** Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol.* . 2007, pp. n. 31(3), p.601-6.
221. **Szliszka E., Zydowicz G., Janoszka B., Dobosz C., Kowalczyk-Ziomek G., Krol W.** Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced. *apoptosis Int J Oncol.* 2011, pp. n. 38, p. 941-953.
222. **Szliszka E., Zydowicz G., Mizgala E., Krol W.** Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*. 2012, pp. v.41, n.3, p.818-828.
223. **Díaz-Carballo D., Malak S., Bardenheuer W., Freistuehler M., Reusch P.H.** The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Nov. 2008, pp. v.16, Issue 22, p. 9635–9643.
224. **Banskota A.H., Nagaoka T., Sumioka L.Y., Tezuka Y., Awale S., Midorikawa K., Matsushige K., Kadota S.** Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002, pp. v.80, Issue 1, p. 67–73.
225. **Park M.H., Kang D.W., Jung Y., Choi K.-Y., Min D.S.** Caffeic acid phenethyl ester downregulates phospholipase D1 via direct binding and inhibition of NFκB transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, pp. n. 442(1–2), p. 1–7.
226. **Lee K.W., Kang N.J., Kim J.H., Lee K.M., Lee D.E., Hur H.J., Lee H.J.** Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes & Nutrition*. 2008, pp. v.2, Issue 4, p.319-322.
227. **Butnariu M.V., Giuchici C.V.** The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011, pp. n. 9, p.3.
228. **Bolfaa P., Vidrighinescu R., Petrutab A., Dezmireanc D., Stanc L., Vlased L., Damiane G., Catoia C., Filipb A., Clichicib S.** Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, pp. n. 62, p. 329–342.
229. **Kakino M., Izuta H., Tsuruma K., Araki Y., Shimazawa M., Ichihara K., Hara H.** Laxative effects and mechanism of action of Brazilian green propolis. *BioMed Central*. 2012, p. v.10 n.22.
230. **Mahmoud M.F., Sakr S.M.** Hepatoprotective effect of bee propolis in rat model of streptozotocin-induced diabetic hepatotoxicity: Light and electron microscopic study. *Life Science Journal*. 2013, pp. n. 10(4), Article 272, p. 2048-2054.
231. **Gardana C., Simonetti P.** Evaluation of allergens in propolis by ultra-performanced liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011, pp. n. 25, p. 1675-63.

