

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université Frères Mentouri-Constantine 1**  
**Faculté des Sciences Exactes**  
Département de Chimie

N° D'ordre : 19/D3C/2020

Série : 04/CH/2020

**Thèse**

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)**

**Spécialité : Chimie pharmaceutique**

**Option : Analyse physicochimique, contrôle de la qualité et synthèse de substances  
bioactives**

**Par**

**M<sup>me</sup> BOUAROURA Amina Ep Redjem**

**Etude comparative du profil chimique et de l'activité  
antioxydante de plusieurs propolis de l'Est algérien  
et investigation phytochimique de la propolis la plus  
active**

Devant le jury

<b>Akkal Salah</b>	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1	Président
<b>Segueni Narimane</b>	MCA. Université, Boubnider Salah, Constantine 3	Directrice de thèse
<b>Zellagui Amar</b>	Pr. Université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi	Examineur
<b>Benkiniouar Rachid</b>	MCA. Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examineur
<b>Bicha Sabrina</b>	MCA. Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examineur

**25/06/2020**

## **Remerciements**

*Pour commencer, parce qu'il existe toujours un début à tout, Je tiens à remercier Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail. Je tiens tout particulièrement à remercier **MCA.Segueni Narimane** ma directrice de thèse pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, d'avoir cru en moi, d'avoir veillé sur moi tel un ange gardien et de m'avoir conduite jusqu'à cette thèse. Un grand merci aussi pour sa patience, ses explications surtout dans le domaine de la biologie et pour sa gentillesse, ses précieux conseils, ses critiques constructives, ses encouragements et sa disponibilité.*

*J'adresse chaleureusement mes remerciements à Monsieur le Professeur **Rhouati Salah** de l'université des Frères Mentouri Constantine 1 pour m'avoir accueilli au sein de laboratoire des produits naturels d'origine végétale et de synthèse et surtout pour la confiance qu'il m'a accordé dans la réalisation de ce travail, sa gentillesse sa disponibilité, ses conseils éclairés.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le professeur **Sallah Akkal**, de l'Université des Frères Mentouri, Constantine 1, pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le jury de thèse.*

*Je tiens aussi à remercier Monsieur **Benkiniouar Rachid** et Madame **Bicha Sabrina** Maître de Conférence à l'Université des Frères Mentouri, Constantine 1 qui m'honorent en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.*

*Je remercie aussi Monsieur le Professeur **Zellagui Amar** à l'Université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.*

*J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de chimie de l'université de la laguna sous la direction de monsieur le professeur Jesús G. Díaz. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes et fructueuses entretenues durant ma présence dans son laboratoire, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements s'adressent également à monsieur **Ouchnane Noureddine** pour sa patience sa gentillesse, ses explications sur mes très nombreux dépannages informatiques.*

*Je n'oublie pas de remercier l'équipe du laboratoire des produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique.*

*Mes remerciements vont enfin à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Dédicace :

### *Je dédie ce modeste travail*

*A l'âme de mon cher père (Khalil) aujourd'hui je me recueille sur sa tombe et lui dit avec fierté aussi : «Repose en Paix et que dieu te garde dans son vaste paradis ».*

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*A mon mari( Hamza), Pour ton amour et ton soutien, Pour ta patience durant les moments durs Pour avoir donné de ton temps et m'avoir laissé le temps de faire ...*

*Sans ta présence à mes côtés, je n'en serais pas là aujourd'hui.*

*A mes anges Yara Batoul, Alae Erraahmane, Faha Amir Qui m'ont toujours donné le sourire dans les moments difficiles, qui ont toujours su raviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais.*

*A mes chers frères et sœurs ainsi que leurs petites familles pour leur aide et leur soutien moral, je cite en particulier Samia pour sa disponibilité.*

*A mes belles sœurs et mon beau-frère ainsi que leurs petites familles et surtout ma belle-mère (Bariza) pour leur aide et leur soutien morale*

*A mes amis et collègues*

*A tout ma famille de proche au loin.*

*Amina*

## Liste des abréviations

CN : Propolis de Constantine

BN : Propolis de Boumerdès

CHN : Propolis de Chelghoum El Aid située dans la wilaya de Mila

TN : Propolis de Tébassa

GN : Propolis de Guelma

CN3 : Extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine

BN2 : Extrait chloroformique de la propolis de Boumerdès

BN3 : Extrait acétate d'éthyle de la propolis de Boumerdès

BN4 : Extrait méthanolique de la propolis de Boumerdès

CHN2 : Extrait chloroformique de la propolis de Chelghoum laide

CHN3 : Extrait acétate d'éthyle de la propolis de Chelghoum laide

CHN4 : Extrait méthanolique de la propolis de Chelghoum laide

EP : Ether de pétrole

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Dichlorométhane

AcOet : Acétate d'éthyle

MeOH : Méthanol

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à spectrométrie de masse

DPPH : 2,2 diphényl-1-picryl-hydrazyl

ABTS : 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

CUPRAC: Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity

BHT: Hydroxytoluène butylé.

BHA: Hydroxyanisole butylé

AChE : Acétylcholinestérase

BChE : Butyrylcholinestérase

TPC : Total Polyphenols Content

TFC : Total Flavonoids Content

EAG : Equivalent Acide Gallique

EQ : Equivalent Quercétine

EAC : Equivalent Acide Caféique

TpTz-Fe<sup>3+</sup>: Ferric tripyridyliazine

ND : Non déterminer

IC<sub>50</sub> : Concentration des extraits nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres

A<sub>0.5</sub> : Concentration indiquant 0,5 d'absorbance

Abs: Absorbance

Al(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (H<sub>2</sub>O)<sub>9</sub>: Nitrate d'aluminium

CH<sub>3</sub>COOK : Acétate de potassium

NC : Néocuproéne

NH<sub>4</sub>Ac : Acétate d'ammonium

TCA : Acide trichloracétique

DTNB : 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)

UV: Ultraviolet

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

RMN<sup>1</sup>H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.

RMN<sup>13</sup>C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone.

RMN<sup>1</sup>D : Résonance Magnétique Nucléaire monodimensionnelle

RMN <sup>2</sup>D : Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle

COSY: Correlated Spectroscopy.

HMQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation.

HMBC: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

EI-MS: Electron Ionization Mass Spectrometer

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

*J*(Hz) : Constante de couplage exprimée en Hertz

R<sub>f</sub> : Facteur de retardation.

*m/z* : Masse / charge électrique

t : triplet

d : doublet

dd : doublet de doublet

m : multiplet

s : singulet

δ ppm : déplacement chimique en partie par million

## Liste des figures

Figure 1 : Propolis brute.....	4
Figure 2 : Grille à propolis .....	5
Figure 3 : momie de cadavre de souris.....	5
Figure 4 : Mâchoire avec une cavité dentaire remplie en cire et propolis.....	6
Figure 5 : Récolte de propolis par l'abeille .....	7
Figure 6 : Raclage de propolis sur les flancs de la ruche. ....	8
Figure 7 : Grille en plastique et en toile .....	9
Figure 8 : Composition de la propolis .....	11
Figure 9 : <i>Populus nigra</i> .....	12
Figure 10 : <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	13
Figure 11 : <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> . ....	13
Figure 12 : <i>Clusia rosea</i> (Clusiaceae).....	14
Figure 13 : Cupressaceae.....	14
Figure 14 : <i>Macaranga tanarius</i> .....	15
Figure 15 : Structure chimique commune des flavonoïdes .....	21
Figure 16 : Matière première .....	44
Figure 17 : Structure du DPPH et sa forme réduite .....	47
Figure 18 : Structure de l'ABTS .....	48
Figure 19 : La réduction du complexe $Cu^{+2}$ -Nc .....	50
Figure 20 : Appareil LC-MS.....	52
Figure 21 : Protocole d'extraction de la propolis .....	54
Figure 22 : Récapitulatif des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle. ....	58
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine .....	62
Figure 24 : Dosage des flavonoïdes et des polyphénols .....	64
Figure 25 : Courbes d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations .....	66
Figure 26 : Courbes d'inhibition du radical ABTS par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations .....	69
Figure 27 : Courbes d'absorbance du test du blanchissement du $\beta$ -carotène des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations .....	71
Figure 28 : Courbes d'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test CUPRAC.....	73
Figure 29 : Courbes d'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test FRAP.....	75
Figure 30 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine .....	80
Figure 31 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de la propolis de Chelghoum laid .....	80
Figure 32 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Chelghoum laid .....	81
Figure 33 : Chromatogramme de l'extrait chloroformique de la propolis de Chelghoum laid.....	81
Figure 34 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de la propolis de l'extrait de Boumerdès .....	82
Figure 35 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Boumerdès .....	83
Figure 36 : Chromatogramme de l'extrait chloroformique de la propolis de Boumerdès .....	83
Figure 37 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA1.....	86
Figure 38 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA1.....	87
Figure 39 : Spectre RMN- $^1H$ (600 MHz, acetone, $\delta$ ppm) du composé PCA1.....	88
Figure 40 : Spectre RMN- $^1H$ (600 MHz, acetone, $\delta$ ppm) du composé PCA1 (étalement) .....	89

Figure 41 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA1.....	90
Figure 42 : 7-méthoxy-5-hydroxy flavone (tectochrysrine) .....	91
Figure 43 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA2.....	92
Figure 44 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA2.....	93
Figure 45 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA2.....	94
Figure 46 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA2 (étalement) .....	95
Figure 47 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA2.....	96
Figure 48 : 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine). .....	97
Figure 49 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA3.....	98
Figure 50 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA3.....	100
Figure 51 : Spectre COSY du composé PCA3 : .....	101
Figure 52 : Spectre HSQC du composé PCA3 .....	102
Figure 53 : Spectre HMBC du composé PCA3 .....	103
Figure 54 : Pinobanksin-3-acétate .....	103
Figure 55 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA4.....	105
Figure 56 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA4.....	106
Figure 57 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA4.....	107
Figure 58 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA4 (étalement) .....	108
Figure 59 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA4.....	109
Figure 60 : 3, 5,7 trihydroxyflavone (Galangine) .....	110
Figure 61 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA5.....	111
Figure 62 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA5.....	112
Figure 63 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA5.....	113
Figure 64 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA5.....	115
Figure 65 : 5,7-dihydroxyflavone (Chrysrine) .....	115
Figure 66 : Analyse élémentaire du composé PCA6 .....	116
Figure 67 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA6.....	117
Figure 68 Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA6.....	118
Figure 69: Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA6.....	119
Figure 70 : Spectre HSQC du composé PCA6 .....	120
Figure 71 : Spectre HMBC du composé PCA6 .....	121
Figure 72: Acide cupressique.....	121
Figure 73 Spectre UV du composé PCA7 et PCA8 .....	122
Figure 74: Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA7 et PCA8.....	123
Figure 75 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA7 et PCA8 .....	126
Figure 76 : Spectre HSQC du composé PCA7 et PCA8.....	126
Figure 77: Spectre h HMBC du composé PCA7 et PCA8 .....	127
Figure 78 : 3-méthyl-3-butényl (E)-Cafféate et 2- méthyl-2-butényl (E)-Cafféate .....	127

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de types de propolis avec leur origine botanique .....	15
Tableau 2 : Les flavonoïdes identifiés dans la propolis .....	22
Tableau 3 : Les terpènes identifiés dans la propolis .....	24
Tableau 4 : Les acides phénolique identifiés dans la propolis .....	26
Tableau 5 : Différents échantillons de propolis.....	44
Tableau 6 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle. ....	55
Tableau 7 : Regroupement des fractions de la phase acétate d'éthyle. ....	55
Tableau 8 : Regroupement des sous fractions du f6, f7. ....	56
Tableau 9-Regroupement des sous fractions du f9 et f10. ....	57
Tableau 10 : Teneur en flavonoïdes et en polyphénols .....	63
Tableau 11 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test DPPH.....	67
Tableau 12 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test ABTS .....	70
Tableau 13 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test $\beta$ -carotène.....	72
Tableau 14 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test CUPRAC .....	74
Tableau 15 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test FRAP .....	76
Tableau 16 : Valeurs d'IC50 de l'activité anticholinestérase des extraits de la propolis de Constantine .....	77
Tableau 17 : Analyse LC-MS des extraits de propolis.....	78
Tableau 18 : Données de la série spectrale UV du composé PCA1.....	85
Tableau 19 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA1.....	87
Tableau 20 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PCA1. ....	88
Tableau 21 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA1. ....	90
Tableau 22 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA2.....	92
Tableau 23 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PCA2. ....	94
Tableau 24 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA2. ....	95
Tableau 25 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PCA3. ....	98
Tableau 26 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA3. ....	99
Tableau 27 : Données de la série spectrale UV du composé PCA4.....	104
Tableau 28 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA4.....	106
Tableau 29 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PCA4 .....	107
Tableau 30 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA4. ....	108
Tableau 31 : Données de la série spectrale UV du composé PCA5.....	111
Tableau 32 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA5.....	112
Tableau 33 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PCA5 .....	113
Tableau 34 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA5. ....	114
Tableau 35 : RMN 1H, RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA6 .....	119
Tableau 36 : RMN 1H, RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA7 et PCA8.....	123
Tableau 37 : RMN 1H, RMN- <sup>13</sup> C du composé PCA7 et PCA8 (substitution R) .....	125



## Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I- La propolis.....</b>	<b>.....</b>
<b>I-1 GENERALITE.....</b>	<b>4</b>
I-1-1-DEFINITION ET UTILISATION .....	4
I-1-2-HISTORIQUE .....	5
I-1-3-RECOLTE.....	7
<i>I-1-3-1-Par les abeilles.....</i>	<i>7</i>
<i>I-1-3-2-Par l'homme au niveau de la ruche.....</i>	<i>8</i>
I-1-4-CONSERVATION.....	9
I-1-5-PROVENANCE.....	9
<i>I-1-5-1-Origine interne.....</i>	<i>9</i>
<i>I-1-5-2- Origine externe.....</i>	<i>10</i>
I-1-6-ASPECT MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE .....	10
<i>I-1-6-1-Propriétés physiques.....</i>	<i>10</i>
<i>I-1-6-2-Propriétés microscopiques.....</i>	<i>10</i>
I-1-7- CONSTITUANT GLOBALE .....	11
<b>I-2-PROPOLIS ET SOURCE VEGETALE.....</b>	<b>11</b>
I-2-1-PROPOLIS DES ZONES TEMPEREES .....	12
I-2-2-PROPOLIS DES ZONES TROPICALES .....	12
I-2-3-PROPOLIS DES ZONES MEDITERRANEENNES .....	14
I-2-4-PROPOLIS DES ZONES PACIFIQUES.....	14
<b>I-3-COMPOSITION CHIMIQUE.....</b>	<b>16</b>
I-3-1-ZONES TEMPEREES .....	16
I-3-2-ZONES TROPICALES .....	17
I-3-3- ZONES MEDITERRANEENNE.....	18
I-3-4-ZONES PACIFIQUE .....	19
I-3-5-PROPOLIS ALGERIENNE .....	19
I-3-6-COMPOSES CHIMIQUES ISOLES DE LA PROPOLIS .....	20
<i>I-3-6-1- Flavonoïdes.....</i>	<i>20</i>
<i>I-3-6-2- Terpénoides.....</i>	<i>24</i>
<i>I-3-6-3- Acides phénoliques.....</i>	<i>26</i>
<b>I-4- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES.....</b>	<b>27</b>
I-4-1-L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....	27
I-4-2-L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE .....	28
I-4-3-ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE.....	29
I-4-4-ACTIVITE ANESTHESIQUE.....	30
I-4-5-ACTIVITE CICATRISANTE ET REGENERATRICE .....	30
I-4-6-ACTIVITE ANTICANCEREUSE .....	30
I-4-7- ACTIVITE ANTI-CHOLINESTERASE.....	31
I-4-8- AUTRES ACTIVITES .....	31
I-4-9- EFFET INDESIRABLE (TOXICITE).....	31
<b>I-5-UTILISATION COMMERCIALE.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>33</b>
<b>Chapitre II- matériel et méthodes.....</b>	<b>.....</b>

<b>II-1-PRESENTATION DE LA MATIERE PREMIERE.....</b>	<b>44</b>
<b>II-2-EXTRACTION DE LA PROPOLIS.....</b>	<b>45</b>
<b>II-3-ÉTUDE COMPARATIVE .....</b>	<b>45</b>
II-3-1-DOSAGE DES POLYPHENOLS .....	45
II-3-2-DOSAGE DES FLAVONOÏDES .....	46
II-3-3-ÉTUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	46
II-3-3-1- <i>Test de l'activité antiradicalaire au DPPH</i> .....	47
II-3-3-2- <i>Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS</i> .....	48
II-3-3-3- <i>Test du blanchissement du <math>\beta</math>-carotène</i> .....	49
II-3-3-4- <i>Test de la Réduction du cuivre (CUPRAC)</i> .....	49
II-3-3-5- <i>Test de la réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)</i> .....	50
II-3-4-ÉTUDE DE L'ACTIVITE ANTI-CHOLINESTERASE.....	51
II-3-5-CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A SPECTROMETRIE DE MASSE (LC/MS) .....	52
II-3-6- ÉTUDE STATISTIQUE .....	53
<b>II-4-ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE .....</b>	<b>53</b>
II-4-1-EXTRACTION.....	53
II-4-2-METHODE DE SEPARATION DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYLE .....	54
II-4-2-1- <i>Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle</i> .....	54
II-4-2-2- <i>L'étude des fractions f6 et f7</i> .....	56
II-4-2-3- <i>L'étude de la fraction f8</i> .....	57
II-4-2-4- <i>L'étude des fractions f9 et f10</i> .....	57
II-4-3- L'IDENTIFICATION SPECTRALE DES COMPOSES ISOLEES .....	59
II-4-3-1- <i>Spectrophotométrie UV-visible</i> .....	59
II-4-3-2- <i>Résonance magnétique nucléaire</i> .....	59
II-4-3-3- <i>Spectrométrie de masse en injection directe</i> .....	59
<b>REFERENCES .....</b>	<b>60</b>
<b>Chapitre III- Résultats et discussion.....</b>	<b>.....</b>
<b>III-1-ÉTUDE COMPARATIVE DE QUELQUE PROPOLIS ALGERIENNE.....</b>	<b>62</b>
III-1-1-DOSAGE DES POLYPHENOLS ET FLAVONOÏDES .....	62
III-1-2- ÉTUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	65
III-1-2- 1- <i>Test de l'activité antiradicalaire au DPPH</i> .....	65
III-1-2-2- <i>Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS</i> .....	68
III-1-2-3- <i>Test du blanchissement du <math>\beta</math>-carotène</i> .....	70
III-1-2-4- <i>Test de la Réduction du cuivre (CUPRAC)</i> .....	72
III-1-2-5- <i>Test de la réduction du Fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)</i> .....	74
III-1-3-ÉTUDE DE L'ACTIVITE ANTICHOLINESTERASE.....	77
III-1-4- ANALYSE DES EXTRAITS DE LA PROPOLIS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS) .....	78
<b>III-2- ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PROPOLIS DE CONSTANTINE .....</b>	<b>84</b>
III-2-1-IDENTIFICATION DES PRODUITS ISOLEES DE L'EXTRAIT ACETATE D'ETHYLE .....	85
III-2-1-1- <i>Elucidation structurale du composé PCA1</i> .....	85
III-2-1-2- <i>Élucidation structurale du composé PCA2</i> .....	91
III-2-1-3- <i>Élucidation structurale du composé PCA3</i> .....	97
III-2-1-4- <i>Élucidation structurale du composé PCA4</i> .....	103
III-2-1-5- <i>Élucidation structurale du composé PCA5</i> .....	110
III-2-1-6- <i>Élucidation structurale du composé PCA6</i> .....	115
III-2-1-7- <i>Élucidation structurale du composé PCA7 et PCA8</i> .....	121
<b>REFERENCES .....</b>	<b>128</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>132</b>

# **Introduction Générale**

### Introduction générale

Durant les dernières années, l'intérêt aux remèdes traditionnels et la naturopathie a connu une croissance remarquable dans le domaine de la médecine et même pour l'opinion publique. Une nouvelle vue des méthodes de la médecine traditionnelle a conduit à ressusciter de l'oubli des produits naturels pharmacologiquement actifs. Certains de ces produits peuvent être utilisés comme des compléments à la gamme actuelle des substances médicamenteuses pour le traitement de certaines maladies dans la médecine humaine et vétérinaire (**Holz, 1999**).

L'apithérapie s'inscrit dans le mouvement d'utilisation de produits naturels au service de la santé. Elle consiste à utiliser les produits récoltés, transformés ou sécrétés par les abeilles à des fins diététiques et/ou thérapeutiques.

Parmi ces produits, la propolis est définie comme un remède naturel utilisé depuis l'antiquité. Cette résine végétale est récoltée par les abeilles (*Apis mellifera*) à partir d'une série de substances résineuses qu'elles vont recueillir sur différents supports végétaux comme les bourgeons, jeunes rameaux, ou encore les blessures de certains arbres et arbustes. Après récolte, la propolis est mélangée avec les sécrétions salivaires des abeilles et de la cire (**Ghisalberti, 1979, Challem, 1995, Park, et al 1999**).

L'intérêt croissant à la propolis s'est exprimé par une série de travaux scientifiques dans les années 80 et 90 qui ont été mis en œuvre afin de tester principalement les composants chimiques de la propolis et leur possible emploi dans la médecine humaine (**Holz, 1999**).

La propolis présente de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques telles que des activités antifongique Ota, C et al (2001), antibactérienne, antivirale Kujumgiev, et al (1999), anti-inflammatoire Ramos, et al (2007), antitumorale Carvalho, et al (2011) et plus particulièrement l'activité antioxydante Cottica, et al (2001). Cette dernière est liée directement à sa composition en polyphénols et en flavonoïdes.

Compte tenu de toutes ces considérations, le présent travail a pour but l'étude de la composition chimique et des propriétés antioxydantes de la propolis algérienne. Dans la première partie nous nous sommes intéressés à plusieurs propolis Algérienne. Une étude comparative a été réalisée en fonction de leur activité antioxydante. L'influence du solvant utilisé lors de l'extraction et celle de la zone géographique de la propolis étudiée ont aussi été évaluées. Dans un premier temps, nous avons effectué une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux. En second lieu, le pouvoir antioxydant des différents extraits a été estimé par cinq méthodes différentes (DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotène, CUPRAC, FRAP).

Cette première partie de notre travail nous a permis de faire une première classification des propolis étudiées et de sélectionner les extraits les plus actifs sur lesquels nous avons réalisé

une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse dans le but d'étudier leurs profils chimiques. Enfin, l'activité anticholinestérase de la propolis la plus active a été étudiée pour expliquer l'efficacité de la propolis dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la propolis Algérienne. Nos recherches bibliographiques ont montré que la composition de la propolis est très variable car elle dépend de la végétation locale. Ainsi, la propolis collectée dans les zones tempérées telles que l'Europe, le Nord de l'Amérique ou les régions non-tropicales de l'Asie, provient principalement des bourgeons d'espèces de peuplier. Cette propolis est riche en flavonoïdes, acides et esters phénoliques (**Bankova, et al 2000**) ; Par contre, la propolis tropicale (issue de régions où les peupliers et les bouleaux ne poussent pas) est plutôt riche en dérivés prénylés d'acides phénoliques, benzophénones et en composés di et tri terpéniques (**Salatino, et al 2011**).

Concernant la propolis Algérienne, il n'existe pas d'études sur la provenance de la propolis ainsi que son origine botanique. Les rares articles montrent la présence de deux types de propolis provenant de deux espèces principales: *Populus spp* et *Cistus spp*. Le premier type est riche en composé phénoliques tels que: chrysin, apigénine, kaempférol, galangine, pinobanksine, pinobanksine 3-acétate et les dérivés de l'acide caféique. Le second type est riche en composés terpéniques tels que : acide cupressique, acide isocupressique, acide imbricatolique, torulosal, isoagatholal, torulosol, agathadiol et cistadiol (**Piccinelli, et al 2013**). Cette hypothèse, nous a encouragées à réaliser une étude phytochimique de la propolis algérienne afin de déterminer ses principaux composés.

Dans la dernière partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la propolis la plus active. Une investigation phytochimique de l'extrait le plus actif de cette propolis a été réalisée. Les principaux composés sont donc séparés par différentes techniques chromatographiques. L'identification et la détermination de la structure de ces composés est réalisée par les différentes techniques spectroscopiques telles que la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) mono et bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie UV-visible

### Références

- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Carvalho, A. A., Finger, D., Machado, C. S., Schmidt, E. M., da Costa, P. M., Alves, A. P. N. N., ... & dos Santos, J. M. T. (2011). In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 126(3), 1239-1245.
- Challem, J. (1995). Medical journals document value of bee propolis, honey, and royal jelly. *Natural Foods Merchandiser*.
- Cottica, S. M., Sawaya, A. C., Eberlin, M. N., Franco, S. L., Zeoula, L. M., & Visentainer, J. V. (2011). Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(5), 929-935.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis : a review. *Bee World*, 60(2), 59-84.
- Holz, J. (1999). *Zur Wirksamkeit von Propoliszubereitungen bei Otitis externa des Hundes sowie Untersuchungen der antibakteriellen, antiviralen Aktivitäten von ethanolschen Propolisextrakten und deren Wirkung auf Zellkulturen* (Doctoral dissertation).
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44(9-10), 375-378.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Moura, F. F., & Ikegaki, F. F. M. (1999). Atividade biológica da própolis. *Revista OESP-Alimentação*, 27, 46-53.
- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Ramos, A. F. N., & Miranda, J. D. (2007). Propolis : a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 697-710.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28(5), 925-936

# **Chapitre-I :**

## **La propolis**

## I-1 Généralité

### I-1-1-Définition et utilisation

La propolis est l'un des six produits de la ruche avec le miel, la gelée royale, le pollen, la cire et le venin d'abeille. La propolis (Figure-1) est une substance résineuse et gommeuse, balsamique, de couleur variable (rouge, noire, jaune, brun très foncé, vert). Cette substance est récoltée par les abeilles (*Apis mellifera*) à partir d'une série de substances résineuses qu'elles vont recueillir sur différents supports végétaux comme les bourgeons, jeunes rameaux, ou encore blessures de certains arbres et arbustes. Après récolte, elle est mélangée avec les sécrétions salivaires des abeilles et de la cire. (Challem, 1995, Ghisalberti, 1979, Park, et al 1999).



**Figure-1: Propolis brute**

<https://french.alibaba.com/g/propolis.html>

Dans la ruche (Figure-2), la propolis a de multiples usages : elle est responsable de la faible incidence des bactéries et moisissures à l'intérieur de la ruche (face à l'humidité et au développement des moisissures). Elle assure aussi la protection de la colonie par la réduction de l'entrée de la ruche. En effet, l'ouverture à l'entrée de la ruche est constamment remodelée afin d'ajuster ses dimensions et son orientation aux conditions climatiques. Ce passage constitue par la même occasion une sorte de "sas de décontamination" où chaque abeille entrante et sortante devra se poser, d'où le nom de propolis qui vient du grec ancien *pro* pour "devant, à l'entrée de" et *polis* pour "communauté, cité" (Ghisalberti, 1979, Crane, 1988). La propolis est aussi une véritable arme chimique contre les microorganismes et sert à momifier



les animaux intrus et morts (rats et / ou souris par exemple) trop gros pour être évacués par les abeilles, évitant ainsi leur décomposition (Lavie, 1975, Ghisalberti, 1979, Challem, 1995).



**Figure-2 : Grille à propolis**

<http://propolia.com/monde-de-l-abeille/perles-de-la-ruche/la-propolis>

### **I-1-2-Historique**

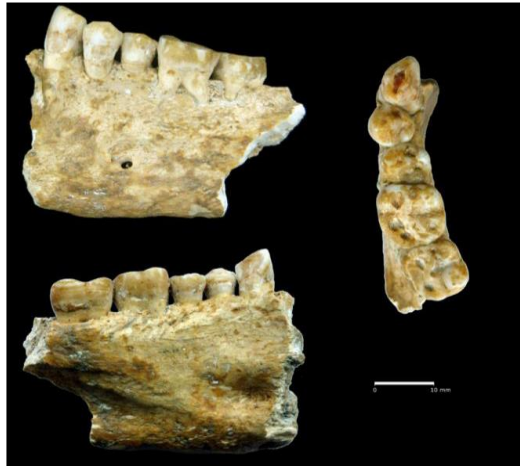
La propolis est un remède naturel qui est utilisé depuis les temps anciens. Les études confirment que son utilisation remonte à l'Égypte antique et de façon certaine au Grecs. En effet les anciens égyptiens, l'utilisaient pour embaumer les corps des défunts (Figure-3), en enduisant avec la propolis les bandelettes des momies, pour leur assurer une meilleure conservation.



**Figure-3 : momie de cadavre de souris**

<http://abeilleduforez.tetraconcept.com/dossiers-techniques/pratique-apicole-a-la-miellerie/apitherapie-la-propolis/>

De plus la propolis était utilisée pour soigner et anesthésier les caries dentaires (Figure-4).



**Figure-4 : Mâchoire avec une cavité dentaire remplie en cire et propolis**

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Beeswax\\_as\\_Dental\\_Filling\\_on\\_a\\_Neolithic\\_Human\\_Tooth\\_-\\_Journal.pone.0044904.g001.png](https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Beeswax_as_Dental_Filling_on_a_Neolithic_Human_Tooth_-_Journal.pone.0044904.g001.png)

Au II<sup>ème</sup> siècle après J-C, les propriétés médicinales de la propolis étaient reconnues par les médecins grecs et romains : Aristote, Dioscoride, Pline et Galien. Dans le livre « Histoire des animaux » Aristote considéré la propolis comme « remède aux infections de la peau, plaies et suppurations ». Tout comme les médecins arabes, qui l'utilisaient comme antiseptique et cicatrisant dans le traitement des plaies, et les Incas qui l'employaient en tant qu'agent antipyrétique (**Havsteen, 1983 ; Burdock, 1998**). La propolis est retrouvée également dans les livres de médecine de Géorgie, à partir du XII<sup>ème</sup> siècle, où elle entre dans la préparation de nombreux remèdes

Au XVI<sup>ème</sup> siècle, elle servait à cicatriser les blessures de flèches. Hippocrate recommandait la propolis pour la guérison des plaies et des ulcères (**Dealey, 2005**).

En France à la fin XIX<sup>ème</sup> siècle, on trouve quelques traces de son usage dans les traitements des plaies, mais c'est surtout à l'occasion de la guerre Boers en Afrique du S

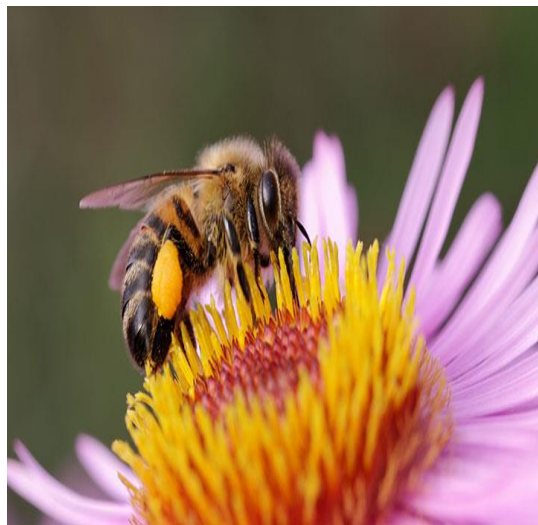
ud qu'elle connaît son apogée d'utilisation grâce à ses propriétés désinfectante et cicatrisante (**Lavie, 1975, Hegazi, 1997**).

A la fin de XXI<sup>ème</sup> siècle, en Russie et en Allemagne la propolis était reconnue pour son action anti-infectieuse, cicatrisante, hydratante et anti-inflammatoire. On pouvait la trouver sous formes variées lotion, pommade, emplâtre et fumigation (**Eric Debuyser, 1984**).

### I-1-3-Récolte

#### I-1-3-1-Par les abeilles

La propolis est un complexe fabriqué par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses (ce sont les butineuses les plus âgées qui récoltent la propolis) à partir des sécrétions de végétaux qu'elles ont récolté aux heures chaudes de la journée (Figure-5). La récolte se déroule du printemps à la fin de l'été. L'ouvrière transporte la résine translucide et visqueuse dans les corbeilles de ses pattes arrière. Ces pelotes sont d'une couleur allant du jaune-clair au vert-brun. Celles-ci ne sont pas stockées dans les alvéoles mais utilisées aussitôt par les maçonnes. Ces dernières les modifient par l'apport de leurs propres sécrétions (cire et sécrétions salivaires principalement), et l'appliquent au besoin. Plus l'endroit est chaud, plus le pourcentage de cire est important, la propolis étant visqueuse et collante aux alentours de 20 °C et devenant dure et cassante avec le froid ou le vieillissement. C'est ce qui explique qu'on retrouve une propolis plus concentrée au niveau du trou d'envol et sur la tête des cadres. Tout cela prend de sept minutes à une heure en fonction de la source et de la météo. Le déchargement dans la colonie se fait sur le site d'utilisation de la propolis (15 minutes à plusieurs heures) en fonction de la disponibilité des congénères qui doivent la décharger (**Lavie, 1975**).



**Figure-5 : récolte de propolis par l'abeille**

<https://www.haut-couserans.com/pratique/produitslocaux/detailsproducteurslocaux.php?produitslocaux=41>

Cette récolte dépend de nombreux facteurs :

- Saisonnier : la récolte a lieu soit en début de saison (printemps), soit à la fin de la miellée ou à l'approche de l'automne, au moment des préparatifs d'hivernage (**Lavie, 1975**).

- Géographique : les ruche des régions boisées favorisent la fabrication de propolis par rapport à celles des plaines (Hegazi, 1997).
- Climatique : les abeilles récolteuses de propolis déploient en général leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20 °C) et pendant les heures les mieux exposées (entre 10h et 15h 30).
- Races d'abeilles : la tendance à propolis dépend de la race d'abeille. Ce sont les caucasiennes (*Apis mellifera*) et certaines autres races d'Asie mineur (celle d'Anatolie centrale en particulier) qui fabriquent en générale d'avantage que les autres (Alexandare, 1984).

### I-1-3-2-Par l'homme au niveau de la ruche

Plusieurs techniques de récolte existent. On peut différencier la qualité de la propolis en fonction de la technique utilisée. La plus classique est le raclage et le grattage des cadres et des parois de la ruche (Figure-6). La récolte se fait de préférence par température assez basse car la propolis, alors dure et friable, se détache mieux. Cette méthode assez simple ne donne aucune garantie quant à la qualité du produit : âge indéterminé, présence possible de contaminants dans la ruche (produits de traitement), impuretés (particules de bois, abeilles...). La récolte systématique sur la tête des cadres permet d'obtenir une propolis fraîche. Plus la température est basse, plus le pourcentage de cire dans la sécrétion récoltée sera faible. (Lavie, 1975)



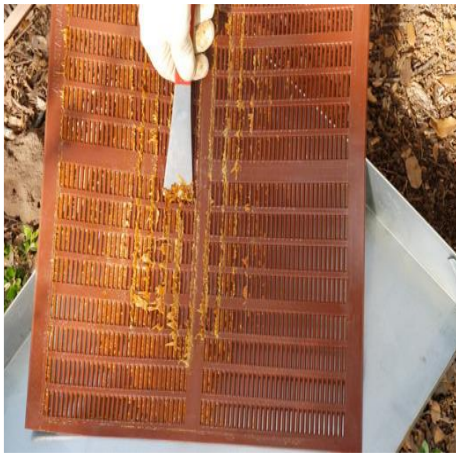
**Figure-6 : Raclage de propolis sur les flancs de la ruche.**

[http://pinchon.eu/apimio/rucher/an\\_apicole.html#propolis](http://pinchon.eu/apimio/rucher/an_apicole.html#propolis)

L'utilisation de grilles spécifiques qui se placent sur la tête des cadres sans isolant par-dessus peut améliorer la qualité du produit. Cette utilisation de grilles en bois, en plastique

souple moulé ou en métal inoxydable (Figure-7) permet une récolte ponctuelle durant les périodes de grande production et en dehors des périodes de traitement des ruches. Les interstices doivent être compris entre 0,1 et 3 mm. Lorsqu'une grille est remplie, on peut en replacer une seconde par dessous. Elles seront retirées avant le traitement d'été. Elles sont alors stockées jusqu'à une période plus froide. Pour en extraire la propolis, il faut placer les grilles au froid pendant 24 à 48 h (congélation). Elles sont roulées dans un sac pour éviter de retrouver de la propolis partout. (Krell, 1996)

La quantité que peut récolter un apiculteur par ruche est très variable en fonction des abeilles et de l'environnement. Elle se situe généralement entre 100 et 300 grammes de produit brut par an et par ruche. Certaines techniques intensives basées principalement sur une augmentation de la ventilation des ruches permettent avec des abeilles productives d'atteindre 800 g/ruche/an.



**Figure-7 : Grille en plastique et en toile**

<http://lamancheapicole.fr/wp-content/uploads/2018/12/proposainlo1218-F.Sauvager.pdf>

#### **I-1-4-Conservation**

La propolis se conserve assez facilement dans de bonnes conditions sans impératifs spéciaux pour la plupart de ses présentations, mais il paraît néanmoins préférable de la garder dans des récipients opaques à la lumière, bien fermés et à l'abri de la chaleur.

#### **I-1-5-Provenance**

La Propolis à deux origines :

##### **I-1-5-1-Origine interne**

La Propolis est une résine provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe, situé entre le jabot et l'intestin moyen.



### I-1-5-2- Origine externe

Les principales essences d'arbres, connues pour être productrices de propolis sont représentées par différents conifères : pin, sapin, épicéa Hegazi (1997), Lavie (1975), Metzner, et al (1978) ; plusieurs espèces de peupliers (qui semblent la source la plus importante), l'aulne, le saule, le marronnier d'Inde, le bouleau, le prunier, le frêne, le chêne et l'orme (**Francisco A Tomas-Barberan, et al 1993**).

### I-1-6-Aspect macroscopique et microscopique

#### I-1-6-1-Propriétés physiques

##### ➤ Consistance

- La propolis est une substance résineuse hétérogène de consistance solide qui devient friable en dessous de 15°C et gluante vers 60-70 °C en moyenne et molle à haute température (alentours de 300 °C).
- Densité : 1.11 à 1.14
- Point de fusion : 80-105°C
- Très peu soluble dans l'eau, partiellement soluble dans l'alcool, acétone, benzène, le chloroforme, etc.

##### ➤ Caractères organoleptiques

- Sa couleur est variable selon la situation géographique, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noire.
- saveur : âcre, piquante, parfois amère, qui donne une insensibilisation de la muqueuse buccale
- odeur : variable selon son origine, en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille...etc.) **Metzner, et al (1978)**. Si elle est brûlée, elle dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques (**Nikolaev, 1978**).

#### I-1-6-2-propriétés microscopiques

La structure microscopique de la propolis est maintenant assez bien connue grâce à un important travail de Marchenay (1977), réalisé au microscope électronique à balayage, et portant sur des échantillons de provenance de la France entière. Les résultats montrent que l'on retrouve toujours les mêmes microstructures et en nombre très limité, pour des propolis d'origines fort différentes. Ce qui prouve, d'après cet auteur, le rôle très important des abeilles ouvrières dans la formation de la structure de ce produit.

### I-1-7- Constituant globale

La composition de la propolis est variable selon la source végétale visitée par les abeilles Bankova, et al (2000), Negri, et al (2000), Popova, et al (2002), mais présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable (**Justin, et al 1996**).

Globalement et généralement, la propolis recueillie dans la ruche est constituée de :

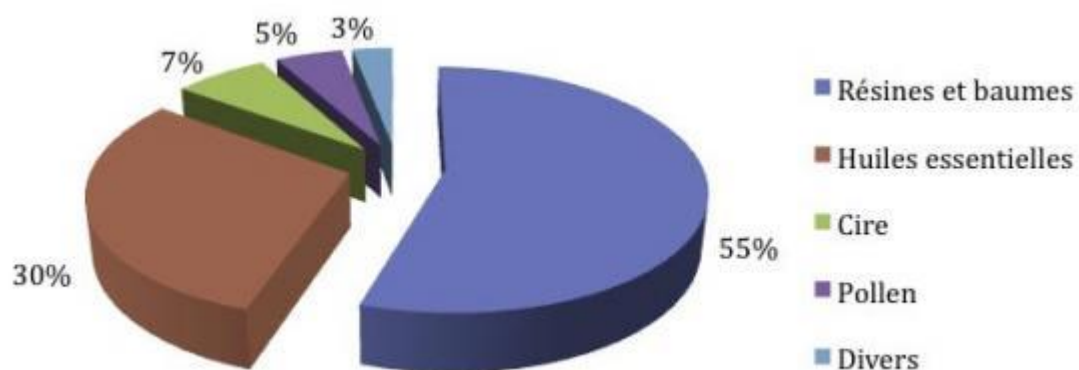
- 45 à 55% de résines et baumes contenant principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques ainsi que leurs esters (**Bankova, et al 1982, 1992**).

- 25 à 35 % de cire.

- 10% d'huiles volatiles ou essentielles.

- 5% de pollen (**Metzner, et al 1987**)

- 5% de matières diverses organiques et minérales **Metzner, et al (1987)** et vitamines (**Ivanov, 1980, Ghisalberti, 1979**). (**Figure-8**)



**Figure-8 : Composition de la propolis**

<http://miel-et-propolis.e-monsite.com/pages/la-propolis/composition-chimique-1.html>

Afin de mieux comprendre les causes de la variabilité de la composition de la propolis, il est important de savoir les principaux facteurs qui influencent cette diversité. L'origine botanique constitue le principal facteur responsable de cette diversité. Ainsi, la composition de la propolis dépend principalement de la flore locale au niveau des sites de collecte. Elle dépend aussi du temps de la récolte et de zone géographique.

### I-2-Propolis et source végétale

La classification de la propolis dépend de la région, de la flore botanique qui se situe à proximité immédiate des ruches et aussi des préférences de l'abeille (**Banskota, et al 2004**).

Les chercheurs ont répertorié de nombreux types de propolis en fonction de leur composition et localisation géographique. Parmi eux quatre grands types se distinguent : propolis des zones tempérées, tropicale, méditerranéenne et pacifique.

### I-2-1-Propolis des zones tempérées

Les premières études sur la composition chimique de la propolis ont été réalisées dans les années 70, Lavie et Popravko ont analysé la propolis de France et Russie pour déterminer la relation composition – flore. Ces études ont montré que la composition chimique des deux échantillons, ressemble à celle des bourgeons de peupliers, qui se trouve dans ces régions.

Aujourd’hui, nous disposons de beaucoup d’informations sur la propolis provenant des zones tempérées de chaque hémisphère Europe Bankova, et al (1989), Greenaway, et al (1987), Nagy, et al (1986), Popravko, et al (1980), Tamas, et al (1979), Amérique du nord Garcia-Viguera, et al (1993), Asie non tropicale Bankova, et al (1992), Chi, et al (1996). Il ressort que la principale source de propolis dans ces régions est l’exsudat résineux des bourgeons de différents peupliers : espèce *Populus* section *Aigeiros* (Salicaceae), et principalement le peuplier noir (*Populus nigra.L*) (**Figure-9**).



**Figure-9 : Populus nigra**

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Peuplier\\_noir](https://fr.wikipedia.org/wiki/Peuplier_noir)

### I-2-2-Propolis des zones tropicales

Dans les zones tropicales (**Brésil, Cuba, Venezuela, et Chile**) les abeilles doivent trouver une autre source de propolis afin de remplacer le peuplier Bankova, (2005) et donc la propolis dans ces régions possède une composition chimique différente de celle de type peuplier. Cette variété a attiré l’attention de plusieurs chercheurs durant ces dernières années (années 2000).



Au Brésil existe plusieurs types de propolis, la propolis verte est le type le plus répandu. La principale source de cette propolis est une résine contenue dans les feuilles et les bourgeons d'une plante endémique de cette région est nommée *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **(Figure-10)**



**Figure-10: Baccharis dracunculifolia**

[https://en.wikipedia.org/wiki/Baccharis\\_dracunculifolia](https://en.wikipedia.org/wiki/Baccharis_dracunculifolia)

Au Nord-Est du Brésil existe un autre type de propolis appelé la propolis rouge dont la source végétale est *Dalbergia ecastaphyllum*. **(Figure-11)**



**Figure-11: Dalbergia ecastaphyllum**

[https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/629523](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/629523)

A Cuba et au Vénézuéla, la principale source botanique est la résine provenant des exsudats de fleurs de Clusia (*Clusia rosea*) de la famille des Clusiaceae. **(Figure -12)**



**Figure-12: *Clusia rosea* (Clusiaceae)**

[http://www.plantsystematics.org/imgs/dws/r/Clusiaceae\\_Clusia\\_rosea\\_284.html](http://www.plantsystematics.org/imgs/dws/r/Clusiaceae_Clusia_rosea_284.html)

### **I-2-3-Propolis des zones méditerranéennes**

Des études récentes ont révélé un nouveau type de propolis : la propolis méditerranéenne. Ce type de propolis se distingue par la forte concentration de diterpénoïdes et se retrouve dans de nombreuses régions comme la Grèce Popova, et al (2010); Çelemlı, et al (2013), la Suisse Bankova, et al (2002), Malte Popova, et al (2011), la Turquie Velikova, et al (2000); Silici, et al (2007); Duran, N. et al (2011) et l'Algérie Piccineli, et al (2013). La source diterpénique semble correspondre à différentes Cupressaceae, très cultivées dans cette région et de composition distincte des Pinaceae (Popova, M. P. et al 2010). (Figure-13)



**Figure-13: Cupressaceae**

<https://www.inaturalist.org/taxa/47374-Cupressaceae>

### **I-2-4-Propolis des zones pacifiques**

Une nouvelle famille de composés, les prénylflavonoïdes ont été rencontrés dans des propolis provenant de la région Pacifique (Okinawa, Hawaii et Taiwan). La propolis d'Okinawa

provient de l'exsudat du fruit de *Macaranga tanarius* de la famille des Euphorbiaceae, (Kumazawa, et al 2004). (Figure-14)



**Figure-14 : Macaranga tanarius**

<http://mywalkaboutplants.com/macaranga-tanarius/>

Le tableau-1 rassemble l'étude des différentes propolis par rapport à leurs probables sources végétales.