232. **Cho E., Lee J.D., Cho S.H.** Systemic contact dermatitis from propolis ingestion. *Annals of Dermatology*. 2011, pp. n. 23(1), p. 85-88.
233. **Fida, M., Kellici, S., Hoxha, M., Qirko, E.** A case of allergic dermatitis after self-treatment with propolis: Case report. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. pp. n. 24(6), p. 263-282.
234. **Hsu C.Y., Chiang W.C., Weng T.I., Yuan A.** Laryngeal edema and anaphylactic shock after topical propolis use for acute pharyngitis. *Am J Emerg Med* 2004. pp. n. 22(5), p. 127-132.
235. **Gardana C., Barbieri A., Simonetti P., Guglielmetti S.** Biotransformation strategy to reduce allergens in propolis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, pp. n. 78(13), p.4654-4658.
236. **Suárez D., Zayas D., Guisado F.** Propolis: Patents and technology trends for health applications. *Journal of Business Chemistry* . 2005, p. n. 2(3).
237. **V., Tardieu.** *L'Etrange Silence des Abeilles*. s.l. : Belin, 2009.
238. *Evaluation of the anti-inflammatory activity of propolis extracts.* **Almeida, E.C.** 2002, Journal of venomous animals and toxins, p. vol. 8 no. 1.
239. *Effect of propolis extract on guinea pig long mast cell.* **Orsi R. O et Sforcin J. M., Funari S. R. C., Gomes J. C.** 2005, Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases, p. vol.11 no.1.
240. **Sehn, E., et al.** Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Acta Chim. Act.* 2009, pp. 635(1):115-2.
241. **Song, Y. S., Park, E. H. et Jung, K. J. & Jin, C.** Inhibition of angiogenesis by propolis. *Arch. Pharm. Res.* 2002, pp. 25(4):500-4.
242. **Tosi B., Donini A., Romagnoli C., Bruni A.** Antimicrobial activity of commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother. Res.* 1996, pp. 1014, 335-6.
243. **Sutta J., Hanko J., Janda J., Tkac J.** Experimental and clinical experiences in the treatment of wounds in domestic animals by local application of an alcoholic solution of propolis. *Bratislava: Folia Veterinaria*. 1974, pp. 18, 143-147.
244. **T., Ackermann.** Fast chromatography study of propolis crudes. . *Food Chemistry*. 1991, pp. 42, 135-8.
245. **Borrelli F., Maffia P., Pinto L., Ianaro A., Russo A., Capasso F., Ialenti A.** Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. . *Fitoterapia*. 2002, pp. 73, 53-63.
246. **Gupta R., Verma I., Sharma S., Ganguly NK.** Prevention of tissue injury in an ascending mouse model of chronic pyelonephritis—role of free radical scavengers. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, pp. 27, 225-34.
247. **Hu F., Hepburn HR., Li Y., CHEN M., Radloff SE., Daya S.** Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J. Ethnopharmacol.* 2005, pp. 100, 276-83. .
248. **Lee KW., Chun KS., Lee JS., Kang KS., Surh YJ., Lee HJ.** Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, pp. 1030, 501-7.
249. **Marcucci MC., Rodriguez J., Ferrerez F., Bankova V., Grotor., Popov S.** Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z. Naturforsch. Sect. C. Biosc.* 1998, pp. 53, 117-9.
250. **Nagaoka T., Banskota AH., Tezuka Y., Midorikawa K., Matsushige K., Kadota S.** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, pp. 26, 487-91.
251. **Park YK., Koo MH, Ikegari M., Contado JL.** Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Tecnol.* 1997, pp. 40, 97-106.

252. Scheller S., Gadza G., Krol W., Czuba Z., Zajusz A., Gabrys J., Shani J. The ability of ethanolic extract of propolis (EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch. Sect. C. Biosc.* 1989, pp. 44, 1040-52. .
253. Song YS., Park EH., Hur GM., Ryu YS., Lee YS., Lee JY., Kim YM., Jin C. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Lett.* 2002, pp. 175, 53-61. .
254. Sosa S., Baricevic D., Cinco M., Padovan D., Tubaro A., Della Loggia R. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1997, pp. 4, 168-71.
255. Christov R., Bankova V., Tsvetkova I., Kujumgiev A., Tejera AD. Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis. *Fitoterapia.* 1999, pp. 70, 89-92. .
256. Fernandes Jr. A., Sugizaki MF., Fogo ML., Funari SRC., Lopes CAM. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins.* 1995, pp. 1, 63-9.
257. Grange JM., Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* 1990, pp. 83, 159-60. .
258. Markham KE., Mitchel KA., Wilkins AL., Daldy JA., Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organics constituent in New Zealand propolis. *Phytochemistry.* 1996, pp. 42, 205-11. .
259. Nieva MMI., Isla MI., Cudmani NG., Vattuone MA., Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.* 1999, pp. 68, 97-102. .
260. Valcic S., Montenegro G., Mujica AM. Phytochemical, morphological and biological investigations of propolis from central Chile. *Z. Naturforsch.* 1999, pp. 54, 406-16. .
261. Speciale A., Costanzo R., Puglisi S., Musumeci R., Catania M.R., Caccamo F., Iauk L. Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. *J. Chemother.* . 2006, pp. p. 18, n. 164–171.
262. Vaz Coelho L.G., Ferreira Bastos E.M.A., Resende C.C., Paula E Silva C.M., Fernandes Sanches B.S., De Castro F.J., Moretzsohn L.D., Trindade O.R. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. A pilot clinical study. *Helicobacter* . 2007, pp. n. 12 (5) , p. 572-574.
263. Kedzia B., Iwazskiewicz J., Geppert B. Pharmacological investigations on ethanolic extract of propolis. *Herba Pol.* 1988, pp. n. 34, p. 243-53.
264. Bhardwaj A., Velmurugan N., Sumitha, Ballal S. Efficacy of passive ultrasonic irrigation with natural irrigants (Morinda citrifolia juice, aloe vera and propolis) in comparison with 1% sodium hypochlorite for removal of *E. faecalis* biofilm: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research* . 2013, pp. n. 24 (1) , p. 35-41.
265. Bolla N., Kavuri S.R., Tanniru H.I., Vemuri S., Shenoy A. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of odontopaste, chlorhexidine and propolis as root canal medicaments against enterococcus faecalis and candida albicans. *Journal of International Dental and Medical Research* . 2012, pp. n. 5 (1) , p. 14-25.
266. Díaz-Carballo D., Ueberla K., Kleff V., Ergun S., Malak S., Freistuehler M., Somogyi S., Strumberg D. Antiretroviral activity of two polyisoprenylated acylphloroglucinols, 7-epi-nemorosone and plukenetione A, isolated from Caribbean propolis. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 2010, pp. n. 48 (10) , p. 670-677.
267. Su Z.-Z., Grunberger D., Fisher P.B. Suppression of adenovirus type 5 E1A-mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Molecular Carcinogenesis* . 1991, pp. n. 4 (3) , p. 231-242.
268. Liu A.L., Wang H.D., Lee S.M. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg. Med Chem.* 2008, pp. n. 16, p. 7141-7.
269. Goh A.-R., Choi K.S., Choi S.K. Translation inhibition activity and antifungal activity of Korean propolis. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* . 2010, pp. n. 38 (1) , p. 64-69.