**Tableau-1 : Exemples de types de propolis avec leur origine botanique**

Origine géographique	Source végétale	références
Europe, Amérique du nord Asie non tropicale	<i>Populus spp</i> , plus majoritairement <i>P.nigra</i>	- Bankova, V. et al 2000 -Falcao, S. et al 2010 -Sun, L.-P. et al 2012
Brésil Propolis verte	<i>Baccharis spp</i> , plus majoritairement <i>B.dracunculifolia</i>	- Bankova, V. et al 2005 - Bankova, V. et al 2000 - Park Y. K. et al 2002 - da Silva Frozza, C. O. et al 2013
Propolis rouge	<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	- Park, Y. K. et al 2002 - Dausch, A. et al 2008 - Silva, B. B. et al 2008
Cuba, Venezuela	<i>Clusia (Clusia rosea)</i>	- Cuesta-Rubio, O. et al 2002
Méditerranée Algérie	<i>Populus spp.</i> (type I) <i>Cistus spp.</i> (type II)	- Piccinelli, A. L. et al 2013 -Velikova, M. et al 2000
Grèce	Probablement Conifer spp.	- Popova, M. P. et al 2010

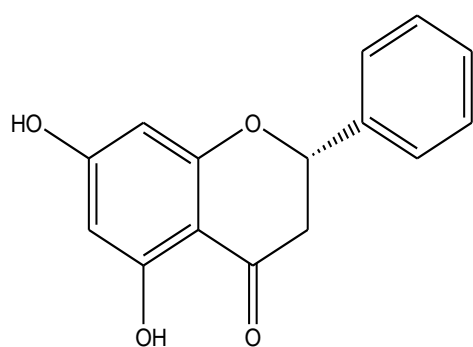
Turquie Malta	<i>Populus</i> spp, <i>Eucalyptus</i> spp, et <i>Castanea sativa</i> <i>Ferula</i> spp	- Duran, N. et al 2011 - Velikova, M. et al 2000 - Popova, M. et al 2011
Afrique Nigeria Kenya Cameroun Congo	Probablement <i>M. schweinfurthii</i>	- Petrova, A. et al 2010
Russie	<i>verrucosa</i> , <i>B. pendula</i> et <i>B. pubescens</i>	- Isidorov, V. A. et al 2014
La région du pacifique Okinawa, Hawaii et Taiwan	<i>Macaranga tanarius</i>	- Kumazawa, S. et al 2004 - Chen, C.-N. et al 2012

### I-3-Composition chimique

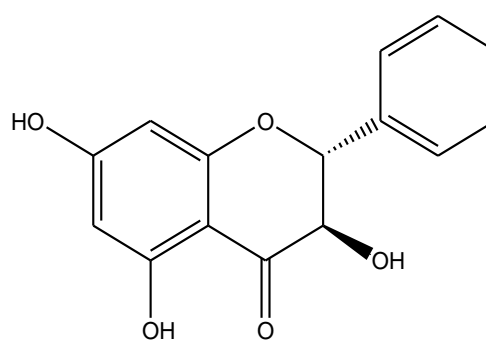
Le développement des techniques de séparation et de purification telles que la chromatographie liquides à haute performance (HPLC), la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse (GC), ainsi que les techniques d'identification, telles que la spectroscopie de masse (MS), la résonance magnétique nucléaire (RMN), les techniques couplés (GC-MS) qui ont permis la séparation et l'identification de nombreux composés.

#### I-3-1-Zones tempérées

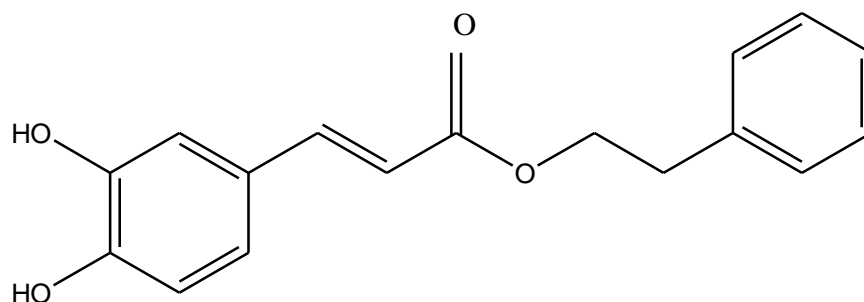
La propolis des zones tempérées est riche en composés phénoliques considérés comme typiques des bourgeons de peuplier tels que les flavonoïdes aglycones (flavones et flavanones avec un cycle B non substitué : pinocembrine, pinobanksine, galangine, quercitine et chrysin, mais aussi des acides et esters phénoliques comme l'ester phénylique d'acide caféique **CAPE** (Falcão, et al. 2010 ; Sun, et al. 2012).



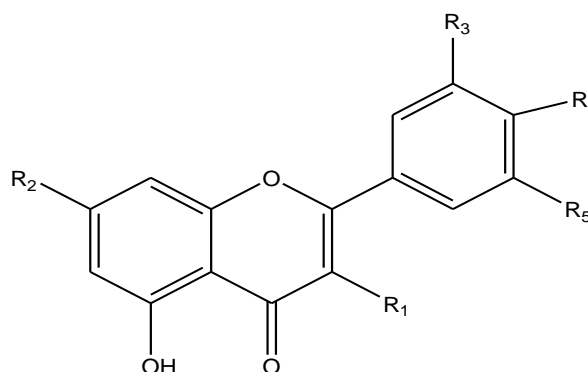
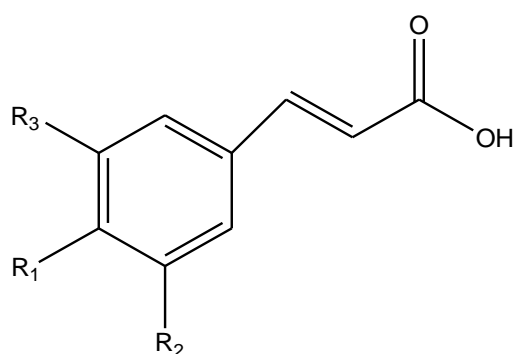
Pinocembrine



Pinobanksine



Ester phénéthylique d'acide caféique



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Acide cinnamique	H	H	H	Chryisine	H	OH	H	H	H
Acide <i>p</i> -coumarique	OH	H	H	Galangine	OH	OH	H	H	H
Acide caféique	OH	OH	H	kaempférol	OH	OH	H	OH	H
Acide férulique	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Quercétine	OH	OH	OH	OH	H
Acide isoférulique	OCH <sub>3</sub>	OH	H						

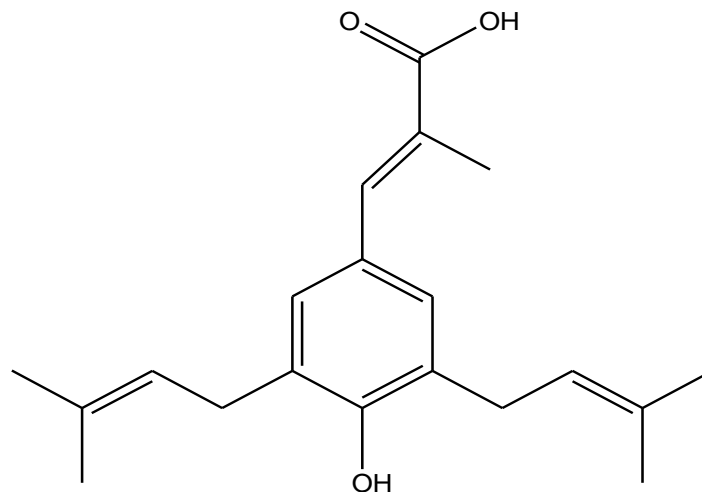
### I-3-2-Zones tropicales

Dans les régions tropicales comme le Brésil, les principales familles chimiques rencontrées dans la composition de la propolis sont les dérivés prénylés de l'acide *p*-coumarique (comme l'artépilline C) et les acides caféoylquiniques (**Bankova, et al 2000**). Les flavonoïdes comme le kaempféride et l'isosakuranétine et quelques dérivés de kaempferol ont également été trouvés dans des échantillons brésiliens (**Park, et al. 2002**). De plus, la propolis rouge des régions nord-est du Brésil présente des concentrations élevées d'acides phénoliques et des flavonoïdes tels que : formononétine, isoliquiritigénine, liquiritigénine, médicarpin et biochanine A (**Daugusch, et al. 2008 ; Silva Frozza, et al 2013**).

Des benzophénones prénylées comme la némorosone ont quant à elles été retrouvées dans des propolis du Venezuela Tomás-Barberán, et al (1993), de Cuba Hernández, et al (2005), de

l'Amazonie brésilienne De Castro I shida, et al (2011) et du Nord-Est du Brésil (Castro, et al 2009).

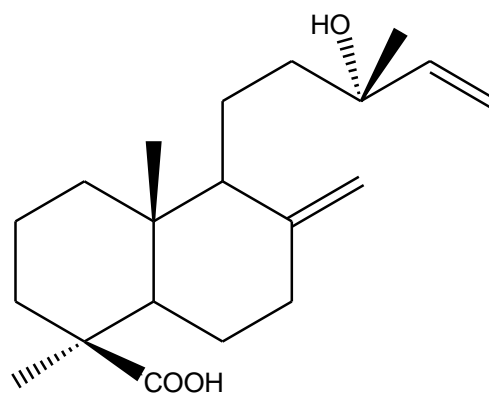
De nombreuses études sur la propolis africaine de différentes régions comme le Kenya, le Cameroun, le Congo et l'Éthiopie ont montré que les triterpénoïdes constituaient les principaux composants chimiques (Petrova, et al 2010; Rushdi, et al 2014; Papachroni, et al 2015).



**Artepillin C**

### I-3-3- Zones méditerranéennes

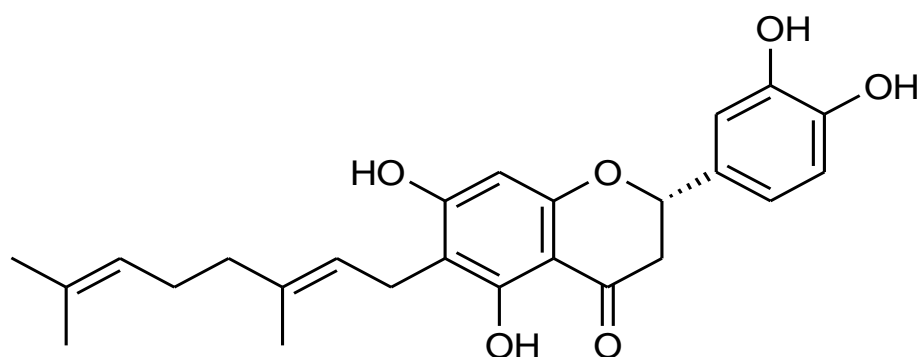
La propolis méditerranéenne a été récemment découverte. Cette propolis est très peu étudiée cependant, les recherches réalisées jusqu'à ce jour indique qu'elle est caractérisée par une forte concentration en terpénoïdes comme l'acide isocupressique. (Piccinelli, et al 2013)



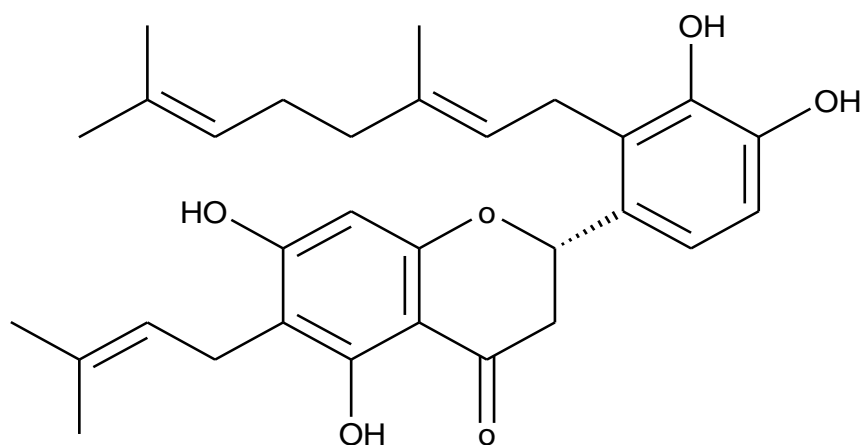
**Acide isocupressique**

### I-3-4-Zones pacifiques

La propolis du "Pacifique" est une autre particularité. Une nouvelle famille de composés, les prényl flavonoïdes, plus spécifiquement l'isonymphéol-B, a été identifiée dans la propolis d'Okinawa, bien que trois composés déjà connus, le nymphéol-A, le nymphéol-B et le nymphéol-C, aient également été isolés dans trois échantillons (**Kumazawa, et al 2004**). Comme la propolis d'Okinawa, la propolis hawaïenne est également composée de ce type de molécules. Neuf prényl flavonoïdes ont été identifiés (**Inui, et al 2012**). L'étude de la propolis taiwanaise a permis la séparation et l'identification de huit prényl flavanones, de nymphéol-A, de nymphéol-B et de nymphéol-C, de propolines A, B et E, d'isonymphéol B et de 3-géranylnaringénine (**Chen, et al 2012**).



nymphéol-A



nymphéol-C

### I-3-5-Propolis Algérienne

Il n'y a pas beaucoup d'études sur la propolis Algérienne, les rares articles qui existent sont en rapport avec la composition chimique et quelques activités biologiques, cependant il



n'existe pas d'études concernant la provenance de la propolis Algérienne ainsi que son origine botanique.

D'après une étude réalisée sur 14 échantillons différents Piccinelli, et al (2013) ont détecté la présence de deux types de propolis prévenant de deux espèces principales : *Populus spp et Cistus spp*. Le premier type est riche en composé phénoliques (chryssine, apigénine, kaempférol, galangine, pinobanksine, pinobanksine 3-acétate et les dérivés de l'acide caféique). Le second type est riche en composés terpéniques (acide cuprèssique, acide isocuprèssique, acide imbricatoloïque, torulosal, isoagathotal, torulosol, agathadiol, cistadiol).

Les travaux réalisés par Segueni, et al (2011, 2016) ont permis la séparation et l'identification de flavones et d'acides caféiques : acide férulique coumarique, caféique et cinnamique. Ces composés sont considérés comme marqueurs de propolis de type peuplier **(Segueni, et al 2017)** .

Une étude plus récente a mis en évidence la présence des composés phénolique suivant: Pinostrombine, galangine, naringenine, tectochryssine, methoxychrysin et suberosine **(Boutabet, et al 2011)**,

Dans une autre étude réalisée par Velikova, et al (2000), les auteurs ont rapporté une quantité très importante d'hydroditerpinique trouvée dans un échantillon de propolis algérienne.

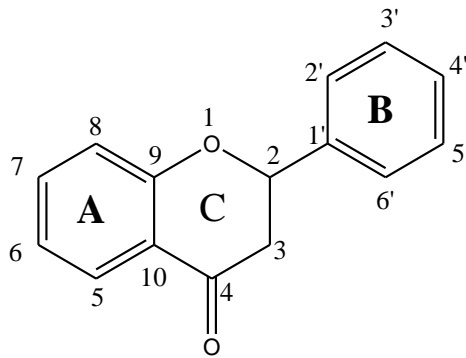
### **I-3-6-Composés chimique isolés de la propolis**

D'après l'étude bibliographique que nous avons menée, les travaux phytochimiques effectués sur la propolis ont permis essentiellement l'isolement de flavonoïdes, terpenoïdes et les acides phénoliques et leurs esters .

#### **I-3-6-1- Flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 (Figure-15) qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C). Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure mais aussi de l'acidité du milieu (pH).Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavone, flavonol, flavonone, isoflavone, chalcone, aurone. Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à-dire liée à des oses et autres substances **(Heller et Forkmann 1993)**.





**Figure-15 : Structure chimique commune des flavonoïdes**

Les flavonoïdes de la propolis sont devenus un sujet de recherche très intéressant car ils possèdent de nombreuses propriétés biologiques.

Les principaux flavonoïdes de la propolis sont : les flavones, les flavonols, les flavanones et les chalcones

Parmi les flavones, quatre composés sont majoritaires :

- La chrysin
- l'apigénine
- la lutéoline
- la rutine (**Zainullin, et al 2018**)

Les quatre flavonols majoritaires sont :

- la galangine
- la quercétine
- le kaempférol
- la rhamnazine (**Inui, et al 2012**)

Les flavanones les plus présents sont:

- la pinostrobin
- la pinocembrine
- l'hespéridine
- les pinobanksines et ses dérivés (**Li, et al 2008**)

Les chalcones et dihydrochalcone majoritaires sont :

- 2, 4,6 trihydroxy-dihydrochalcone
- 2,4-dihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone
- Pinobanksine-3-acétate chalcone
- Pinostrobin chalcone (**Silva, et al 2019**)

Les composés isolés sont représentés dans le tableau-2 suivant :

Tableau-2 : Les flavonoïdes identifiés dans la propolis

N	Nom chimique	Origine	Références
<b>Flavone</b>			
1	(7''R)-8-[1-(4'-hydroxy-3'-méthoxyphényl) prop-2-en-yl] chryisine	Mexique	Li, F. et al 2010
2	6-cinnamyl chryisine	Chine	Cao, Y. et al 2004
3	Lutéoline	Chine	Usia, T. et al 2002
4	5-hydroxy-3,3',4',7,8-pentaméthoxyflavone	Brésil	Silva, C.C. et al 2019
5	Hexa méthoxyflavone	Egypte	Hegazi, A.G. et al 2002
6	3',5-dihydroxy-4',7-diméthoxyflavone	Pologne	Maciejewicz, W 2001
7	5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone	Bashkir	Zainullin .R. A. et al 2018
8	5,7-dihydroxyflavone (chryisine)	Bashkir	Zainullin .R. A. et al 2018
9	Apigénine	Algérie	Piccinelli, A.L. et al 2013
<b>Flavonol</b>			
10	Kaempferol	Algérie	Piccinelli, A.L. et al 2013
11	Galangine	Algérie	Piccinelli, A.L. et al 2013
12	2'-géranylquercétine	Île des Salomon	Inui, S. et al 2012
13	2'-(8''-hydroxy-3'',8''-diméthyl-oct-2''-enyl)-quercétine	Île des Salomon	Inui, S. et al 2012
14	8-(8''-hydroxy-3'',8''-diméthyl-oct-2''-enyl)-quercétine	Île des Salomon	Inui, S. et al 2012
15	(7''R)-8-[1-(4'-hydroxy-3'-méthoxyphényl) prop-2-en-1-yl]-galangine	Mexique	Li, F. et al 2010
16	Macarangine	Kenya	Petrova, A. et al 2010
<b>Flavanone</b>			
17	(2R,3R)-3,7-dihydroxyflavanone	Brésil	Li, F. et al 2008
18	(2R,3R)-3,7-dihydroxy-6-méthoxyflavanone	Brésil	Li, F. et al 2008
19	(2S)-7-hydroxyflavanone	Brésil	Li, F. et al 2008
20	(2S)-7-hydroxy-6-méthoxyflavanone	Brésil	Li, F. et al 2008
21	(2S)-naringénine	Brésil	Li, F. et al 2008
22	(2S)-dihydrobaicalein	Brésil	Li, F. et al 2008
23	(2S)-dihydro oroxyline A	Brésil	Li, F. et al 2008
24	(2S)-5-hydroxy-7-méthoxyflavanone (pinostrobin)	Bashkir	Zainullin .R. A. et al 2018.
25	(2S)-5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone	Bashkir	Zainullin .R. A. et al 2018
26	5,7-dihydroxy-6-méthoxy-2,3-dihydroflavonol-3-acétate	Australie	Tran, V.H. et al 2012
27	(2R, 3R)-3,6,7-trihydroxyflavanone	Népal	Shrestha, S.P. et al 2007
28	3',4',6-trihydroxy-7-méthoxy flavanone	Népal	Shrestha, S.P. et al 2007
29	5-Méthoxy-3-hydroxyflavanone	Le Portugal	Falcão, S.I. et al 2010
30	Hespéritine-5,7-diméthyléther	Le Portugal	Falcão, S.I. et al 2010
31	Pinobanksine-5-méthyl-éther-3-O-pentanoate	Le Portugal	Falcão, S.I. et al 2010
32	Propoline A	Taiwan	Chen, C.N. et al 2003
33	Propoline B	Taiwan	Chen, C.N. et al 2003
34	Propoline E	Taiwan	Chen, C.N. et al 2003
35	Sigmoidine B	Taiwan	Chen, C.N. et al 2003
36	Bonannione A	Taiwan	Chen, C.N. et al 2003
37	Solphénol A	Île des Salomon	Inui, S. et al 2012
38	Sophoraflavanone A	Île des Salomon	Inui, S. et al 2012
39	(2S)-5,7-dihydroxy-4'-méthoxy-8-prénylflavanone	Île des Salomon	Inui, S. et al 2012

40	3- <i>O</i> -[( <i>S</i> )-2-méthylbutyroyl] pinobanksine	Chine	Usia, T. et al 2002
41	7- <i>O</i> -prénylstrobopinine	Grèce	Melliou, E. et al 2004
42	7- <i>O</i> -prénylpinoembrine	Grèce	Melliou, E. et al 2004
43	5, 7, 3', 4'-tétrahydroxy-5'- <i>C</i> -géranylflavanone	Brésil	Kumazawa, S. et al 2004
44	5, 7, 3', 4'-tétrahydroxy-6- <i>C</i> -géranylflavanone	Japon	Kumazawa, S. et al 2004
45	5, 7, 3', 4'-tétrahydroxy-2'- <i>C</i> -géranylflavanone	Japon	Kumazawa, S. et al 2004
46	5, 7, 3', 4'-tétrahydroxy-2'- <i>C</i> -géranyl-6-prénylflavanone	Japon	Kumazawa, S. et al 2004
47	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )-3,5-dihydroxy-7-méthoxyflavanone-3-(2-méthyl) butyrate	Japon	Li, F. et al 2010
48	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )-6[1-(4'-hydroxy-3'-méthoxyphényl) prop-2en-1-yl] pinobanksine	Mexique	Li, F. et al 2011
49	(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )-6[1-(4'-hydroxy-3'-méthoxyphényl) prop-2en-1-yl] pinobanksine-3-acétate	Mexique	Li, F. et al 2011
<b>Isoflavone</b>			
50	Calycosine	Brésil	Li, F. et al 2008
51	Medicarpin	Brésil	Alencar, S. et al 2007
52	7,4'-dihydroxyisoflavone	Brésil	Alencar, S. et al 2007
53	4',7-diméthoxy-2'-isoflavanol	Brésil	Alencar, S. et al 2007
54	Homopterocarpin	Brésil	Alencar, S. et al 2007
55	7,3'-dihydroxy-6,5'-méthoxyisoflavonoïde	Népal	Shrestha, S.P. et al 2007
56	7,3',4'-trihydroxy-5'-méthoxyisoflavonoïde	Népal	Shrestha, S.P. et al 2007
57	6, 7, 3'-trihydroxy-4'-méthoxyisoflavonoïde	Népal	Shrestha, S.P. et al 2007
58	7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavonoïde	Cuba	Piccinelli, A.L. et al 2005
59	5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavonoïde	Cuba	Piccinelli, A.L. et al 2005
<b>Isodihydroflavone</b>			
60	Biochanine	Cuba	Campo F et al 2008
61	(3 <i>R</i> )-4'-méthoxy-2',3,7-trihydroxyisoflavanone	Brésil	Li, F. et al 2008
62	2'-hydroxybiochanine A	Brésil	Li, F. et al 2008
63	Pratenséine	Brésil	Li, F. et al 2008
64	Daidzéine	Brésil	Li, F. et al 2008
65	Formononétine	Brésil	Li, F. et al 2008
66	Xenognosine B	Brésil	Li, F. et al 2008
67	Biochanine A	Brésil	Li, F. et al 2008
<b>Chalcone</b>			
68	4,4'-dihydroxy-2'-méthoxychalcone	Brésil	Li, F. et al 2008
69	3, 4, 2', 3'-tetrahydroxychalcone	Brésil	Righi, A.A. et al 2011
70	4,2', 4'-trihydroxy-2'-méthoxychalcone	Brésil	Silva, C.C. et al 2019
71	Isoliquiritigénine	Brésil	Li, F. et al 2008
<b>Dihydrochalcone</b>			
72	2',4'-dihydroxychalcone	Brésil	Li, F. et al 2008
73	( $\alpha$ S)- $\alpha$ , 2', 4,4'-tetrahydroxydihydrochalcone	Brésil	Li, F. et al 2008
74	2',6'-dihydroxy-4',4'-diméthoxydihydrochalcone	Canada	Christov, R. et al 2006
75	2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone	Canada	Christov, R. et al 2006
76	2',6',4'-trihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone	Canada	Christov, R. et al 2006

### I-3-6-2- Terpénoïdes

Les terpènes sont une vaste classe de composés organiques d'origine naturelle. On les connaît également sous le nom d'isoprènes, car leur structure repose sur la répétition d'unités d'isoprène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>). Les terpènes sont les principaux composants de la résine végétale et des huiles essentielles extraites de ces plantes. Ils sont classés en monoterpènes à 10 carbones dont l'isoprène est la molécule de base, en sesquiterpènes à 15 carbones, en diterpènes à 20 carbones, en triterpènes, en tétraterpènes, etc...

Parmi cette classe de composé, on rencontre principalement dans la propolis les monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques. Les monoterpènes acyclique et monocyclique retrouvés sont les myrcènes, les *p*-menthanes et les cinéoles. Les monoterpènes bicycliques sont classés en cinq groupes : les thujanes, les caranes, les pinanes, les fenchanes et les camphènes.

Les sesquiterpènes constituent l'une de principales classes de métabolites secondaires présents dans la propolis et se répartissent en quatre catégories : acycliques (les dérivés de farnésane), monocyclique (4 types), bicyclique (5 types) et tricyclique (10 types) (**Oliveira, et al 2010**)

Les Cembrane, labdane, abiéthane, pimarane et totarane sont signalés comme étant les principaux diterpènes de la propolis (**Popova, et al 2009**).

Pour les triterpènes tetra et pentacyclique les principales classes retrouvées dans la propolis sont les lanostanes et le cycloartane pour le premier groupe ainsi que l'oléanane, l'ursane et le lupane pour le second groupe (**Pereira, et al 2002**).

**Tableau -3 : Les terpènes identifiés dans la propolis**

N	Nom chimique	Origine	Références
<b>Monoterpenes</b>			
1	<i>trans</i> -β-Terpinéol	Grèce	Melliou, E. et al 2007
2	Linalol	Brésil	Oliveira, A.P. et al 2010
3	Camphre	Iran	Trusheva, B. et al 2010
<b>Diterpènes</b>			
4	acide imbricatoloïque	Algérie	Piccinelli, A.L. et al 2013
5	isoagathotal	Algérie	Piccinelli, A.L. et al 2013
6	Oxyde de manoylé	Grèce	Popova, M. P. et al 2010
7	Ferruginol	Grèce	Popova, M. P. et al 2010
8	Ferruginolone	Grèce	Popova, M. P. et al 2010
9	2-Hydroxyferruginol	Grèce	Popova, M. P. et al 2010
10	6/7-Hydroxyferruginol	Grèce	Popova, M. P. et al 2010
11	Sempervirol	Grèce	Popova, M. P. et al 2010

12	Acide abiétique	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
13	18-succinyloxyabietadiéne	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
14	18-succinyloxyhydroxyabietatriéne	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
15	18-hydroxyabieta-8, 11,13-triéne-7-one	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
16	Acide imbricataloïque	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
17	Acide diterpénique	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
18	Acide néoabiétique	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
19	Labda-8(17), 12,13-triéne	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
20	Acide hydroxy dihydro abiétique	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
21	Dihydroxyabieta-8, 11,13-triéne	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
22	Acide 13(14)-déhydrojunicedrique	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
23	Acide déshydroabiétique	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
24	18-Hydroxyabieta-8, 11,13-triéne	Grèce	Popova, M. P.et al 2010
25	Acide junicedric	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
26	<i>tran</i> -Communal	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
27	acide palmitoyl isocupressique	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
28	acide 13-hydroxy-8(17) ,14-labdadien-19-oïque	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
29	acide 15-oxolabda-8(17) ,13( <i>E</i> )-dien-19-oïque	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
30	Acide pimarique	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
31	Totarolone	Grèce	Popova, M. P.et al 2009
<b>Triterpènes</b>			
32	Alcanoate de lupeol	Brésil	Pereira, A.S.et al 2002
33	Lupeol	Cameroun	Papachroni et al. 2015
34	Acetate de lupeol	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
35	Acétate de lanostérol	Egypte	Hegazi, A.G.et al 2002
36	Lanostérol	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
37	Acétate de germanicol	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
38	germanicol	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
39	Acétate de $\beta$ -amyrine	Cameroun	Papachroni et al. 2015
40	$\beta$ -amyrone	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
41	Acétate de $\alpha$ -amyrine	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
42	$\alpha$ -Amyrone	Cuba	Márquez Hernández, I et al 2010
43	24-méthylène-9,19-cyclolanostan-3 $\beta$ -ol	Brésil	Pereira, A.S.et al 2002
44	Acide (22Z, 24E)-3-oxocycloart-22,24-diéne-26-oïque	Birmanie	Li, F.et al 2009
45	Acide (24E)-3-oxo-27,28-dihydroxycycloart-24-en-26-oïque	Birmanie	Li, F.et al 2009
46	Acide 3,4-seco-cycloart-12-hydroxy-4(28) ,24-diéne-3-oïque	Grec	Popova, M. P.et al 2010
47	Acide cycloart-3,7-dihydroxy-24-en-28-oïque	Grec	Popova, M. P.et al 2010
48	Ester méthylique d'acide 3-Oxo-triterpenique	Egypte	El Hady, F.K.A.et al 2000
49	Lupénone	Brésil	Silva, C.C.et al 2019
<b>Sesquiterpènes</b>			
50	Junipéne	Grec	Melliou, E. et al 2007
51	$\gamma$ -Elemene	Brésil	Oliveira, A.P. et al 2010
52	$\alpha$ -Ylangene	Brésil	Oliveira, A.P. et al 2010
53	Valencéne	Brésil	Oliveira, A.P. et al 2010

54	8- $\beta$ H-Cedran-8-ol	Turquie	Kartal, M.et al 2002
55	$\alpha$ -Bisabolol	Turquie	Silici, S. et al 2005
56	$\alpha$ -Eudesmol	Turquie	Silici, S. et al 2005
57	$\alpha$ -Cadinol	Turquie	Silici, S. et al 2005
58	Patchoulène	Indonésie	Wiryowidagdo, S.et al 2009

### I-3-6-3- Acides phénoliques

Un acide-phénol (ou acide phénolique) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique.

L'acide caféique ou acide (E)3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-énoïque est un composé organique naturellement présent dans toutes les plantes car c'est un intermédiaire clé dans la biosynthèse de la lignine. C'est un dérivé de l'acide cinnamique qui a une structure très proche de l'acide férulique et, comme lui, il appartient aux grandes familles des phénylpropanoïdes et des acides-phénols.

La propolis de type peuplier est riche en phénylpropanoïdes, dont l'acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et leurs dérivés. Parmi ces substances, les acides cinnamiques prénylés sont considérés comme des composés caractéristiques de la propolis verte brésilienne. Ces dernières années, les chercheurs ont identifié une série de dérivés de phénylpropanoïdes dans la propolis ainsi que des dérivés de l'acide caféique et un dérivé de l'acide isoférulique (Salatino, et al 2005).

**Tableau-4 : Les acides phénoliques identifiés dans la propolis**

N	Nom chimique	Origine	Références
1	acide chlorogénique	Brésil	Sun, S.et al 2019
2	acide isochlorogénique	Brésil	Sun, S. et al 2019
3	acide <i>cis</i> -3-méthoxy-4-hydroxycinnamique	Brésil	Teixeira, É.W. et al 2005
4	acide <i>trans</i> -3-méthoxy-4-hydroxycinnamique	Brésil	Teixeira, É.W. et al 2005
5	acide galique	Brésil	Salatino, A.et al 2005
6	Acide <i>p</i> -méthoxycinnamique	Brésil	Salatino, A.et al 2005
7	Acide dihydrocinnamique	Brésil	Salatino, A.et al 2005
8	Acide 3-prényl-4-hydroxycinnamique	Brésil	Marcucci, M.et al 2001
9	Acide 3,5-diprényl-4-hydroxycinnamique	Brésil	Marcucci, M.et al 2001
10	3-méthyl-2-butényl isoférulate	Brésil	Salatino, A.et al 2005
11	3-méthyl-3-butényl cafféate	Brésil	Salatino, A.et al 2005

12	Hexadécyle cafféate	Brésil	Salatino, A.et al 2005
13	Méthyl( <i>E</i> )-4-(4'-hydroxy-3'-méthylbut-( <i>E</i> )-2'-enyloxy) cinnamate	Brésil	Abu-Mellal, A.et al 2012
14	Tétradécényl cafféate (isomer)	Australie	Hegazi, A.G.et al 2002

La propolis a une faible valeur nutritive directe. Les vitamines sont présentes en très faible quantité tel que A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C et E (**Ghisalberti, 1979**). Cvek, et al (2008) a rapporté la présence de quelque minéraux tels que Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr et Zn. Par contre la propolis est riche en sucres glucose, fructose et saccharose Crane (1988) et en hydrocarbures (les alcanes, les alcènes, les alcadiènes, les monoesters, les diesters, les esters aromatiques). Des acides gras et des stéroïdes ont été identifiés dans la propolis égyptienne Hegazi, A.G.et al (2002) et la propolis brésilienne (**Teixeira, É.W. et al 2005**).

#### I-4- Propriétés pharmacologiques

La propolis possède un large spectre d'activité biologique, nous allons nous intéresser à celles qui ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques.

##### I-4-1-Activité antioxydante

De nombreuses études ont prouvé que la propolis possède une activité antioxydante très puissante. Cette activité est due à sa composition chimique. Plusieurs recherches ont démontré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec sa teneur en polyphénols. Les composés phénoliques responsables de cette activité sont principalement l'ester phénylique d'acide caféique (CAPE), le kaempférol mais aussi quelques acides cinnamiques tels que : l'acide caféique, *p*-coumarique et férulique.

La propolis algérienne sujet de la présence étude a fait l'objet de plusieurs chercheurs. Dans une étude réalisée par Piccinelli, et al (2013), l'activité antioxydante de 14 propolis algérienne a été évaluée par leur capacité de piégeage des radicaux libres. Les résultats obtenus ont permis de classer la propolis algérienne en deux groupes. Un premier groupe riche en composés phénolique principalement flavonols (kaempferol, galangine) et l'acides caféique et leur ester présentant la capacité la plus importante de piégeage des radicaux libres (IC<sub>50</sub> : varie entre 32.3 et 82.5 µg.ml<sup>-1</sup>) et un second groupe qui au contraire regroupe des propolis présentant une faible activité antioxydante (IC<sub>50</sub> : varie entre 208.3 et 600 µg.ml<sup>-1</sup>). Cette diminution de l'activité décelée dans le deuxième groupe en corrélation avec leur faible teneur en composés phénoliques. Ces propolis présentent par contre une grande teneur en composés terpénique.

Dans une autre étude Boufadi, et al (2014), ont testé l'efficacité des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de deux types de propolis algérienne ainsi que de quelque polyphénol et flavonoïdes séparés et identifiés. Les résultats suggèrent que l'effet antioxydant est dû à la présence de flavonoïdes et d'autre composé comme l'acide caféique et ses dérivés.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits de propolis de différentes localités de l'Ouest Algérien ont montré que la quantité en composés phénoliques ainsi que l'activité anti radicalaire par le test de DPPH dépendent de la situation géographique et la flore locale de chaque région d'étude (**Debab, et al 2017**).

La propolis de Beni Belaid, Jijel (Nord-est d'Algérie) possède un effet antioxydant très important réalisé par 4 méthodes différentes et les résultats de l'investigation chimique indiquent la présence des acides phénoliques tels que les acides coumarique, caféique, férulique et trans cinnamique qui considérés comme marqueurs de la propolis de type peuplier (**Segueni, et al 2017**).

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer in vitro l'activité antioxydante de la propolis

par piégeage de radicaux différents, comme les radicaux libres DPPH (diphénylpicrylhydrazyle) Bonvehí, et al (2011), les radicaux ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique) Ahn, et al (2007), les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) Laskar, et al (2010), les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Silva, et al (2011) et superoxydes O<sub>2</sub>• (**Russo, et al 2002**).

#### **I-4-2-Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne est l'une des activités biologiques de la propolis les plus étudiées, C'est l'activité la plus largement documentée ces dernières années en raison de la nécessité de découverte de nouveaux traitements contre les maladies infectieuses, en particulier avec l'augmentation de la résistance des agents pathogènes aux antibiotiques actuels.

##### **➤ Activité antibactérienne**

Les études en rapport avec l'activité antibactérienne de la propolis ont démontrée qu'elle est très active. En effet la propolis agit sur de nombreuses souches bactériennes Gram+ et Gram- (aérobie et anaérobie) Ordonez, et al (2011), cette activité est plus prononcée pour les souches Gram + (**Fokt, et al 2010**). Les différentes études suggèrent que la propolis et ses composés peuvent agir par plusieurs mécanismes tels que : l'inhibition de la croissance



bactérienne, le blocage de la division cellulaire, la désorganisation du cytoplasme, l'inhibition de la synthèse protéique ou l'inhibition du processus d'adhésion (**Mirzoeva, et al 1997**).

Parmi les bactéries dont la croissance est inhibée, on retrouve principalement des Staphylocoques (le plus généralement *S.aureus*) Lu, et al (2005), des Streptocoques (*S.mutans* et *S.sanguinis*) Koo, et al (2000) et des bacilles (*B.subtilis*) Joëlle Millet, et al (2006) pour les Gram+ et des *P.aeruginosa* Marcucci, et al (2001), *Listeriamonocytogenes* (Yang, et al 2006), *Escherichia coli* Darwish, et al (2013), *Porphyromonas gingivalis* (Santos, F. A. et al 2002) et *Helicobacter pylori* Banskota, et al (2001) pour les Gram negative.

Des travaux sur l'activité antibactérienne de la propolis algérienne ont révélé une activité importante sur *S. aureus* et les streptocoques  $\beta$  (et non hémolytique) et une faible activité sur les bacilles à gram négatif (**Segueni, et al 2014**).

Une étude de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis algérienne collectée de quatre différentes régions a été réalisée. Les résultats ont montré un effet positif contre les bactéries à gram positif. De plus une corrélation positive entre l'activité antimicrobienne et la composition chimique (teneur en polyphénols et flavonoïdes) a été observée (**Nedji, et al 2014**)

#### ➤ **Activité antifongique**

La propolis a une activité antifongique importante contre les germes appartenant au genre *Candida*, mais aussi contre les champignons de type *Aspergillus* Ota, et al (2001), *Mycosporum* ainsi que contre les levures (**Dalben-Dota, et al 2010**).

#### ➤ **Activité antivirale**

Les études ont montré que la propolis et ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus, adénovirus (**Schnitzler, et al 2010**). De plus, la propolis et certains de ses constituants (apigénine, chrysin) possèdent un effet prophylactique contre le virus de la grippe en atténuent les symptômes à travers une action antineuraminidase (**Liu, et al 2008**). La propolis du peuplier et l'un de ses principaux composés, l'ester phényléthylique d'acide caféique (CAPE) ont un potentiel anti-VIH (comme agent anti-intégrase du virus).

### **I-4-3-Activité anti-inflammatoire**

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les flavonoïdes de la propolis lui confère cette action anti-inflammatoire, utile dans les inflammations de la cornée, de la trachée, du pharynx ou dans l'arthrite rhumatoïdale (**Ramo, et al 2007**).

#### **I-4-4-Activité anesthésique**

La propolis avec ses composants est un très puissant anesthésique. Les études ont démontré que cette résine est trois fois plus anesthésiante que la cocaïne et 52 fois plus puissante que la procaine dans les tests sur les cornées de lapin (**Ghisalberti, 1979**). L'effet anesthésique serait dû à la pinocembrine, l'acide caféiques de la propolis et leurs esters (**Metzner, 1978**). Les propriétés anesthésiques ont été utilisées par l'homme depuis des siècles les plus reculés dans le cas des rages des dents. Un emplâtre dentaire a été mis en place et breveté en Pologne (**Sosnowski, 1984**).

#### **I-4-5-Activité cicatrisante et régénératrice**

La propolis a démontré qu'elle possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation, et la formation du collagène et au même temps répare l'épiderme abîmé (**Ghisalberti, 1979, Krell, R. 1996**).

#### **I-4-6-Activité anticancéreuse**

De très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées sur l'activité antitumorale de la propolis et de ses principaux constituants (**Li, et al. 2007, Szliszka, et al 2011, Valente, et al 2011**). Parmi les constituants de la propolis responsables de l'activité anticancéreuse, on retrouve les flavonoïdes tels que la chrysine, des dérivés de galangine et de catéchine Li, et al. (2010), Sha, et al (2009) des terpènes tels que des triterpènes Li, et al (2009), diterpènes contenus dans la propolis grecque Pratsinis, et al (2010) ou encore le CAPE (**Najafi, et al 2007, Lin, et al 2013**)

Dans une étude réalisée par Brihoum, et al (2018) l'effet antitumoral d'une propolis algérienne collectée de la région de Jijel contre la lignée cellulaire A549 (adénocarcinome pulmonaire humain) a été évalué. Cette propolis a montré une activité très intéressante. de plus elle pouvait bloquer l'adhésion des cellules par le fibrinogène.

#### **I-4-7- Activité anti-cholinestérase**

Les informations sur l'activité anti-cholinestérase de propolis sont très limitées, cependant on retrouve quelques articles concernant cette activité :

Baltas, et al (2016) ont évalué l'activité anti-cholinestérase des extraits de propolis turques. Le test a été réalisé par la méthode d'Ellman et les résultats obtenus ont montré des propriétés anti-cholinestérase pour les extraits de propolis les plus riches en composés polyphénoliques.

Orhan, et al (2007) ont testé l'activité inhibitrice contre acétylcholinestérase et Butyrylcholinestérase d'un certain nombre de flavonoïdes et d'acide phénolique. Parmi les composés testés seule la quercétine a présenté une inhibition contre l'AChE. Tandis que la génistéine, la lutéoline-7-O-rutinoside et la silibinine ont exercé une inhibition modérée de BChE.

#### **I-4-8- Autres activités**

D'autres propriétés biologiques ont été décrites pour la propolis tels que :

- Propriétés immunomodulatrice (**Orsatti, et al 2010**)
- Propriétés anti-ulcérales (**De Barros, et al 2007**)

#### **I-4-9- Effet indésirable (toxicité)**

La propolis n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si des quantités raisonnables de propolis sont consommées (**Ghisalberti, 1979**). Les doses recommandées ne doivent pas dépasser 2 g de la propolis extraite par jour (cette dose est déjà très importante si on tient compte de la dilution de cette résine dans les différentes productions). Cependant, il peut exister des cas d'allergies de contact (dermatose, eczéma) avec un allergène bien identifié : le CAPE (**Burdock, 1998**).

#### **I-5-Utilisation commerciale**

La propolis brute est collectée par les apiculteurs et vendue aux laboratoires pour faire les différents extraits qui serviront pour la fabrication de diverses gammes de produits. La majorité de produits à base de la propolis se fait avec des extraits alcooliques, glycoliques, aqueux, et huileux. Selon le solvant utilisé il est nécessaire le plus souvent de l'éliminer avec les restes des cires, des impuretés, pour que dans l'extrait final il ne reste autre chose que la résine balsamique avec ses principes actifs.

La majorité des produits commerciaux sont les compléments alimentaires, produit de soins (pastilles, tablettes, crèmes, baumes, suppositoires) et d'hygiène (shampooings, savons, dentifrice) ainsi que les préparations magistrales en pharmacie (suppositoires, onguent, emplâtres). Souvent la propolis est mélangée avec d'autres produits de la ruche pour lui rendre encore plus d'efficacité thérapeutique. Les pastilles, les sirops et propolis huileuse sont utilisés pour les problèmes de la gorge, du nez et refroidissement. Les sticks pour les boutons de fièvre, gerçures et crevasses sur les lèvres. Les propriétés antioxydants, antimicrobiennes et antifongiques sont mises en évidence dans toute la gamme des produits où la propolis est

ajoutée. Au Japon il est permis de rajouter la propolis pour la conservation des poissons surgelés.

## Références

- Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R. K., Tran, V. H., & Duke, C. C. (2012). Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry*, 77, 251-259.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383-1392.
- Alencar, S. M. D., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., ... & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 278-283.
- Alexandare, F. 1984. Apiculture Aujourd'hui. *Eds. Rustica, Paris*.
- Baltas, N., Yildiz, O., & Kolayli, S. (2016). Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup1), 52-55.
- Bankova, V. S., Popov, S. S., & Marekov, N. L. (1982). High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography A*, 242(1), 135-143.
- Bankova, V., & Kuleva, L. (1989). Phenolic compound of propolis from different regions of Bulgaria. *Animal Science*, 26,94–98.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., & Zamjansan, Z. (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23(1), 79-85.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A. G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(5-6), 530-533.
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.