270. **Dias S.M.D., Gomes R.T., Santiago W.K., Paula A.M.B., Cortés M.E., Santos V.R.** Antifungal activity of commercial ethanolic and aqueous extracts of Brazilian propolis against *Candida* spp. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada* . 2007, pp. n. 28 (3) , p. 259-263.
271. **Prytyk E., Dantas A.P., Salomão K., Pereira A.S., Bankova V.S., De Castro S.L., Neto F.R.A.** Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology* . 2003, pp. n. 88 (2-3) , p. 189-193.
272. **Kamburoğlu K., Özen T.** Analgesic effect of Anatolian propolis in mice. *Agri*. 2011.
273. **Yonar M.E., Yonar S.M., Çoban M.Z., Eroğlu M.** Antioxidant effect of propolis against exposure to chromium in *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*. 2014, pp. n. 29(2), p. 155–164.
274. **Lisbona C., Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., Guisado I.M., Guisado R., López-Aliaga I.** Positive influence of a natural product as propolis on antioxidant status and lipid peroxidation in senescent rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2013, pp. n. 69(4), p. 919-925.
275. **Žižić J.B., Vuković N.L., Jadranin M.B., Anđelković B.D., Tešević V.V., Kacaniova M.M., Sukdolak S.B., Marković S.D.** Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, pp. n. 93(12), p. 3001–3009.
276. **Choi S.J., Shimomura K., Kumazawa S., Ahn M.-R.** Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Propolis from Diverse Geographic Regions in Korea. *Food Science and Technology Research*. 2013, pp. n.19 (2) p. 211-222.
277. **Okamoto Y., Hara T., Ebato T., Fukui T., Masuzawa T.** Brazilian propolis ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation. *International Immunopharmacology*. 2013, pp. n. 16(2), p. 178–183.
278. **Búfalo M.C., Ferreira I., Costac G., Francisco V., Liberalb J., Cruzb M.T., Lopesb M.C., Batistac M.T., Sforcina J.M.** Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-κB and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013, pp. n.149 (1), p. 84–92.
279. **Sforcin J.M., Fernandes Jr. A., Lopes C.A.M., Funari S.R.C., Bankova V.** Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of venomous Animals and Toxins*. 2001, p. v.7 n.1.