- 
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2001). Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8(1), 16-23.
- Banskota, A. H., Nguyen, N. T., Tezuka, Y., Le Tran, Q., Nobukawa, T., Kurashige, Y., ... & Kadota, S. (2004). Secoisolariciresinol and isotaxiresinol inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent hepatic apoptosis in mice. *Life Sciences*, 74(22), 2781-2792.
- Bonvehí, J. S., & Gutiérrez, A. L. (2011). Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1387-1395.
- Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., ... & Van Antwerpen, P. (2014). Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2327-2345.
- Boutabet, K., Kessa, W., Alyane, M., & Lahouel, M. (2011). Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal of Nephrology*, 21(2), 101.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1).
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363.
- Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A., Montes De Oca Porto, R., Márquez Hernández, I., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2008). GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9927-9932.
- Challem, J. (1995). Medical journals document value of bee propolis, honey, and royal jelly. *Natural Foods Merchandiser*.
- Cao, Y. H., Wang, Y., & Yuan, Q. (2004). Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 59(1-2), 135-140.
- Castro, M. L., do Nascimento, A. M., Ikegaki, M., Costa-Neto, C. M., Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2009). Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(14), 5332-5335.

- 
- Çelemlı, Ö. G., Hatjina, F., Charistos, L., Schiesser, A., & Özkırım, A. (2013). More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(11-12), 429-438.
- Chen, C. N., Wu, C. L., Shy, H. S., & Lin, J. K. (2003). Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *Journal of Natural Products*, 66(4), 503-506.
- Chen, C. N., Hsiao, C. J., Lee, S. S., Guh, J. H., Chiang, P. C., Huang, C. C., & Huang, W. J. (2012). Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. *Natural product research*, 26(2), 116-124.
- Chi, J., Xue, B., & Chen, H. (1996). The chemical constituents of flavonoids from Liaoxi propolis. *Zhongguo yao xue za zhi (Zhongguo yao xue hui: 1989)*, 31(5), 264-266.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., & Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*, 20(06), 531-536.
- Crane, E. (1988) *Beekeeping: Science, Practice and World Recourses*. Heinemann London.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B. A., Ramírez-Apan, T., & Cárdenas, J. (2002). Polyisoprenylated Benzophenones In Cuban Propolis; Biological Activity Of Nemorosone §. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 372-378.
- Cvek, J., Medić-Šarić, M., Vitali, D., Vedrına-Dragojević, I., Šmit, Z., & Tomić, S. (2008). The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *Journal of apicultural research*, 47(1), 35-45.
- Dalben-Dota, K. F., Faria, M. G., Bruschi, M. L., Pelloso, S. M., Lopes-Consolaro, M. E., & Svidzinski, T. I. (2010). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(3), 285-290.
- Darwish, R. M., Ra'ed, J., Zarga, M. H. A., & Nazer, I. K. (2010). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(36).
- da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... & Dellagostin, O. A. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137-142.
- Dausch, A., Moraes, C. S., Fort, P., & Park, Y. K. (2008). Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 435-441.
- Dealey, C. (2008). *The care of wounds: A guide for nurses*. John Wiley & Sons.

- 
- Debab, M., Toumi-Benali, F., & Dif, M. M. (2017). Antioxidant activity of propolis of West Algeria. *Phytothérapie*, 15(4), 230-234.
- de Barros, M. P., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & de Andrade, S. F. (2007). Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 567-571.
- de Castro Ishida, V. F., Negri, G., Salatino, A., & Bandeira, M. F. C. (2011). A new type of Brazilian propolis : Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125(3), 966-972.
- Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G., & Ozer, B. (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research*, 108(1), 95-105.
- El Hady, F. K. A., & Hegazi, A. G. (2002). Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 386-394.
- Eric Debuyser. La propolis. Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante. Faculté de pharmacie, **1984**.
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 887-897.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A., & Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections ? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (1993). Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 48(9-10), 731-735.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis : a review. *Bee world*, 60(2), 59-84.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1987). The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography–mass spectrometry. *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences*, 232(1268), 249-272.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141-1148.
- Hegazi, A. G. (1998). Propolis an overview. *J. Bee Informed*, 5(5), 22-23.



- Hegazi, A. G., & El Hady, F. K. A. (2002). Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 395-402.
- Heller, W., & Forkmann, G. (1993). The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 399-425.
- Hernández, I. M., Fernandez, M. C., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68(6), 931-934.
- Inui, S., Shimamura, Y., Masuda, S., Shirafuji, K., Moli, R. T., & Kumazawa, S. (2012). A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), 1038-1040.
- Isidorov, V. A., Szczepaniak, L., & Bakier, S. (2014). Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry*, 142, 101-106.
- Ivanov, T. (1980). Composition and physico-chemical properties of propolis. *Zhivotnovudni Nauki*, 17(8), 96-103.
- Joëlle, M., Marie, C.M., & Monique, S. (2006). Chapitre 18 : Matières premières produites par l'abeille. 2- La propolis. In *Actifs et additifs en cosmétologie (3<sup>e</sup> Éd.)* ; Lavoisier ,338–350.
- Jusbin, O. S. (1996). Chemical Composition and application. *Bee Products*, 1, 25-26.
- Kartal, M., Kaya, S., & Kurucu, S. (2002). GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 905-909.
- Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., & Cury, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45(2), 141-148.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping* (No. 124). Food & Agriculture Org.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. (2004). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(1), 260-262.
- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233-237.
- Lavie, P. (1975). La propolis. Edition : Apimondia. *Bucharest*, 65, 63-71.
- Li, H., Kapur, A., Yang, J. X., Srivastava, S., McLeod, D. G., Paredes-Guzman, J. F., ... & Rhim, J. S. (2007). Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *International Journal of Oncology*, 31(3), 601-606.

- 
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(10), 5434-5440.
- Li, F., Awale, S., Zhang, H., Tezuka, Y., Esumi, H., & Kadota, S. (2009). Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1283-1287.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H., & Kadota, S. (2010). Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73(4), 623-627.
- Li, F., He, Y. M., Awale, S., Kadota, S., & Tezuka, Y. (2011). Two new cytotoxic phenylallylflavanones from Mexican propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(9), 1194-1196.
- Lin, H. P., Lin, C. Y., Liu, C. C., Su, L. C., Huo, C., Kuo, Y. Y., ... & Chuu, C. P. (2013). Caffeic Acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akt signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5264-5283.
- Liu, A. L., Wang, H. D., Lee, S. M., Wang, Y. T., & Du, G. H. (2008). Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), 7141-7147.
- Lu, L. C., Chen, Y. W., & Chou, C. C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 213-220.
- Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24(8), 1171-1179.
- Marchenay, P. (1977). *La propolis : histoire naturelle, arts et traditions populaires, emplois actuels*.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., ... & Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 105-112.
- Marquez Hernandez, I., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rosado Perez, A., Montes de Oca Porto, R., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2010). Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4725-4730.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70(06), 515-519.

- 
- Melliou, E., Stratis, E., & Chinou, I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece—Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *103*(2), 375-380.
- Metzner, J., & Schneidewind, E. M. (1978). Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Die Pharmazie*, *33*(7), 465-465.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, *152*(3), 239-246.
- Nagy, E., Papay, V., Litkei, G., & Dinya, Z. (1986). Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)*, *23*, 223-232.
- Najafi, M. F., Vahedy, F., Seyyedini, M., Jomehzadeh, H. R., & Bozary, K. (2007). Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology*, *54*(1), 49-56.
- Nedji, N., & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(6), 433-437.
- Negri, G., Marcucci, C., Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2000). Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *11*(5), 453-457.
- Nikolaev, A. B. (1978). Defending the bee town. *Remarkable, hive product: Propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. APIMONDIA standing commission on beekeeping technology and equipment, Bucharest.*
- Oliveira, A. P., França, H. S., Kuster, R. M., Teixeira, L. A., & Rocha, L. M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *16*(1), 121-130.
- Ordóñez, R. M., Zampini, I. C., Moreno, M. N., & Isla, M. I. (2011). Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microbiological Research*, *166*(7), 578-584.
- Orhan, I., Kartal, M., Tosun, F., & Şener, B. (2007). Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *62*(11-12), 829-832.
- Orsatti, C. L., Missima, F., Pagliarone, A. C., Bachiega, T. F., Búfalo, M. C., Araújo Jr, J. P., & Sforcin, J. M. (2010). Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2

- and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, 24(8), 1141-1146.
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44(9-10), 375-378.
- Papachroni, D., Graikou, K., Kosalec, I., Damianakos, H., Ingram, V., & Chinou, I. (2015). Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples from Cameroon and Congo. *Natural Product Communications*, 10(1), 1934578X1501000118.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Moura, F. F., & Ikegaki, F. F. M. (1999). Atividade biológica da própolis. *Revista OESP-Alimentação*, 27, 46-53.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502-2506.
- Pereira, A. S., Nascimento, E. A., & de Aquino Neto, F. R. (2002). Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(7-8), 721-726.
- Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., & Bankova, V. (2010). New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia*, 81(6), 509-514.
- Piccinelli, A. L., Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., De Simone, F., & Rastrelli, L. (2005). Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9010-9016.
- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Popova, M., Bankova, V., Chimov, A., & Silva, M. V. (2002). A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum* trees. *Apidologie*, 33(1), 87-88.
- Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., & Bankova, V. S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70(10), 1262-1271.
- Popova, M. P., Graikou, K., Chinou, I., & Bankova, V. S. (2010). GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3167-3176.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... & Bankova, V. (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126(3), 1431-1435.

- 
- Popravko, S. A., & Sokolov, I. V. (1980). Plant sources of propolis. *Pchelovodstvo*, (2), 28-29.
- Pratsinis, H., Kletsas, D., Melliou, E., & Chinou, I. (2010). Antiproliferative activity of Greek propolis. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 286-290.
- Ramos, A. F. N., & Miranda, J. D. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 697-710.
- Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., & Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2363-2370.
- Rushdi, A. I., Adgaba, N., Bayaqoob, N. I., Al-Khazim, A., Simoneit, B. R., El-Mubarak, A. H., & Al-Mutlaq, K. F. (2014). Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *SpringerPlus*, 3(1), 253.
- Russo, A., Longo, R., & Vanella, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, S21-S29.
- Salatino, A., Teixeira, É. W., & Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33-38.
- Silva, C. C. F. D., Salatino, A., Motta, L. B. D., Negri, G., & Salatino, M. L. F. (2019). Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis from Ceará state. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 309-318.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., & Braga, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 1-7.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K. H., & Reichling, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*, 24(S1), S20-S28.
- Segueni, N., Magid, A. A., Decarme, M., Rhouati, S., Lahouel, M., Antonicelli, F., ... & Hornebeck, W. (2011). Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Medica*, 77(10), 999-1004.
- Segueni, N., Benlabeled, K., Hassane, B., Moussaoui, F., Zelligui, A., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2014). Antibacterial activity of two Algerian propolis. *Inter. J. Pharmaceu. Sci. Rev.Res.*, 25: 106-110.
- Segueni, N., Zelligui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2016). Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S425-S428.

- Segueni N., Evren, D., Akkal, S., Beraat, Ö., & Rhouati, S. (2017) Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 1417-1423.
- Sha, N., Guan, S. H., Lu, Z. Q., Chen, G. T., Huang, H. L., Xie, F. B., ... & Guo, D. A. (2009). Cytotoxic constituents of Chinese propolis. *Journal of Natural Products*, 72(4), 799-801.
- Shrestha, S. P., Narukawa, Y., & Takeda, T. (2007). Chemical constituents of Nepalese propolis: isolation of new dalbergiones and related compounds. *Journal of Natural Medicines*, 61(1), 73-76.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A., & Alencar, S. M. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 313-316.
- Silva, V., Genta, G., Möller, M. N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., ... & Fierro, W. (2011). Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6430-6437.
- Sosnowski, L., & Mathewson, T. (1984). *U.S. Patent No. 4, 454,427*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Sun, L. P., Chen, A. L., Hung, H. C., Chien, Y. H., Huang, J. S., Huang, C. Y., ... & Chen, C. N. (2012). Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(47), 11748-11758.
- Sun, S., Liu, M., He, J., Li, K., Zhang, X., & Yin, G. (2019). Identification and determination of seven phenolic acids in Brazilian green propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules*, 24(9), 1791.
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., & Krol, W. (2011). Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*, 38(4), 941-953.
- Tamas, M., Marinescu, I., & Ionescu, F. (1979). Flavonoide le din muguri de plop, Stud. Cercet. *Biochim*, 22, 207-213.
- Teixeira, É. W., Negri, G., Meira, R. M., & Salatino, A. (2005). Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 85-92.



- 
- Tomás-Barberán, F. A., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., & Tomás-Lorente, F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, 34(1), 191-196.
- Tran, V. H., Duke, R. K., Abu-Mellal, A., & Duke, C. C. (2012). Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry*, 81, 126-132.
- Trusheva, B., Todorov, I., Ninova, M., Najdenski, H., Daneshmand, A., & Bankova, V. (2010). Antibacterial mono-and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 1-4.
- Usia, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2002). Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products*, 65(5), 673-676.
- Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L., & Carvalho, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 86-92.
- Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I., & Kujumgiev, A. (2000). Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(9-10), 790-793.
- Wiryowidagdo, S., Simanjuntak, P., & Heffen, W. L. (2009). Chemical composition of propolis from different regions in Java and their cytotoxic activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 180-183.
- Yang, H. Y., Chang, C. M., Chen, Y. W., & Chou, C. C. (2006). 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*, 86(6), 937-943.
- Zainullin, R. A., Kunakova, R. V., Gareev, V. F., Galyautdinov, I. V., Sadretdinova, Z. R., Muslimov, Z. S., & Odinokov, V. N. (2018). Flavanones and Flavones from Bashkir Propolis. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(5), 975-977.

# **Chapitre-II :**

# **Matériel et méthodes**



Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique. Les propolis étudiées proviennent de plusieurs régions : Constantine (CN), Boumerdès (BN), Mila (Chelghoum El Aid : CHN), Tébassa (TN) et Guelma (GN). (Tableau-5)

Notre travail s'intéresse à l'étude comparative de plusieurs propolis Algérienne, cette comparaison est réalisée en fonction de leur profil chimique et propriétés biologiques et plus particulièrement l'activité antioxydante.

Cette première partie de notre travail nous a permis de faire une première classification des propolis étudiées et de sélectionner les extraits les plus actifs pour l'investigation phytochimique.

**Tableau-5 : Différents échantillons de propolis**

<b>région</b>	<b>zone</b>	<b>Date de récolte</b>
<b>Constantine</b>	<b>Djebel ouahch</b>	<b>2012</b>
<b>Boumerdès</b>	<b>Bouzegza</b>	<b>2009</b>
<b>Mila</b>	<b>Ain mellouk</b>	<b>2013</b>
<b>Tébassa</b>	<b>Youkous</b>	<b>2009</b>
<b>Guelma</b>		<b>2010</b>

## **II-1-Présentation de la matière première**

Les échantillons de propolis étudiées ont été récoltés par des apiculteurs de différentes régions Algériennes entre 2009 et 2013. La récolte a été effectuée par le raclage des cadres ensuite les morceaux de propolis obtenus ont été rassemblés en petites boules afin de minimiser la surface de contact avec l'air, et donc limiter l'oxydation (Figure-16) . Par la suite, les boulettes ont été émiettées ou cassées en plus petits fragments pour procéder à l'extraction de la propolis. Le poids de la propolis varie entre 20 et 150g. La conservation des échantillons a été faite à l'abri de la lumière et de la chaleur.



**Figure-16 : Matière première**

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Propolis>

## II-2-Extraction de la propolis

L'extraction des substances bioactives de la propolis est réalisée par macération directement dans le solvant allant du solvant le moins polaire vers le solvant le plus polaire. Les solvants utilisés sont l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et enfin le méthanol. La propolis est additionnée de dix volumes de solvant de son poids c'est-à-dire 1g de propolis dans 10 ml de solvant. Le mélange est laissé pour macération pendant 24h. Enfin le mélange est filtré puis évaporé à sec sous vide. Cette opération est répétée 3 fois pour chaque solvant.

## II-3-Étude comparative

Les polyphénols sont une catégorie de molécules organiques largement répandus dans la propolis et le règne végétal. Leur rôle d'antioxydant naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs maladies.

Le but de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante de nos propolis par plusieurs techniques. De plus nous avons analysé les extraits les plus actifs par Chromatographie en phase liquide couplée à la masse (LC-MS).

### II-3-1-Dosage des polyphénols

- **Principe**

Le dosage des polyphénols a été effectué par méthode colorimétrique sur microplaque en utilisant le réactif de Folin-ciocalteu. Selon la méthode décrite par **(Muller, et al 2010)**.

En présence de phénol, le mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolibdique est réduit en oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques et possède une absorption maximale à 725 nm **(Waterhouse, 2002)**.

- **Mode opératoire**

Un volume de 20 µl de chaque extrait préparé dans le méthanol est mélangé à 100 µl de réactif de Folin (dilué dix fois dans l'eau distillée) puis 75 µl de bicarbonate de sodium (7.5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, l'absorbance de tous les extraits est mesurée par un spectrophotomètre UV- visible à 765 nm contre le blanc sans extrait.

- **Expression des résultats**

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon de l'acide gallique (25-200 µg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 1g d'extrait de propolis.

### II-3-2-Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé sur microplaque à 96 puits selon la méthode décrite par Topçu, G. et al. (2007) avec quelques modifications. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment ainsi des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. (Zhou, et al 2005).

- **Mode opératoire**

Le mélange de 50 µl de chaque extrait et 130 µl de méthanol sont ajoutés à 10 µl d'acétate de potassium ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) et 10 µl de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Après une incubation pendant 40 min l'absorbance du mélange obtenu est directement mesurée au spectrophotomètre UV- visible à 415 nm contre le blanc.

- **Expression des résultats**

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, réalisée par un standard étalon (la quercétine) à différentes concentrations (25-200 µg/ml) et les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par 1g d'extrait de propolis brute.

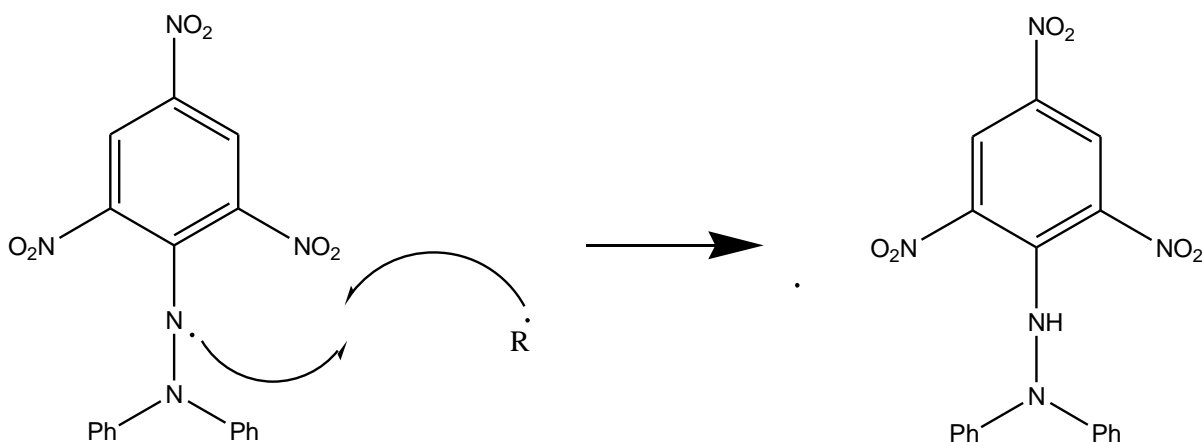
### II-3-3-Étude de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de propolis. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé cinq différents tests chimiques à savoir : l'effet (scavanger) d'un antioxydant sur le radical 2,2diphényl1-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le radical 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ABTS, le test du blanchissement du  $\beta$ -carotène, le test de la capacité antioxydante par réduction du fer (FRAP) qui mesure les pouvoir de réduction des ions de fer et enfin le test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC qui mesure les pouvoir de réduction des ions de cuivre.

### II-3-3-1- Test de l'activité antiradicalaire au DPPH

- **Principe**

L'activité antioxydante des extraits de la propolis est évaluée par balayage au radical DPPH afin de déterminer les propolis les plus actives. Le 1-1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl est défini comme un radical libre de couleur violette qui réagit avec des groupements qui peuvent donner un atome d'hydrogène ou un électron par exemple : les groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatique etc. Ceci provoque la forme réduite (1,1diphenyl-2- (2, 4,6-trinitrophenyl) hydrazine) avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle (**Figure-17**) (**Hatano, et al 1989**).



**Figure-17 : Structure du DPPH et de sa forme réduite**

- **Mode opératoire**

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Blois (1958). Dans un lecteur de microplaque à 96 puits on introduit 40 µl des différents extraits de propolis aux concentrations allant de 3 à 200 µg/ml auquel on ajoute 160 µl de la solution méthanolique de DPPH. Après agitation, le mélange est incubé à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme contrôle positif.

- **Expression des résultats**

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre DPPH est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH selon l'équation suivante :

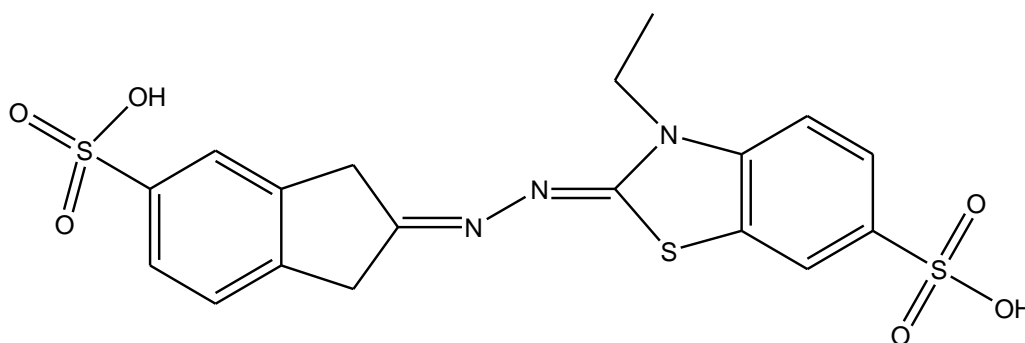
$$[\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = (\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{extrait}}) / \text{Abs}_{\text{DPPH}} \times 100]$$

Les IC<sub>50</sub> (la concentration des extraits nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH) sont calculées graphiquement par la régression linéaire des graphes représentant l'inhibition en fonction de différentes concentrations testées.

### II-3-3-2- Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS

- **Principe**

Le radical cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable sous sa forme libre (**Figure-18**). Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium. L'ajout d'antioxydants de type phénols, thiols, ou tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange (**Rice-Evans, et al 1994**). La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants.



**Figure-18 : Structure de l'ABTS**

- **Mode opératoire**

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS a été déterminée selon le procédé de Re, et al (1999). En pratique, une solution d'ABTS à 7 mM dans l'eau a été ajoutée à une solution de persulfate de potassium à 2.45 mM. Le mélange est agité puis placé à l'abri de la lumière pendant 12-16H pour former le radical cation ABTS<sup>+</sup>. Avant utilisation, la solution est diluée pour obtenir une absorbance de 0,70 ±0,02 à 734 nm. La solution obtenue est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante. 160 µl de la solution diluée de radical ABTS<sup>+</sup> est ajoutée à 40 µl des extraits des différents propolis aux concentrations allant de 3 à 200 µg/ml.

- **Expression des résultats**

Le pourcentage de réduction du radical ABTS<sup>+</sup> est calculé selon la formule ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = (\text{Abs}_{\text{ABTS}} - \text{Abs}_{\text{Extrait}} / \text{Abs}_{\text{ABTS}}) * 100$$

Les concentrations inhibitrices de 50 % (IC<sub>50</sub>) sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes représentant l'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés.

### II-3-3-3-Test du blanchissement du β-carotène

- **Principe**

Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène par l'acide linoléique qui attaque simultanément le β-carotène (décoloration) et ayant comme résultat le blanchissement de ce dernier et la disparition de sa couleur orange (Zargar, et al 2011).

- **Mode opératoire**

Une masse de 0.5 mg de β-carotène est dissoute dans 1 ml de chloroforme. La solution obtenue est introduite dans un ballon contenant 25 µl d'acide linoléique et 200 µl de Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous vide, 50 ml d'eau distillée saturée en oxygène est ajouté avec agitation vigoureuse pendant 30 minutes. 160 µl de l'émulsion résultante, sont transférés dans une microplaque à 96 puits contenant 40 µl des extraits des différentes concentrations de propolis (3 à 200 µg/ml). La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance chaque 30 min à 470 nm pendant 120 min. Le BHA et Le BHT ont été utilisés comme standards (Marco, 1968).

- **Expression des résultats**

L'activité antioxydante a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$AA (\%) = [1 - (A_{H0} - A_{Ht}) / (A_{C0} - A_{Ct})] \times 100$$

AA (%) : Activité antioxydante ;

A<sub>H0</sub> : Valeur de l'absorbance du β-carotène en présence de l'extrait mesurée à t=0

A<sub>C0</sub> : Valeur de l'absorbance du β-carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=0

A<sub>Ht</sub> : Valeur de l'absorbance du β-carotène en présence de l'extrait mesurée à t=120 min

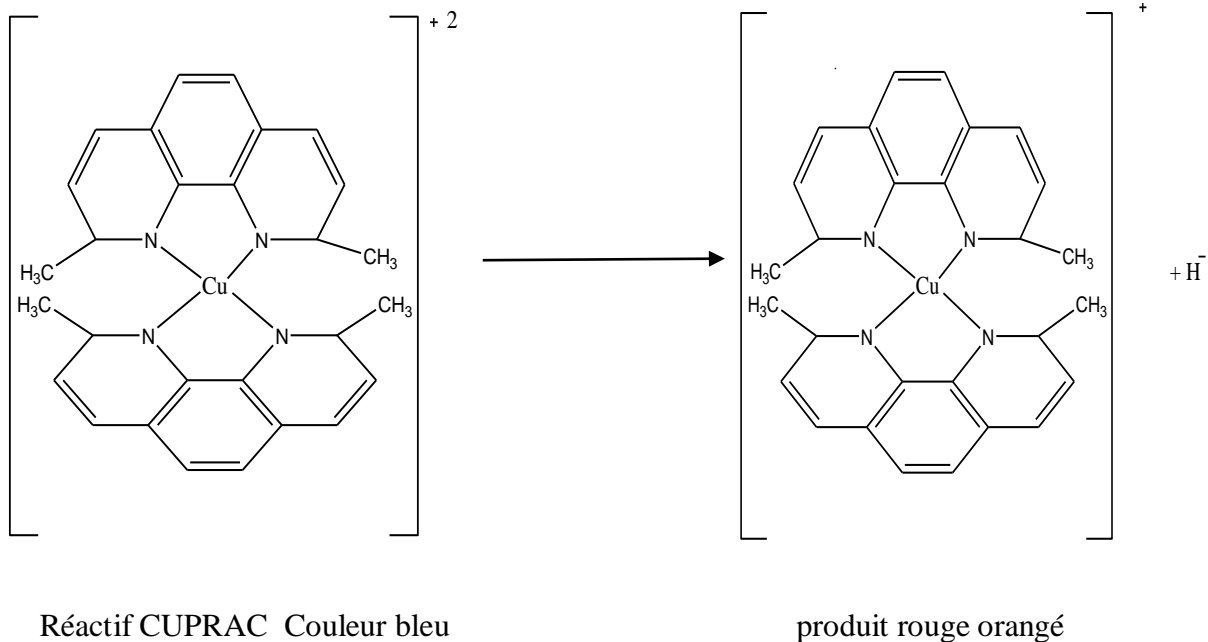
A<sub>Ct</sub> : Valeur de l'absorbance du β-carotène en présence de contrôle négatif mesurée à t=120 min

### II-3-3-4- Test de la Réduction du cuivre (CUPRAC)

- **Principe**

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproéne (NC), cuivre (Cu<sup>+2</sup>) Nc2-Cu<sup>+2</sup>. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproéne est réduit

(Figure-19). Cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak, et al 2004). Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe  $\text{Cu}^{+2}$ -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de  $\text{Cu}^{+2}$ -Nc qui absorbe à 450 nm.



**Figure-19 : La réduction du complexe  $\text{Cu}^{+2}$ -Nc**

- **Mode opératoire**

La réduction du cuivre (CUPRAC) a été déterminée par la méthode décrite par Apak, et al (2004). Une solution est préparée avec le mélange des volumes de 50  $\mu\text{l}$   $\text{CuCl}_2$ . Ensuite 50  $\mu\text{l}$  néoprène, 60  $\mu\text{l}$  de solution tampon  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ont été ajoutés suivi de 40  $\mu\text{l}$  des extraits testées à différentes concentrations pour atteindre un volume final de 200  $\mu\text{l}$ . Les microplaques de 96 puits ont été ensuite incubées pendant 1 h à l'abri de la lumière. Enfin l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et du BHT.

- **Expression des résultats**

Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,5 d'absorbance.

### II-3-3-5-Test de la réduction du Fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

- **Principe**

Cette méthode a été développée pour mesurer le potentiel des extraits à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le complexe en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ) par les antioxydants qui se traduit par l'apparition d'une couleur bleue (OU, et al 2001).

- **Mode opératoire**

L'activité de réduction du fer a été déterminée par la méthode décrite par Oyaizu (1986) avec une légère modification. 10 µl de chaque extrait sont mélangés avec 40 µl de tampon phosphate (pH 6.6) et 50 µl d'une solution de potassium ferricyanide (1%). Après une incubation à 50°C pendant 20min, 50 µl d'acide trichloracétique TCA (10%), 40 µl H<sub>2</sub>O et 10 µl de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (0.1%) ont été ajoutés. La lecture des absorbances a été réalisée à 700nm.

- **Expression des résultats**

Les résultats ont été calculés à titre de A<sub>0.5</sub> (µg / ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

### **II-3-4-Étude de l'activité anti-cholinestérase**

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été étudiées selon la méthode décrite par Ellman, et al (1961) avec une légère modification. L'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats et le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour la mesure de ces activités.

Brièvement, 150 µl de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0), 10 µl d'une solution d'échantillon dissoute dans de l'éthanol à différentes concentrations et un volume de 20 µl de l'AChE (5.32-10<sup>-3</sup> U) ou BChE (6.85-10<sup>-3</sup> U) ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 25°C<sup>0</sup>. Puis 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 10 µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle. Cet anion résulte de la réaction de DTNB avec la thiocholine. Cette dernière est libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine. La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 412 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule  $(E - S) / E \times 100$ , où E est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai, et S est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test. Les expériences ont été réalisées en triple. La galantamine a été utilisée comme composé de référence.



### II-3-5-Chromatographie en phase liquide couplée à spectrométrie de masse (LC/MS)

Parmi les différentes méthodes chromatographiques existantes, la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour analyser les extraits de propolis les plus actifs.

- **Définition**

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) combine deux approches pour séparer et recenser des molécules ou des composés présents dans un échantillon. La chromatographie liquide de haute performance (HPLC) sépare des composants du mélange, alors que la spectrométrie de masse (MS) offre les outils de dépistage pour les recenser et les identifier.

- **Composition**

Un système LC-MS est constitué de deux composants (**Figure -20**) :

- un appareil de chromatographie liquide
- un spectromètre de masse.



**Figure-20 : Appareil LC-MS**

- **Mode opératoire**

Les extraits actifs ont été analysés par LC-MS. L'analyse HPLC a été effectuée en utilisant l'instrument Thermo Scientific - Dionex Ultimate 3000 -TSQ Quantum. La colonne utilisée pour la séparation chromatographique est de type ODS Hypersil 250×4.6 mm, 5µm. le débit était 0.7 ml.min<sup>-1</sup>.

Les phases mobiles utilisées sont l'eau mélangée avec de l'acide formique à 0,1% (éluant A) et le méthanol (éluant B). Le gradient linéaire appliqué est de : 0-1 min, 100% de A ; 5-20

min, 95% de A ; 1-22 min, 5 % de A, 25min, 5% de A et enfin 30min, 0% de A. Le volume d'injection dans le système HPLC est de 20 µl. Les extraits ont été préparés à une concentration de 1mg/ml.

### **II-3-6- Étude statistique**

Les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols totaux et l'activité antioxydante des différents extraits de propolis ont été quantifiés en utilisant des méthodes adaptées au dosage sur plaque à 96 puits. Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type et soumis à des analyses statistiques à l'aide du logiciel SPSS (version 20.0) et origine 8. Pour l'analyse de la variance le test (ANOVA) a été réalisé suivi des tests post-hoc de Tuckey et Bonferroni pour analyser les différences significatives entre les différents traitements. Les valeurs sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05(<0.05). Les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) ont été calculés en utilisant le logiciel Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

### **II-4-Étude phytochimique**

L'étude comparative réalisée dans la première partie de notre travail nous a permis de sélectionner la propolis ainsi que les extraits les plus actifs pour la suite de notre travail.

Dans la deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de la propolis de Constantine et plus particulièrement l'extrait acétate d'éthyle qui possède une activité antioxydante très importante.

#### **II-4-1-Extraction**

L'extraction des substances bioactifs de la propolis de Constantine a été réalisée comme suit (**Figure -21**)

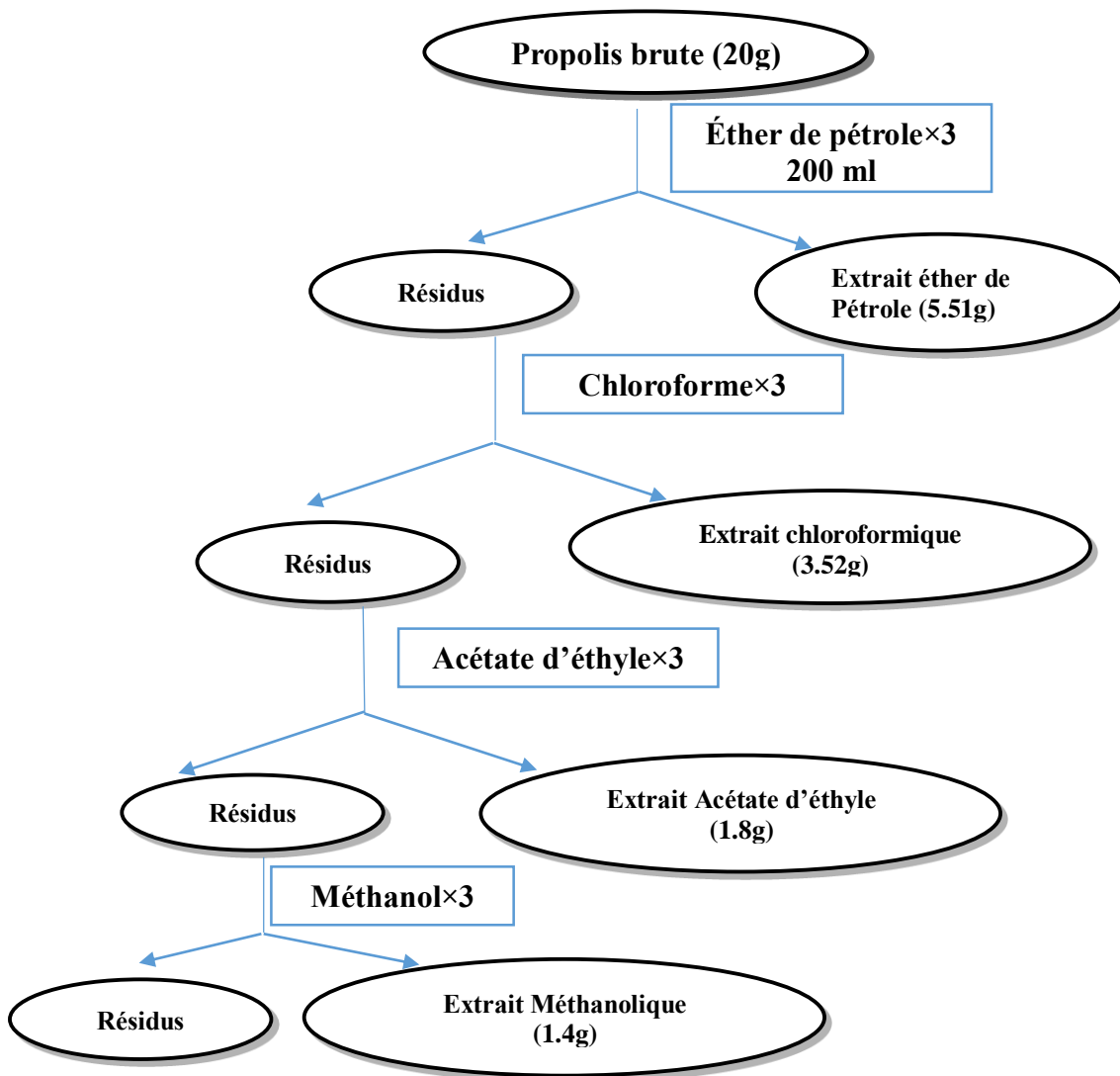


Figure-21 : Protocole d'extraction de la propolis

## II-4-2-Méthode de séparation de l'extrait acétate d'éthyle

### II-4-2-1- Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait acétate d'éthyle (**1.8g**) est dissout dans du méthanol et mélangé à une petite quantité de gel de silice. L'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène puis déposé sur une colonne de gel de silice. Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser comme système d'élution **dichlorométhane / Acétate d'éthyle/Méthanol** en gradient de polarité en commençant par du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à 100% et en terminant par le Méthanol à 100%. Cela permis de regrouper les fractions identiques vu la

similarité de leur profil chromatographique sur couche mince. Les plaques sont visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau-6** :

**Tableau-6 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle.**

N° de fraction	%		Observation
	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	
1-16	100	0	Trace des produits + Graisses et cires
17-19	100	0	Mélange séparable
20-23	100	0	Mélange séparable
24	100	0	Mélange séparable
25-26	100	0	Formation d'un précipité
27-30	100	0	Mélange séparable
31-39	75	25	Mélange complexe
40-51	50	50	Mélange complexe
52-61	25	75	Mélange complexe
62-70	0	100	Mélange complexe

Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leur profil chromatographique dans le système dichlorométhane / acétate d'éthyle avec différents pourcentages.

L'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions obtenues a permis de les regrouper en 13 sous fractions. Le tableau-7 représente ce rassemblement.

**Tableau-7 : Regroupement des fractions de la phase acétate d'éthyle.**

Fractions	Observation
f1 (1-6)	Trace des produits + Graisses et cire
f2 (8-10)	Trace des produits + graisses et cire
f3 (11-12)	Trace des produits + graisse et cire
f4 (13-16)	Trace des produits + graisse et cire
f5 (17-19)	Mélange séparable
f6 (20-23)	Mélange séparable
f7 (24)	Mélange séparable
f8 (25-26)	Formation d'un précipité

f9 (27-30)	Mélange séparable
f10 (31-39)	Mélange complexe
f11 (40-51)	Mélange complexe
f12 (52-61)	Mélange complexe
f13 (62-70)	Mélange complexe

#### II-4-2-2-L'étude des fractions f6 et f7

Les fractions F6 et F7 sont presque identiques. Elles ont été réunies en une seule fraction (**155mg**). Le mélange est déposé sur une colonne de sephadex LH-20 puis éluée par le système n-hexane / dichlorométhane/Méthanol (2 :1 :1). Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM analytique. Le résultat de la progression de cette colonne est illustré sur le tableau-8.

**Tableau-8 : Regroupement des sous fractions du f6, f7.**

Fractions	Sous fraction	Observation
1	S <sub>f1</sub>	Trace des produits
2-3	S <sub>f2</sub>	Mélange complexe
4	S <sub>f3</sub>	Monotache (dans le système n-hexane 8 : AcOet 2)
5-10	S <sub>f4</sub>	Mélange complexe
11-12	S <sub>f5</sub>	Mélange séparable
13-21	S <sub>f6</sub>	Monotache (dans le système n-hexane 8 : AcOet 2)
22-33	S <sub>f7</sub>	Mélange complexe
34-50	S <sub>f8</sub>	Mélange séparable

Parmi les sous-fractions recueillies, seules les sous-fractions S<sub>f3</sub>, S<sub>f5</sub>, S<sub>f6</sub> et S<sub>f8</sub> ont été étudiées. La plaque analytique de la sous fraction S<sub>f3</sub> donne un seul spot de couleur jaune après la révélation. On remarque aussi au niveau de cette même sous fraction la formation d'un précipité sous forme des cristaux de couleur blanc appelé composé **PCA1 (9.8mg)**.

Le profil CCM de la sous fraction S<sub>f5</sub> montre des taches de couleur jaune après révélation. La pureté de ces produits a été contrôlée par CLHP-C18 semi-préparative. L'éluion est réalisée par le système n-hexane/acétate d'éthyle (8:2) pour donner le produit **PCA2 (8.5mg)**.

La sous fraction  $S_{f6}$  renferme un précipité blanc insoluble dans le chloroforme. Ce précipité est récupéré puis recristallisé dans le chloroforme. Ce précipité soluble dans l'acétone est appelé composé **PCA3 (6.7mg)**.

La sous fraction  $S_{f8}$  a été séparés par CLHP-C18 semi-préparative avec le système n-hexane/acétate d'éthyle (7.5 :2.5) pour donner le composé **PCA4 (3.9mg)**.

#### II-4-2-3-L'étude de la fraction f8

Comme signalé précédemment, au cours du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons constaté la formation d'un précipité jaune que nous avons immédiatement récupéré, filtré et rincé par le mthanol pour obtenir un produit pur sous forme d'une poudre jaune **PCA5 (10.4mg)**.

#### II-4-2-4-L'étude des fractions f9 et f10

Les fractions  $f9+f10$  (**189mg**) ont été réunies pour subir une séparation sur une colonne de sephadex LH-20 à l'aide d'un mélange n-hexane / dichlorométhane/Méthanol (2 :1 :1) pour donner naissance au composé **PCA6 (9.3mg)**.

La sous fraction  $S'_{f4}$  a été ensuite séparée par HPLC semi-préparative. L'appareil utilisé est de tye JASCO équipé d'un détecteur ultraviolet JASCO UV-975, d'une pompe Pu-980 et d'une colonne de type Waters Kromasil Si 5 mm (10 mm x 250 mm). La séparation a été réalisée en utilisant un gradient de n-hexane/acétate d'éthyle (7:3) pour donner un mélange des deux produits **PCA7 et PCA8 (10.7mg)**.

Les sous fractions obtenus sont regroupés dans le tableau-9.

**Tableau-9-Regroupement des sous fractions du f9 et f10.**

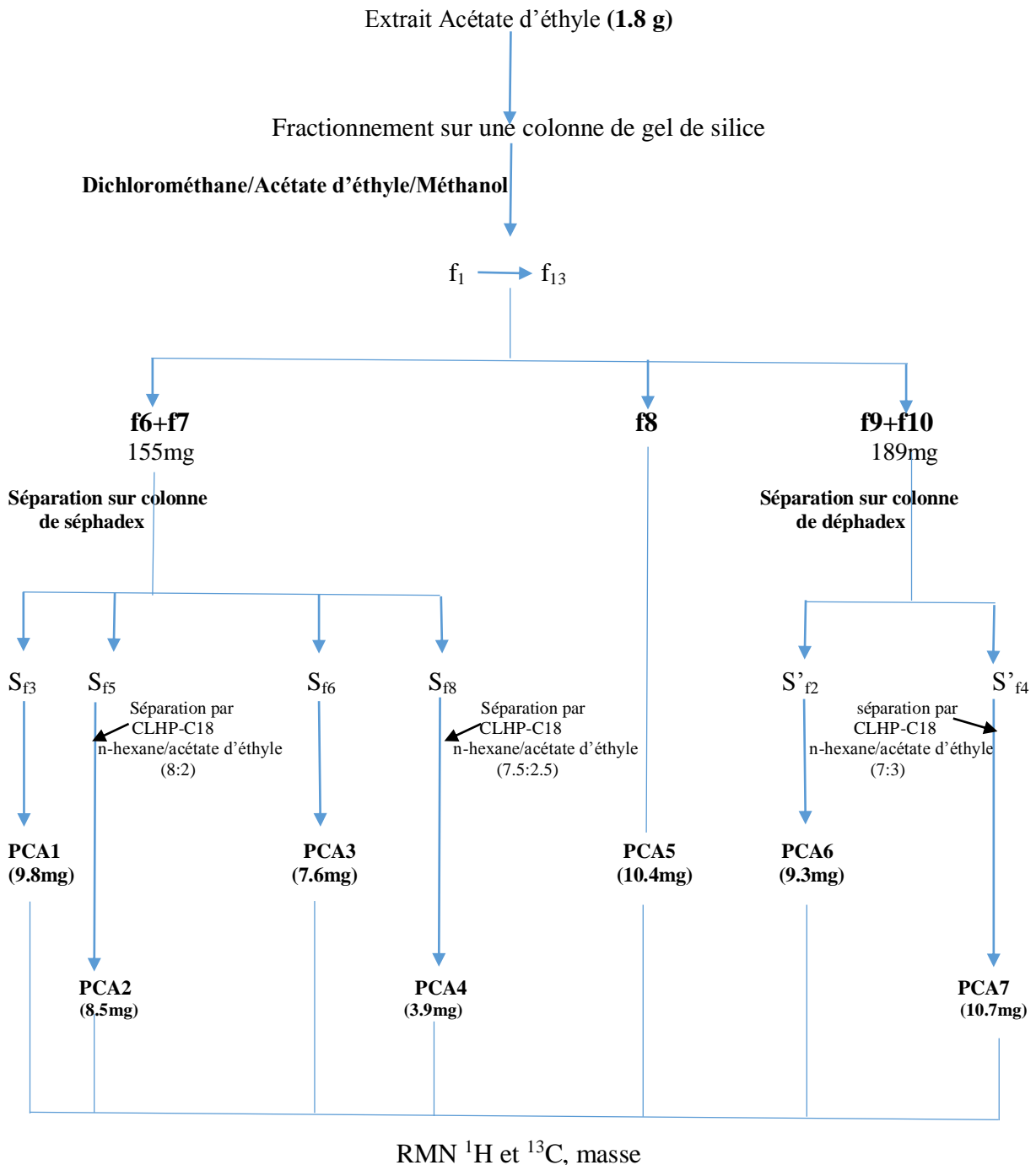
Fractions		Observation
1-2	$S'_{f1}$	Trace des produits
3	$S'_{f2}$	Monotache (dans le système n-hexane 7 : AcOet 3)
4-13	$S'_{f3}$	Mélange complexe
11-12	$S'_{f4}$	Mélange séparable
14-16	$S'_{f5}$	Mélange séparable
17-18	$S'_{f6}$	Trace des produits
19-26	$S'_{f7}$	Mélange complexe
27-31	$S'_{f8}$	Mélange séparable
32	$S'_{f9}$	Trace des produits
33-38	$S'_{f10}$	Mélange complexe
39-51	$S'_{f11}$	Mélange complexe

52-58	S' f12	Mélange complexe
59-111	S' f13	Trace des produits

**Remarque**

Toutes les plaques ont été révélées par le révélateur (acétone/H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (50%/16%/4%).