# Annexes

## Annexe 1 : composés chimiques identifiés dans l'huile essentielle de propolis.

- **Monoterpènes**
  - 6,6-Dimethyl-2-methylenebicyclo[3,1,1]heptane
  - Limonene
- **Monoterpènes oxygénés**
  - $\alpha$ -Campholenal
  - trans-Pinocarveol
  - cis-Verbenol
  - Camphre
  - $\alpha$ -Phellandrène-8-ol
  - 4-Terpinéol
  - p-Menth-1-en-8-ol
  - cis-Carveol
  - cis-p-Menth-2,8-dienol
  - $\alpha$ -Campholénal
  - trans-Pinocarvéol
  - cis-Verbénol
  - Bornéol
  - 4-Terpinéol
  - p-Menth-1-en-8-ol
- **Sesquiterpènes**
  - (+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene
  - Epizonarène
  - $\alpha$ -Himachalène
  - $\delta$ -Cadinène
  - Epi-bicyclosesquiphellandrène
  - Acoradiène
  - Germacrène D
  - Thujopsène
- **Sesquiterpènes oxygénés**
  - Oxyde de  $\alpha$ -Cedrène
  - Cédrol
  - 3-Isopropyl-6-methyl-2-oxo-1-(3-oxobutyl)-cyclohexancarbaldehyde
  - $\alpha$ -Cadinol
  - Epicédrol
  - 3-Isopropyl-6-methyl-2-oxo-1-(3-oxobutyl)-cyclohexancarbaldehyde
  - 2-Methyl-1-[3-methyl-6-(1-methylethylidene)-3-cyclohexen-1-yl]-3-buten-2-ol
  - 7-Acetyl-2-hydroxy-2-methyl-5-isopropylbicyclo[4,3,0]nonane
  - $\alpha$ -Cadinol
- **Aromatiques**
  - o-cymène
  - Calaménène

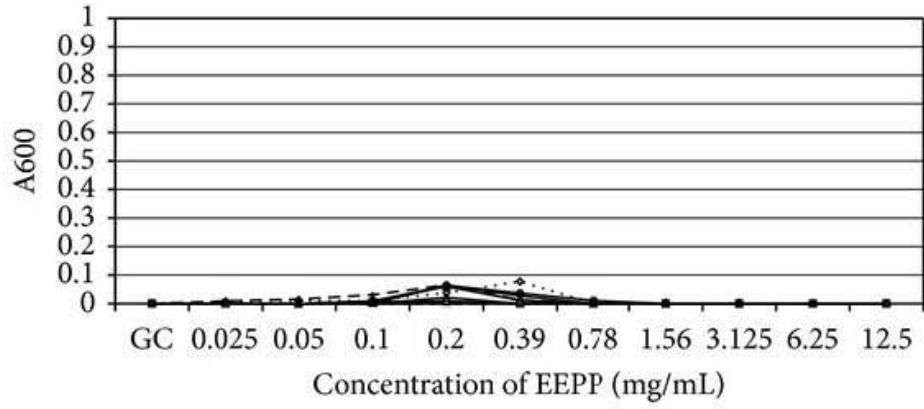
- **Aromatiques oxygénés**  
3-Thujen-2-one  
p-Cymène-8-ol  
Verbénone  
Acétate de  $\alpha$ - Terpinéol  
p-Cymène-8-ol  
Thymol  
p-Thymol  
Dibutyl phthalate
- **Aliphatiques**  
4a-Méthyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalène  
Cadala-1(10),3,8-triène  
1-Nonadécène  
1-Eicosène  
1-Docosène  
Heptacosane  
Hexadécane  
3-Méthyl-5-propylnonane
- **Aliphatiques oxygénés**  
4-(2-Acetyl-5,5-diméthylcyclopent-2-enylidène)butane-2-one  
3,7,11-Triméthyl-3-hydroxy-6,10-dodécadien-1-yl acétate  
5,6,7,8-Tétraméthylbicyclo[4,1,0]hept-4-en-3-one  
(6E,6E)-3,7,11,15-Tétraméthyl-1,6,10,14-hexadecatetraen-3-ol  
Pimar-15-en-8-yl acétate
- **Autres**  
2-Nonen-1-ol  
Diazoprogéstérone  
Ferruginol  
Calaménène

**Annexe 2 : Croissance de différentes souches de *S. epidermidis* en présence de concentrations croissantes d'extrait hydro-alcoolique de propolis : (77)**

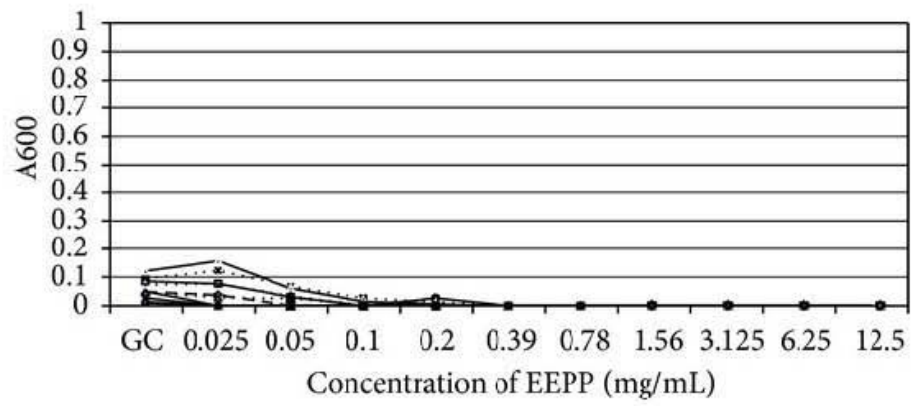
- a : après deux heures d'incubation
- b : après six heures d'incubation
- c : après douze heures d'incubation
- d : après vingt-quatre heures d'incubation

—●—	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1	..▲..	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 7
—○—	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2	...*	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 8
—△—	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 3	..◇..	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 9
—◇—	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 4	-+-	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10
..*..	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5	—■—	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35983
—▲—	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 6		

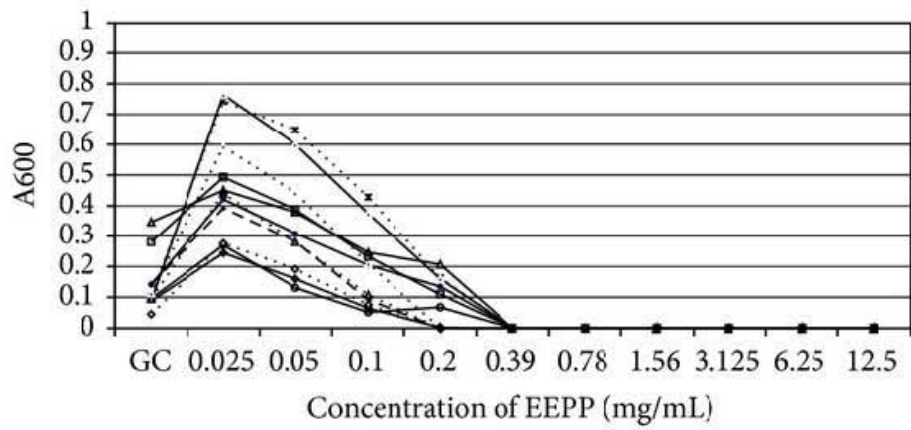




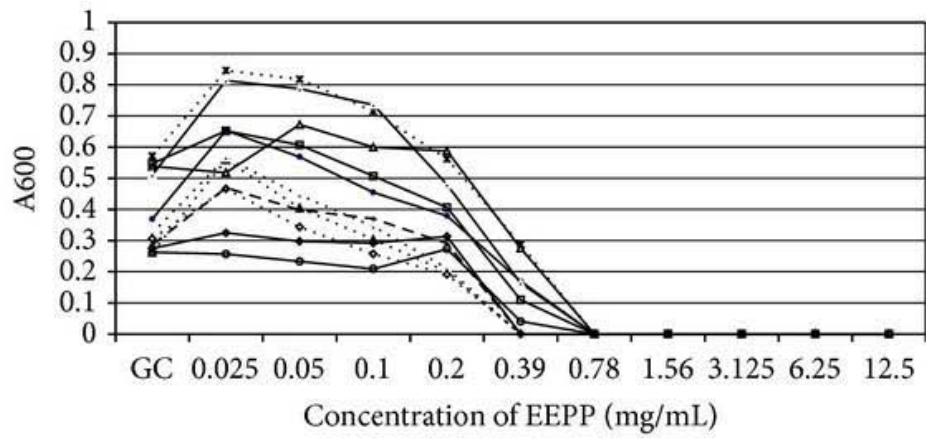
(a)