Le schéma récapitulatif suivant présente tous les composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle.



**Figure-22 : Récapitulatif des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle.**

### II-4-3- L'identification spectrale des composés isolés

Les composés séparés ont été identifiés en utilisant les techniques suivantes :

#### II-4-3-1-spectrophotométrie UV-visible

Le spectrophotomètre est un appareil permettant de mesurer l'absorbance d'une solution pour différentes longueurs d'ondes. Pour cela, il fait passer un rayon d'une longueur d'onde choisie à travers une cuve contenant la solution à étudier. Les molécules de la solution absorbent plus ou moins le rayon lumineux. On définit alors l'absorbance pour cette longueur d'onde. La spectrophotométrie UV-Visible, reste une technique essentielle pour l'identification des flavonoïdes. Les spectres sont réalisés en présence de méthanol puis dans divers réactifs (NaOH, AlCl<sub>3</sub>, HCl, NaOAc, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

#### II-4-3-2-Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique non destructrice capable de donner des informations sur la structure chimique des composés. Elle est généralement employée pour un composé purifié afin d'obtenir sa structure précise à l'aide des spectres RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et 2D (COSY, HMQC, HMBC, NOESY, etc.).

#### II-4-3-3-Spectrométrie de masse en injection directe

La spectrométrie de masse en injection directe (ou infusion) est une technique analytique très puissante et très sensible permettant d'analyser des composés organiques solides, liquides ou gazeux. Elle permet de déterminer la masse moléculaire, de corréler le spectre d'un composé avec sa structure, d'expliquer des mécanismes de ruptures de liaisons.

Un spectromètre de masse est constitué de :

- Système d'introduction de l'échantillon
- Source d'ions ou chambre d'ionisation
- Analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge
- Détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur



## Références

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., MORI, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., ... & OKUDA, T. (1989). Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(8), 2016-2021.
- Marco, G.J., A (1968), rapid method for evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc*, 45, 594-598.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr*, 44(6), 307-315.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1994). [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. In *Methods in Enzymology* (Vol. 234, pp. 279-293). Academic Press.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), I1-1.
- Zhou, X., Peng, J., Fan, G., & Wu, Y. (2005). Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of Chromatography A*, 1092(2), 216-221.
- Zargar, M., Azizah, A. H., Roheeyati, A. M., Fatimah, A. B., Jahanshiri, F., & Pak-Dek, M. S. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of different extracts from *Vitex negundo* leaf. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2525-2532.

# **Chapitre-III:**

## **Résultats et discussion**

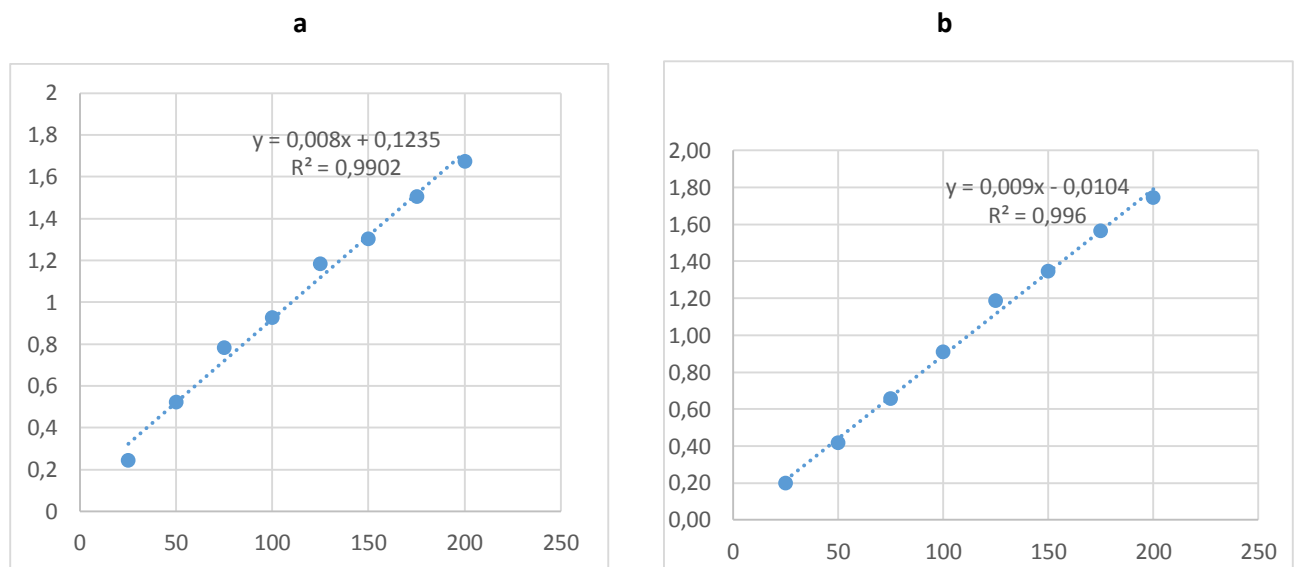
### III-1-Étude comparative de quelque propolis algérienne

Cinq propolis collectées dans différentes zone géographiques du Nord algérien ont été étudiés dans la présente étude. Ces propolis proviennent de Constantine (CN), Boumerdès (BN), Chelghoum El Aid située dans la wilaya de Mila (CHN), Tébassa (TN) et Guelma (GN).

Dans cette partie de notre travail nous nous sommes intéressés à l'étude comparative des propolis citées précédemment. Cette comparaison est réalisée en fonction de leur profil chimique représenté par le taux des polyphénols et des flavonoïdes et leur activité antioxydante. La composition chimique des différents extraits actifs a aussi été déterminée par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse LC-MS.

#### III-1-1-Dosage des polyphénols et flavonoïdes

Les teneurs en composés phénoliques (TPC) et en flavonoïdes (TFC) ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage ( $y=0.008[EGA] + 0.1235$  ;  $r^2 : 0.9902$ ) et ( $y=0.009[EQ] + 0.0104$  ;  $r^2 : 0.996$ ) et exprimées en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de quercétine par 1g d'extrait de propolis (EAG mg/ g et EQ mg/g) respectivement (**Figure-23**).



a : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

b : Courbe d'étalonnage de la quercétine

**Figure-23 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine**

Les TPC et TFC des différents extraits de propolis testés représentés dans le tableau-10 varient significativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction et de la zone géographique de la propolis récoltée.

**Tableau-10 : Teneur en flavonoïdes et en polyphénols**

Extrait	CN		CHN		BN		TN		GN	
	TPC	TFC	TPC	TFC	TPC	TFC	TPC	TFC	TPC	TFC
<b>EP</b>	13,35±1,38	7,78±0,41	9,89±0,23	7,85±0,10	15,6±0,82	6,22±0,20	ND	ND	ND	ND
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	112,27±3,67	64,41±1,93	80,43±2,81	51,19±2,16	48,22±1,53	18,26±1,06	ND	ND	ND	ND
<b>AcOet</b>	153,27±12,96	72,78±0,10	93,18±6,54	69,19±0,36	68,93±1,07	27,41±0,59	ND	ND	ND	ND
<b>MeOH</b>	233,72±9,25	73,26±2,98	104,89±4,47	42,15±1,88	120,47±3,77	48,45±1,36	27,68±1,23	22±0,36	ND	ND

**NB** : les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Constantine (CN), Boumerdès (BN), Mila (CHN), Tébassa (TN) et Guelma (GN).

EP : extrait éther de pétrole

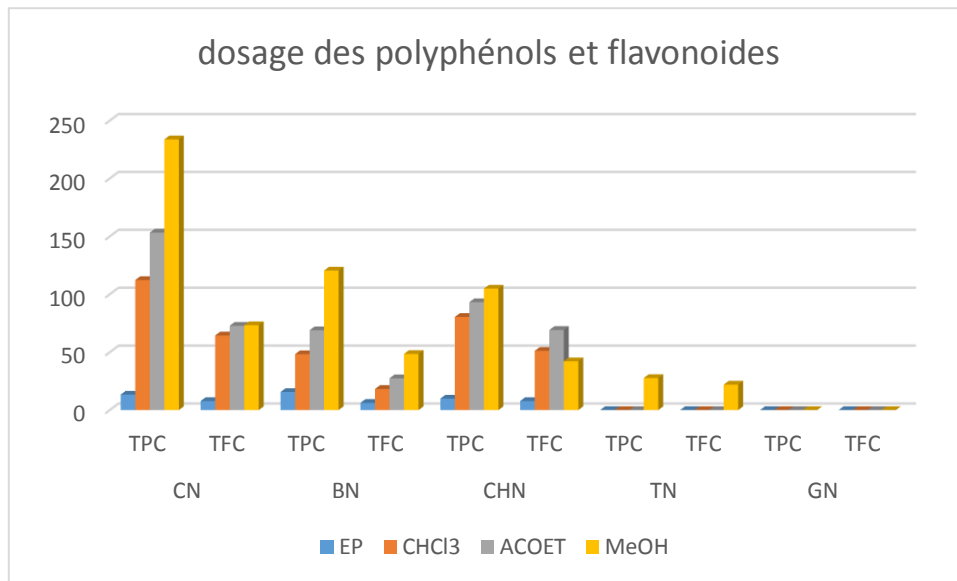
CHCl<sub>3</sub> : extrait chloroformique

AcOet : extrait acétate d'éthyle

MeOH : extrait méthanolique

Les résultats obtenus varient entre  $9.89 \pm 0.23$  et  $233,72 \pm 9,25$  mg EGA/ g pour le TPC et entre  $6,22 \pm 0,20$  et  $73,26 \pm 2,98$  mg EQ / g pour le TFC. L'extrait méthanolique de la propolis de Mila (Chelghum El Aid) montre la teneur la plus faible. Comparé aux autres extraits testés l'extrait méthanolique montre une meilleure richesse en polyphénols et en flavonoïdes. L'extrait éther de pétrole présente les teneurs les plus faibles. Les TPC et TFC des différents extraits testés ont diminué dans l'ordre suivant : extrait méthanolique > extrait acétate d'éthyle > extrait chloroformique > extrait éther de pétrole. Il est important de noter que ces classes de composés n'ont pas été détectées dans la propolis de Guelma. Ces composés sont présents uniquement au niveau de l'extrait méthanolique de la propolis de Tébessa.

Concernant l'influence de la zone géographique sur les TPC et TFC étudiés. Nos résultats indiquent que les différences sont significatives. Les extraits de la propolis de Constantine présentent des teneurs largement supérieures aux teneurs des autres propolis suivie par les propolis de Mila et Boumerdès (**Figure-24**).



Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Constantine (CN), Boumerdès (BN), Mila (CHN), Tébassa (TN) et Guelma (GN).

EP : extrait éther de pétrole

CHCl3 : extrait chloroformique

AcOet : extrait acétate d'éthyle

MeOH : extrait méthanolique

**Figure-24 : Dosage des flavonoïdes et des polyphénols**

Nos résultats sont en accord avec une étude comparative réalisée par Piccinelli, et al (2013) sur de nombreuses propolis Algérienne. Cette étude a montré la présence de deux types de propolis en Algérie : un premier type de propolis riche en composés polyphénoliques et un second type riche en composé diterpéniques.

La comparaison des teneurs en polyphénols totaux des propolis testées avec celles rapportées dans la littérature montre qu'elles sont très proches. En effet, une étude réalisée par Nedji, et al (2014) sur quatre propolis collectées dans le Nord Algérien a montré que la teneur en polyphénols varie entre 100.90 et 257.40 mg GAE/g.

Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Mouhoubi, et al (2016) (71.72-5351.22 mg GAE / 100 g et 124,76-4946.53 mg QE / 100g pour les propolis collectées de Bejaia et Oued ghir ), Debab, et al (2017) ( $180.30 \pm 0.72$ - $220.44 \pm 7.05$  mg GAE/6 g et  $137.08 \pm 10.01$ - $163.68 \pm 0.73$  mg QE/6g pour neuf propolis), Segueni, et al (2017) ( $0.81 \pm 0,16$ - $8.97 \pm 0.25$  GAE mg/g et  $0.57 \pm 0.01$ - $3.53 \pm 0.84$  QE mg/g pour la propolis collectée de Beni Belaid) et Deghbar, et al (2019) ( $210.50 \pm 22.45$  mg GAE/g et  $16.4 \pm 3.4$  mg QE/g) pour la propolis collectée à El Bayadh dans le Nord-Ouest Algérien).

Dans une étude réalisée par Hochheim, S et al (2018) sur la propolis Brésilienne, les teneurs en TPC et TFC obtenus sont inférieurs à ceux rapportés dans la présente étude. Par contre, nos résultats sont inférieurs aux taux des propolis récoltées en Turquie Sarikaya, et al

(2009) ont rapporté 313 mg GAE / g et 522,71 mg QE / g pour les teneurs en TPC et TFC respectivement. Hernandez Zarate, et al (2018) ont testé les extraits de 11 propolis Mexicaines. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes été de 13-379 mg QE / g et 68-500 mg EAC (équivalent acide caféique)/ g de propolis respectivement.

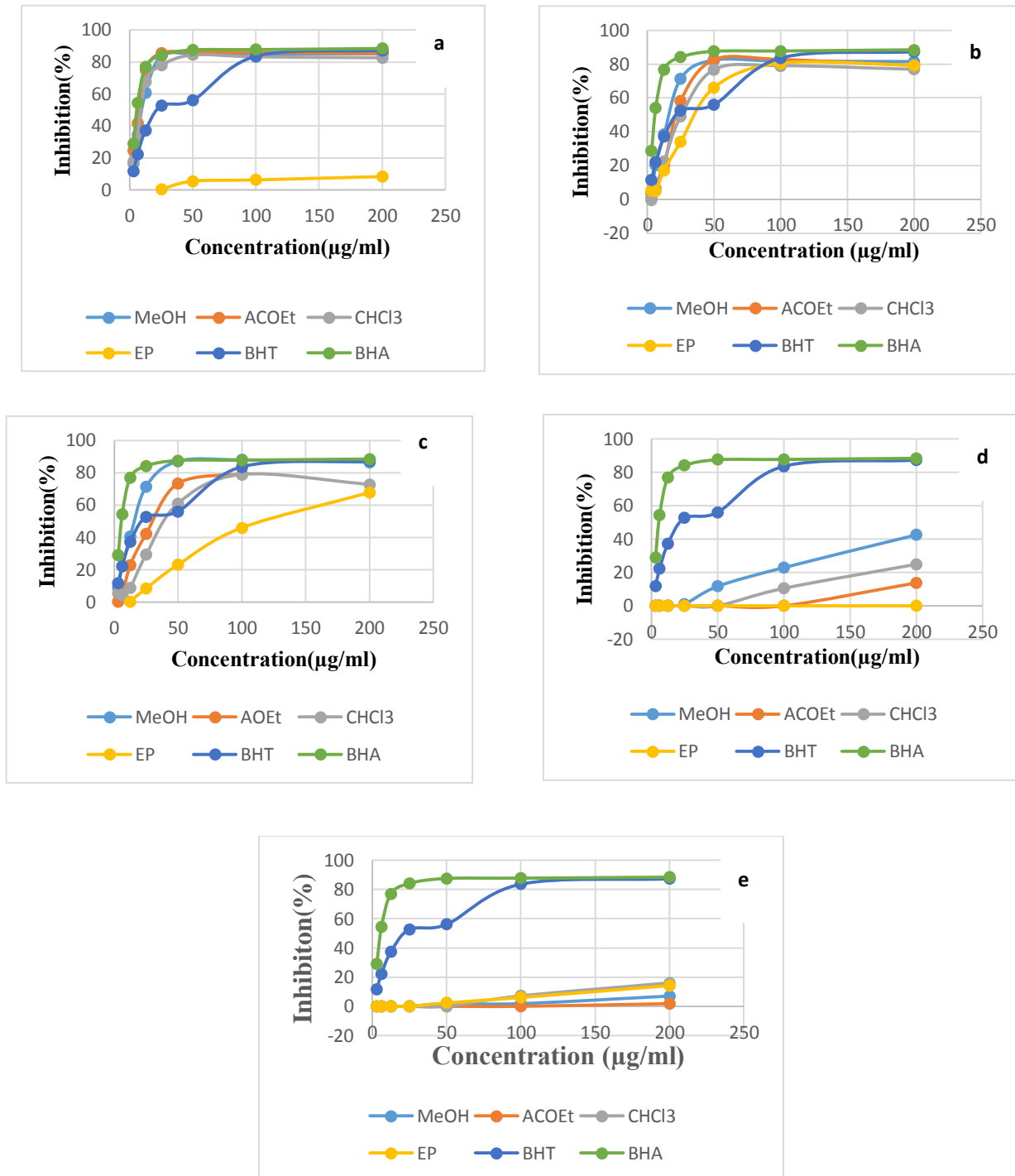
### III-1-2- Étude de l'activité antioxydante

Nous nous sommes intéressés à l'activité antioxydante des propolis algérienne. Cette activité est considérée par de nombreux auteurs comme un critère de classification des propolis dans le monde. Cette étude nous permettra de sélectionner les extraits les plus actifs pour des études plus approfondis. L'effet antioxydant a été évalué par la combinaison de cinq techniques complémentaires.

#### III-1-2- 1-Test de l'activité antiradicalaire au DPPH

Le radical DPPH, est l'un des substrats les plus utilisés pour une évaluation directe, rapide et fiable de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité et de la simplicité de l'analyse. Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes présentant l'absorbance des différents extraits ainsi que celle des deux standards BHA et BHT en fonction des concentrations testées avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction du DPPH en sa forme non radicalaire.

Les résultats illustrés dans la **figure-25** montrent que les différents extraits présentent une activité antiradicalaire importante. L'ensemble des extraits analysés et étudiés ont éliminés presque 90% des radicaux libre, à l'exception des extraits des propolis de Tébessa et de Guelma et l'extrait éther de pétrole de la propolis de Constantine qui n'a pu réduire que 10% des radicaux libres.



a : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Constantine  
 b : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Mila  
 c : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Boumerdes  
 d : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Tébessa  
 e : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Guelma

**Figure-25 : Courbes d’inhibition du radical DPPH par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations**

Afin d’établir une comparaison entre les différents extraits testés les IC<sub>50</sub> de chaque extrait ont été déterminé (Tableau-11).



**Tableau-11 : Valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits de la propolis par le test DPPH**

Extrait	IC <sub>50</sub> µg/mL(DPPH)				
	CN	CHN	BN	TN	GN
MeOH	10,33±0,26	17±0,24	16,62±0,27	>200	>200
AcOet	7,91±0,67	22,31±0,62	32,03±2,03	>200	>200
CHCl <sub>3</sub>	9,26±0,33	29,48±0,94	41,52±0,35	>200	>200
EP	>200	37,49±0,44	132,30±0,66	>200	>200
BHT	22,32±1,19	22,32±1,19	22,32±1,19	22,32±1,19	22,32±1,19
BHA	5,73±0,41	5,73±0,41	5,73±0,41	5,73±0,41	5,73±0,41

Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Constantine (CN), Boumerdès (BN), Mila (CHN), Tébassa (TN) et Guelma (GN).

EP : extrait éther de pétrole

CHCl<sub>3</sub> : extrait chloroformique

AcOet : extrait acétate d'éthyle

MeOH : extrait méthanolique

Les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés varient significativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction. L'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine est l'extrait le plus actif (7.97±0.95µg/ml) suivi par les extraits méthanoliques des propolis de Boumerdès et de Mila avec des IC<sub>50</sub> de 16.62±0.27 et 17±0.24 µg/ml respectivement. L'extrait éther de pétrole de la propolis de Boumerdès montre la plus faible activité (132.30.±0.66µg/ml). Le BHA et le BHT utilisé comme standard dans ce travail ont montré une activité anti-radicalaire puissante avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 5.73±0.41 et 22.32±1.19 µg /ml respectivement.

Nos résultats indiquent que la propolis de Constantine présente l'activité antiradicalaire la plus intéressante avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> allant de 7.91 ± 0.67 à 10.03 ± 0.26 µg/mL. Ces valeurs sont inférieures au standard BHT (IC<sub>50</sub>= 22.32±1.19 µg/mL) et très proche de celle du standard BHA (IC<sub>50</sub>= 5.73 ± 0.41 µg/mL). Les extraits acétate d'éthyle, chloroforme et éther de pétrole des propolis de Mila et Boumerdès sont moins actifs que les deux standards testés. Les propolis de Tébessa et Guelma présentent le pouvoir antiradicalaire le plus faible (>200).