(b)



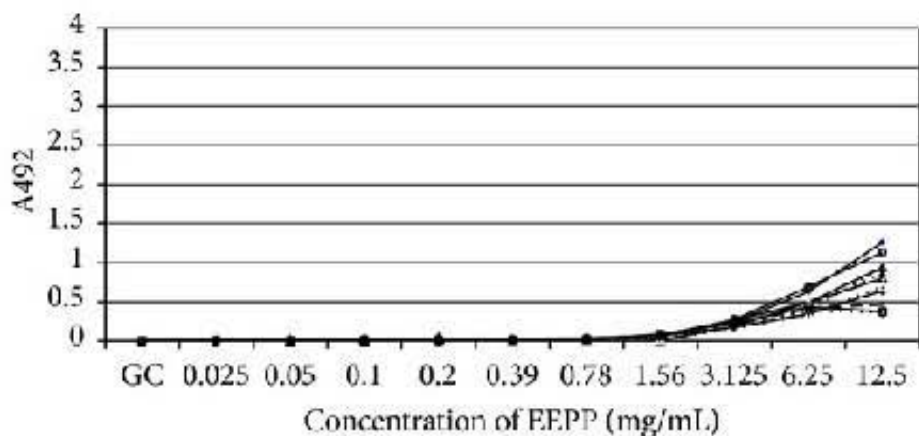
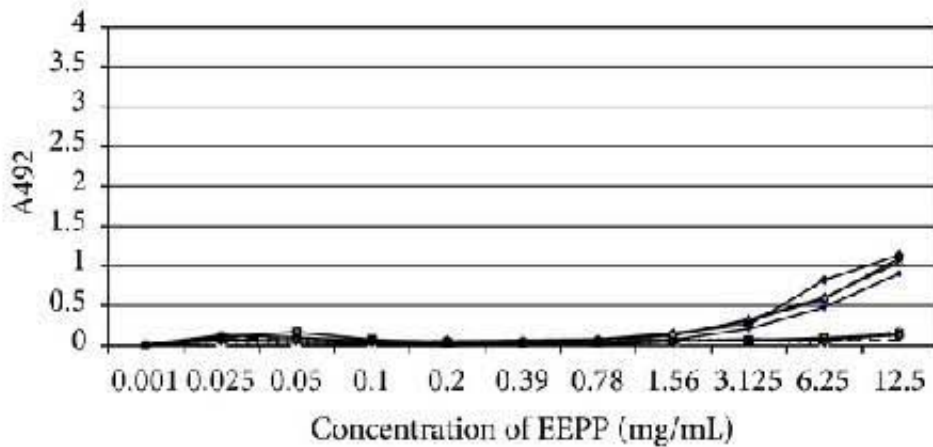
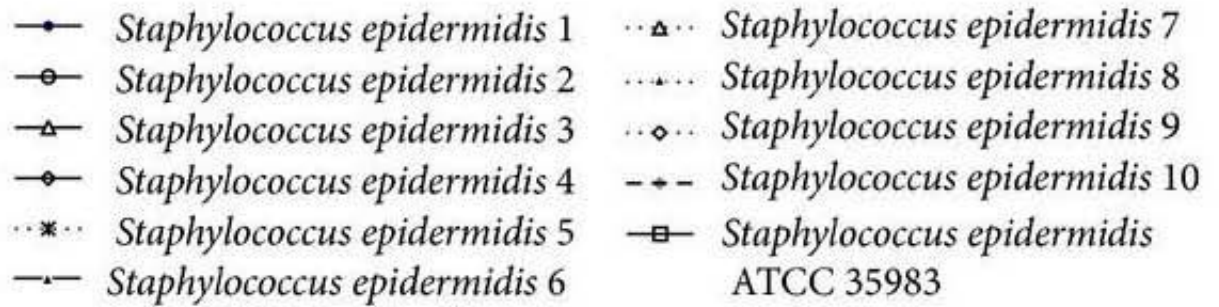
(c)

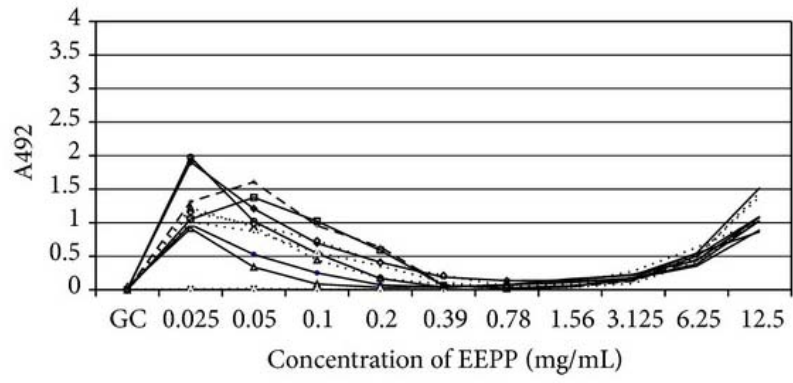


( d )

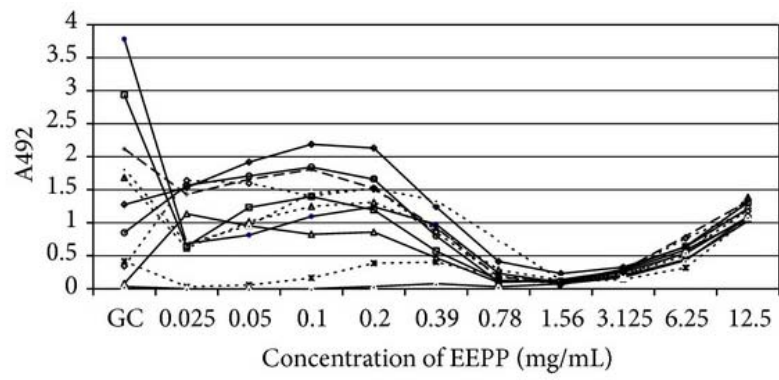
Annexe 3 : Capacité de formation de biofilms de différentes souches de *S. epidermitis* en présence de concentrations croissantes d'extrait hydro-alcoolique de propolis : (77)

- a : après deux heures d'incubation
- b : après six heures d'incubation
- c : après douze heures d'incubation
- d : après vingt-quatre heures d'incubation





( c )



( d )