Boufadi, Y.M. et al (2014) ont testé l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et l'extrait acétate d'éthyle de 6 propolis algérienne. Parmi l'ensemble des propolis étudiées, la propolis de Tizirt a présenté l'activité antiradicalaire la plus puissante avec des IC<sub>50</sub> de 19.4 ± 0.2 et 16.3 ± 0.3 µg/mL. Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés dans notre étude. Bittencourt, et al (2015) ont évalué l'activité antioxydante de deux propolis Brésilienne par la méthode de DPPH, l'IC<sub>50</sub> trouvée varie entre 21.50 et 78.77 µg/mL. Ces résultats sont proches

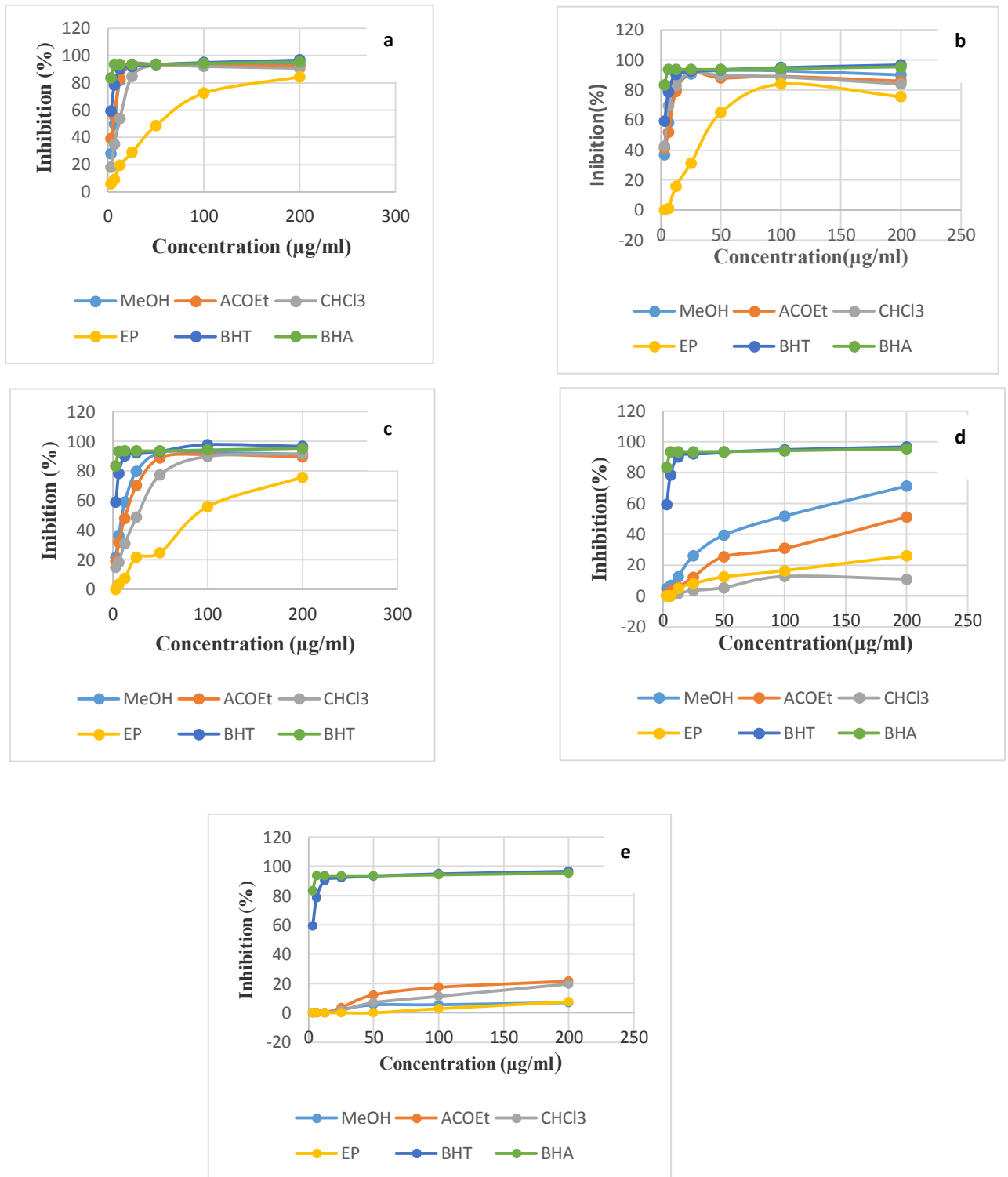
de ceux trouvés dans notre travail. Dans une étude plus récente Hochheim, et al (2018) ont reportés des valeurs plus élevées pour la propolis Brésilienne. Les  $IC_{50}$  obtenues été de  $151.37 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$ ,  $311.47 \pm 8.2 \mu\text{g/mL}$ ,  $588.8 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$  et  $> 1000 \mu\text{g/mL}$  pour les extraits méthanol, acétate d'éthyle, butanol et dichlorométhane respectivement.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Segueni, et al (2017) qui ont reporté que l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Beni belaid représente l'extrait le plus actif avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $5.28 \pm 0.16 \mu\text{mole trolox/g}$ . De plus, Silva, et al (2019) a démontré que l'extrait acétate d'éthyle présente une meilleure activité anti-radicalaire (radical DPPH) comparé aux autres extraits étudiés.

### **III-1-2-2- Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS**

L'évaluation de l'activité antioxydante par le radical ABTS est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs.

Les courbes représentées dans la figure-26 illustrent l'absorbance des différents extraits ainsi que celle des deux standards BHA et BHT en fonction des concentrations testées. Ces courbes mettent en évidence une relation proportionnelle entre l'augmentation de la concentration et le pourcentage de l'absorbance des échantillons étudiés.



a : Inhibition du radical ABTS par la propolis de Constantine  
 b : Inhibition du radical ABTS par la propolis de Boumerdes  
 c : Inhibition du radical ABTS par la propolis de Tébessa  
 d : Inhibition du radical ABTS par la propolis de Guelma

**Figure-26 : Courbes d'inhibition du radical ABTS par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations**

Les résultats obtenus représentés dans le tableau-12 varient entre  $3.53\pm 0.24$  et  $197.35\pm 0.30$   $\mu\text{g/ml}$ . L'extrait chloroformique de la propolis de Boumerdes représente l'extrait le plus actif avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $3.53\pm 0.24$   $\mu\text{g/ml}$  suivi par les extraits acétate d'éthyle des propolis de Constantine et de Boumerdes avec des  $\text{IC}_{50}$  de  $5.31\pm 0.14$  et  $5.50\pm 0.03$   $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Les extraits de la propolis de Tébessa et Guelma ont montré une faible activité en comparaison avec les extraits des autre propolis.

Il est intéressant de noter que pour ce test l'effet antioxydant des différents extraits décroît dans l'ordre suivant : BHA > BHT > propolis de Boumerdes ( $\text{IC}_{50}$  entre  $3.53\pm 0.24$  et  $34.35 \pm 3.14$   $\mu\text{g/ml}$ ) >propolis de Constantine ( $\text{IC}_{50}$  entre  $5.31\pm 0.14$  et  $58.38\pm 0.59$   $\mu\text{g/ml}$ ) >propolis de Mila ( $\text{IC}_{50}$  entre  $10.82\pm 0.52$  et  $91.32\pm 1.74$ ) >propolis de Tébessa ( $\text{IC}_{50}$  entre  $95.07\pm 3.68$  et  $197.35\pm 0.30$   $\mu\text{g/ml}$ ) >propolis de Guelma ( $\text{IC}_{50}>200$ )

Nos propolis sont plus actives que la propolis Marocaine. Touzani, et al (2019) ont testés sept propolis par le test ABTS. Les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  reportées sont supérieures à ceux de la présente étude (entre  $0.021\pm 0.110$  et  $0.983\pm 0.020\text{mg/mL}$ ).

**Tableau-12 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test ABTS**

Extrait	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g/mL}$ (ABTS)				
	CN	BN	CHN	TN	GN
MeOH	$6,73\pm 0,14$	$5,38\pm 0,35$	$10,82\pm 0,52$	$95,07\pm 3,68$	>200
ACO <sub>2</sub> t	$5,31\pm 0,14$	$5,50\pm 0,03$	$14,53\pm 0,14$	$197,35\pm 0,30$	>200
CHCl <sub>3</sub>	$11,60\pm 0,37$	$3,53\pm 0,24$	$27,30\pm 1,08$	>200	>200
EP	$58,38\pm 0,59$	$34,35\pm 3,14$	$91,32\pm 1,74$	>200	>200
BHT	$1,29\pm 0,30$	$1,29\pm 0,30$	$1,29\pm 0,30$	$1,29\pm 0,30$	$1,29\pm 0,30$
BHA	$1,81\pm 0,10$	$1,81\pm 0,10$	$1,81\pm 0,10$	$1,81\pm 0,10$	$1,81\pm 0,10$

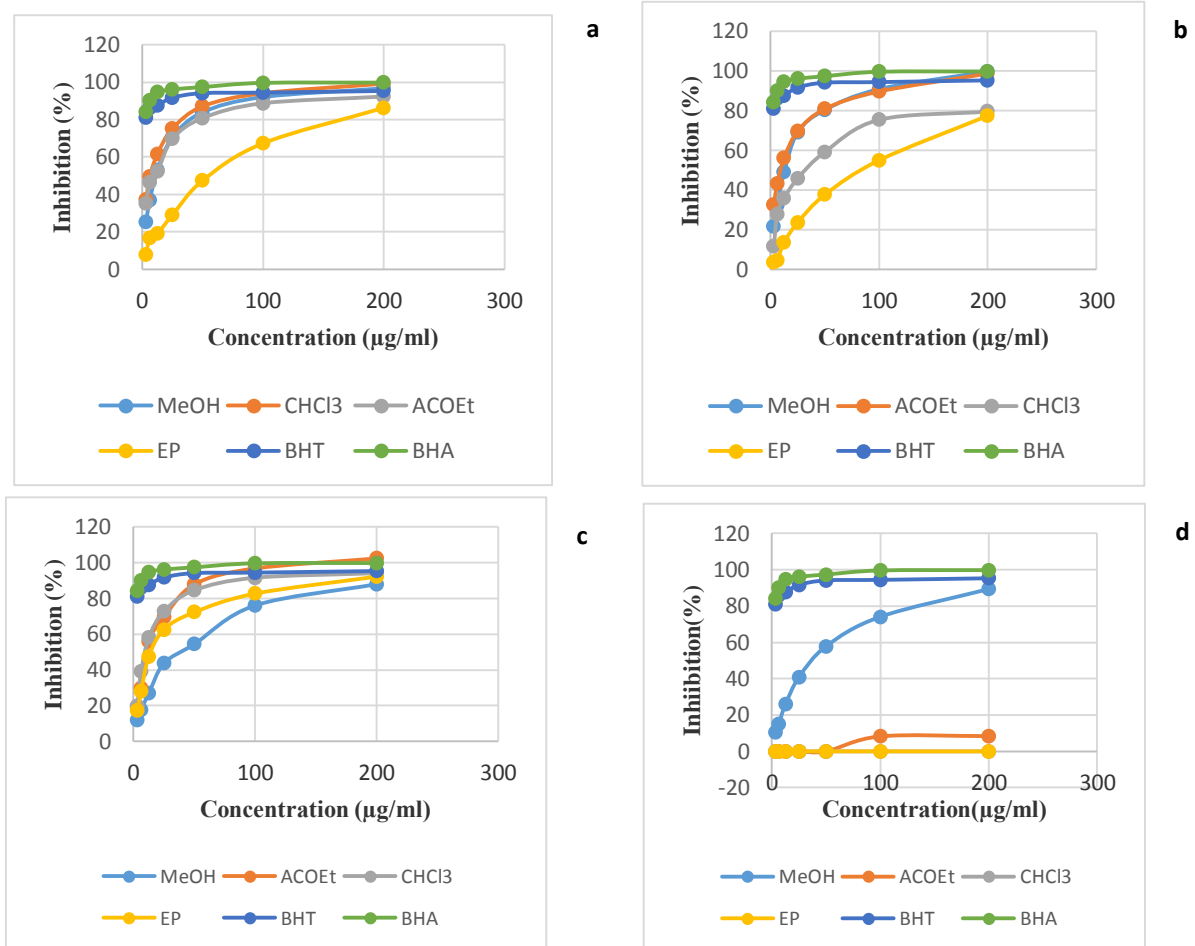
La comparaison des  $\text{IC}_{50}$  obtenues par les deux tests (DPPH et ABTS) montrent des valeurs plus faibles pour le radical ABTS. Cette différence peut être expliquée par la sensibilité et la capacité de ce radical à mesurer l'effet antioxydant des composés de nature lipophile et hydrophile. A l'inverse le radical DPPH mesure l'effet antioxydant des composés hydrophile uniquement (Prior, et al 2005).

### III-1-2-3-Test du blanchissement du $\beta$ -carotène

La décomposition des acides gras est l'une des principales causes de la détérioration de la nourriture. L'inhibition de l'oxydation des acides gras par l'utilisation des conservateurs naturels est une question importante dans l'industrie alimentaire. L'aptitude des extraits à

inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée par la technique de décoloration du  $\beta$ -carotène. Cette dernière est habituellement employée pour estimer l'activité antioxydante des substances dans les émulsions accompagnée de l'oxydation (Kartal, N. et al 2007).

Les courbes représentent l'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations (Figure-27). Ces courbes nous ont permis de déterminer les  $IC_{50}$ .



a :propolis de Constantine  
 b : propolis de Mila  
 c : propolis de Boumerdes  
 d : propolis de Tébessa

**Figure -27 : Courbes d'absorbance du test du blanchissement du  $\beta$ -carotène des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations**

Nos résultats concernant le test du blanchissement du  $\beta$ -carotène sont identiques à ceux obtenus pour les deux radicaux libres DPPH et ABTS. L'activité varie en fonction du solvant utilisé ainsi que la région géographique de la propolis étudiées. Les différences entre les extraits étudiés sont significatives. Les valeurs des  $IC_{50}$  des différents extraits varient de  $7.53 \pm 0.30$  à  $85.79 \pm 1.46$   $\mu\text{g/mL}$ . Parmi les extraits testés l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine présente la meilleure activité. Par contre celui de la propolis de Tébessa est le moins actif. L'ensemble des extraits de la propolis de Guelma ainsi que les extraits chloroformique, acétate d'éthyle et éther de pétrole de la propolis de Tébessa présentent des

valeurs supérieures à 200 µg/mL. Parmi les propolis testées, la propolis de Constantine est la plus active pour l'ensemble des extraits testés. Suivi par les propolis de Boumerdès et de Mila. Les résultats obtenus représentés dans le tableau-13

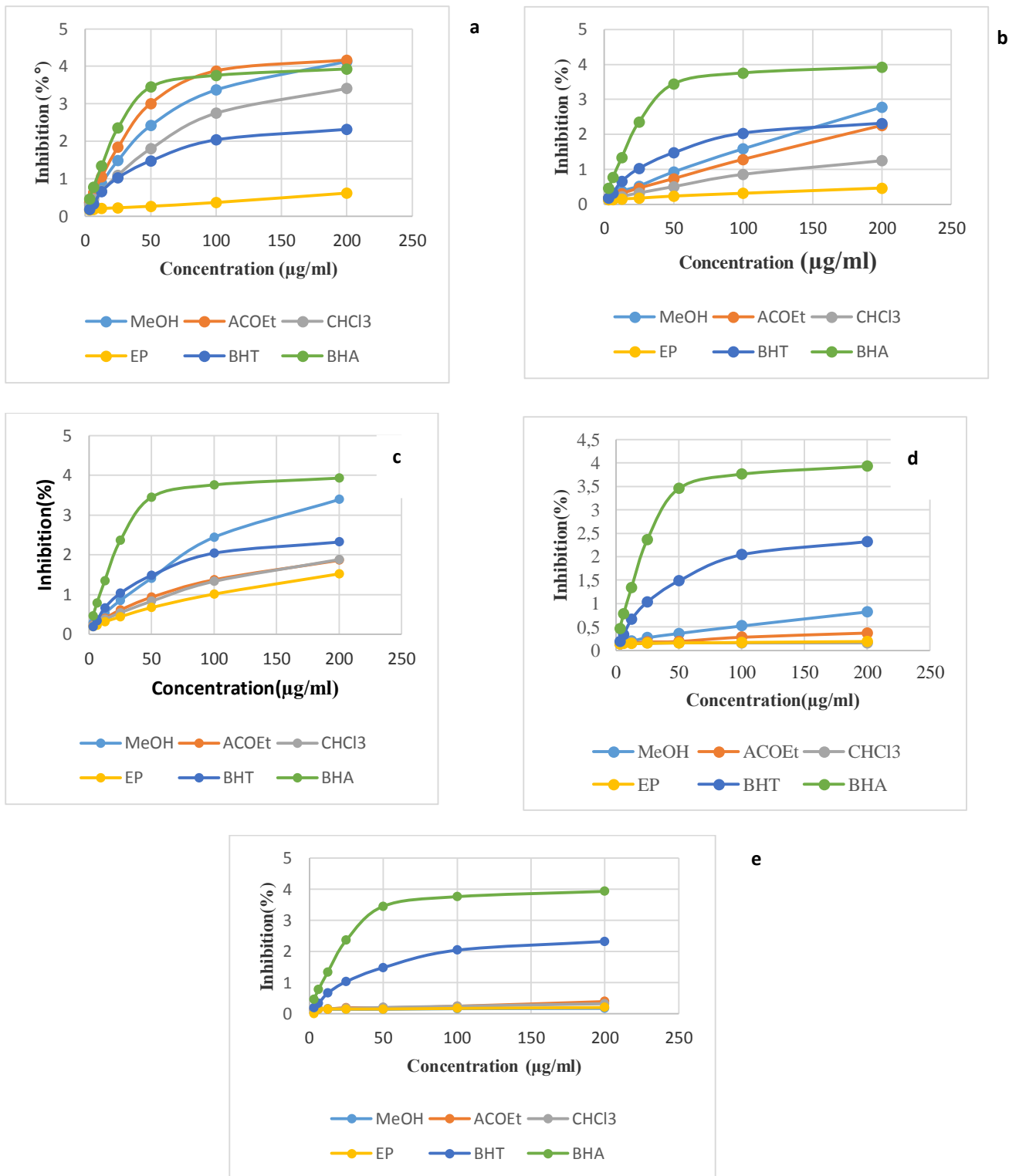
**Tableau-13 : Valeurs d'IC50 des extraits de la propolis par le test β-carotène**

Extrait	IC <sub>50</sub> µg/mL (β-carotène)				
	CN	BN	CHN	TN	GN
MeOH	11,34±0,17	16,88±0,61	14,51±0,43	40,38±2,39	>200
AcOet	7,53±0,30	10,75±0,33	9,92±0,61	>200	>200
CHCl <sub>3</sub>	9,69±0,27	12,39±1,92	34,09±0,86	>200	>200
EP	62,56±0,24	39,74±1,12	85,79±1,46	>200	>200
BHT	1,05±0,01	1,05±0,01	1,05±0,01	1,05±0,01	1,29±0,30
BHA	0,90±0,02	0,90±0,02	0,90±0,02	0,90±0,02	1,81±0,10

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Silva, et al (2019). L'influence du solvant sur l'activité antioxydante de la propolis Brésilienne a été évaluée par deux méthodes. L'extrait acétate d'éthyle a présenté une meilleure activité antioxydante par le test du blanchissement du β-carotène par contre l'extrait hexane a présenté l'activité la plus faible

#### III-1-2-4-Test de la Réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats du test CUPRAC de chaque propolis sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition correspondant à l'absorbance 0.5 (**tableau- 14, figure-28**)



a : Propolis de Constantine

b : Propolis de Mila  
 c : Propolis de Boumerdes  
 d : Propolis de Tébessa  
 e : Propolis de Guelma

**Figure-28 : Courbes d'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test CUPRAC**

Comparable aux tests précédent, les  $A_{0.5}$  obtenues pour ce test varient significativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction et de la zone géographique de la propolis testée. Les  $A_{0.5}$  varient entre  $4.75 \pm 0.25$  et  $93.92 \pm 1.80$   $\mu\text{g/mL}$ . La propolis de Constantine est plus active et ceux pour l'ensemble des extraits testés. Les extraits acétate d'éthyle, chloroforme et méthanol ont montré une activité supérieur au standard BHT tandis que l'extrait acétate d'éthyle a manifesté une activité ( $A_{0.50} = 4.75 \pm 0.25$   $\mu\text{g/mL}$ ) presque égale à celle du standard BHA. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Segueni et al (2017) qui ont reporté que l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Beni Belaid représente l'extrait le plus actif par le test CUPRAC.

**Tableau-14 : Valeurs  $A_{0.5}$  des extraits de la propolis par le test CUPRAC**

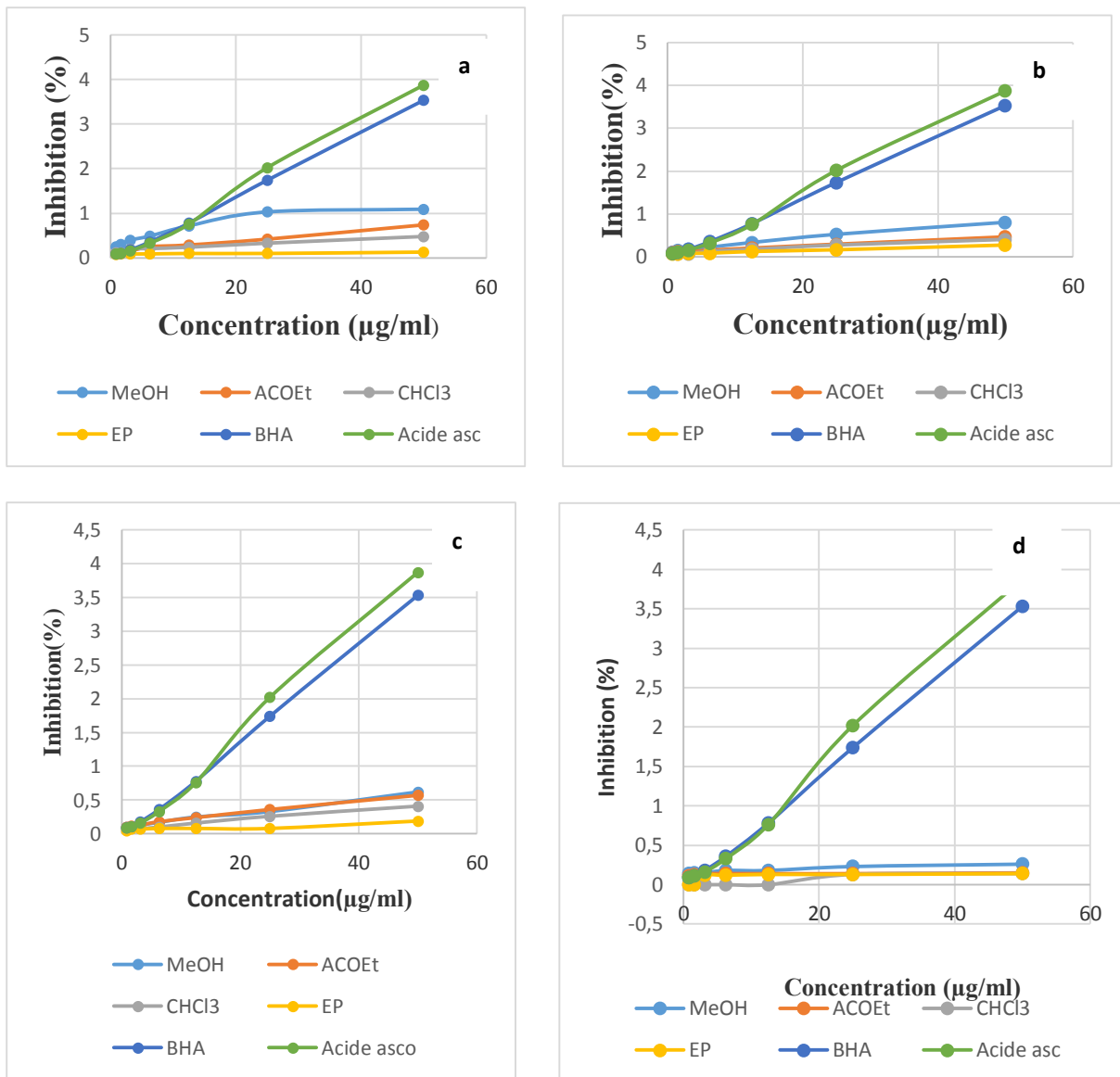
Extrait	$A_{0.5}$ $\mu\text{g/mL}$ (CUPRAC)				
	CN	BN	CHN	TN	GN
MeOH	$5,59 \pm 0,11$	$11,48 \pm 0,74$	$21,44 \pm 0,63$	$93,92 \pm 1,80$	>200
AcOet	$4,75 \pm 0,25$	$18,70 \pm 0,88$	$28,59 \pm 0,84$	>200	>200
$\text{CHCl}_3$	$7,70 \pm 0,50$	$22,48 \pm 0,76$	$48,77 \pm 0,39$	>200	>200
EP	$150,15 \pm 0,44$	$30,87 \pm 2,07$	>200	>200	>200
BHT	$9,62 \pm 0,87$	$9,62 \pm 0,87$	$9,62 