# Table des illustrations

Figure 1: schéma de la tête de l'abeille (7).....	21
Figure 2: appareil buccal (7) .....	22
Figure 3: Deux ouvrières pratiquant la trophallaxie (Photographie Potier Florence).....	22
Figure 4: patte postérieure avec brosse sur la face intérieure (7).....	23
Figure 5: patte postérieure, corbeille vide (7).....	23
Figure 6: patte antérieure montrant un "peigne à antennes" (7) .....	23
Figure 7: schéma d'une aile d'abeille (7) .....	24
Figure 8: le système digestif (7).....	24
Figure 9: glande à venin (7) .....	25
Figure 10: Des alvéoles à miel (Photographie Potier Florence) .....	26
Figure 11: Des alvéoles à pollen (Photographie Potier Florence).....	26
Figure 12: Une cellule de faux-bourdon (à gauche), disposée à côté d'une alvéole d'ouvrière (Photographie Potier Florence) .....	26
Figure 13: Organisation d'un cadre de ruche, avec le couvain au centre et les alvéoles à miel en périphérie. (Photographie Potier Florence).....	27
Figure 14: La reine. (Photographie Potier Florence).....	28
Figure 15: Un faux-bourdon, facilement reconnaissable à ses yeux fort développés. (Photographie Potier Florence).....	29
Figure 16: L'abeille ouvrière (Photographie Potier Florence).....	30
Figure 17: Ecllosion d'une ouvrière hors de sa cellule. (Photographie Potier Florence) .....	30
Figure 18: Un couple de Xylocopes (Photographie Potier Josette) .....	36
Figure 19: Profil en fonction du temps de l'analyse de la population (A) et de la courbe de survie (%Cfu/mL) (B) de <i>Salmonella enteritidis</i> selon la période d'incubation, en présence d'extrait de propolis à 10.0% ( v/v) ou d'Ethanol à 70% (12.6% v/v). (95).....	68
Figure 20: Profil d'analyse de la population (A) et de la courbe de survie (B) (%Cfu/mL) de <i>Salmonella Typhimurium</i> selon la période d'incubation dans une solution éthanolique de propolis (10% v/v) et dans l'éthanol (12,6% v/v) (95).....	70
Figure 21: Courbe traduisant l'effet bactéricide de la propolis envers <i>E. coli</i> à différentes concentrations (% v/v) au cours du temps. Pourcentage de CFU/mL par rapport à l'inoculum initial. (102).....	72
Figure 22: Charge fongique d'un lavage des muqueuses vaginales après 7 et 10 jours de traitement avec CP1%, PP1% et une crème de clotrimazole après infection par <i>C. albicans</i> 3153A (20µg, cellule/mL) (132) .....	84
Figure 23: Distribution des espèces fongiques isolées d'onchomycoses selon MM. Oliveira <i>et al.</i> (149).....	87
Figure 24: Photographie obtenue par microscopie électronique d'un promastigote de <i>Leishmania</i> traité par un extrait de propolis. (154) .....	89
Figure 25: Cinétique de la prolifération des promastigotes de <i>Leishmania</i> après traitement à la propolis (5, 10, 25 et 100µg/mL) ou IA glucantime pendant 24, 96 et 168h (154) .....	90
Figure 26: Pourcentage de lyse des amastigotes de <i>T. cruzi</i> selon la concentration en extrait éthanolique de propolis administré sur 24h. (161) .....	92
Figure 27: Pourcentage d'infection des cellules par <i>T. cruzi</i> selon le temps de traitement (heures) et la concentration en extrait éthanolique de propolis. (161).....	93
Figure 28: Effet antiradicalaire d'extrait éthanolique de propolis chilienne selon sa concentration. Essai réalisé via le test DPPH avec le Trolox comme molécule de référence. (182) .....	99
Figure 29: Structure chimique de l'artépilline C (197).....	103
Figure 30: Titre d'anticorps (log2) de souris auxquelles est inoculé un vaccin inactivé d'HSV-1 porcin co-administré avec 1mg de fraction phénolique de propolis verte brésilienne (JFR), 10mg de cette même fraction, de l'hydroxyde d'aluminium (Al(OH) <sub>3</sub> ), 1mg de fraction phénolique de propolis associée à l'hydroxyde d'aluminium et 10mg de fraction phénolique de propolis associée à l'hydroxyde d'aluminium. (211) .....	107
Figure 31: Effet anti-tumoral de la propolis cubaine <i>in vivo</i> . Inoculation à des souris auxquelles ont été inoculées des cellules tumorales d'Ehrlich (223). .....	112
Figure 32: Structure des composés testés pour leur activité antiproliférative (224) .....	113
Figure 33: Plukénétione A (223) .....	113
Figure 34: Mucronatol et némosone. (223) .....	118
Figure 35: Répartition de la déposition de brevets concernant la propolis selon les pays. (236) .....	121
Figure 36: nombre de brevets déposés sur des produits utilisant la propolis, valeur absolue. (236) .....	122
Figure 37: brevets déposés par année selon le domaine d'utilisation de la propolis. (236).....	122



N° d'identification :

**TITRE**

**LA PROPOLIS, PROPRIETES ET INTERET THERAPEUTIQUE**

**Thèse soutenue le 03/06/2014**

**Par POTIER FLORENCE**

**RESUME :**

L'apithérapie, une branche de l'arsenal thérapeutique, consiste à utiliser des produits de la ruche pour soigner certaines pathologies. Voici un recensement de son origine et de ses propriétés physico-chimiques ainsi que thérapeutiques. Cette étude se donne pour but de rassembler toutes les données de la littérature scientifique en l'état actuel.

**MOTS CLES :** Propolis, abeille, Apis mellifera, apithérapie

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<b><u>GIBAUD Stephane</u></b>		Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle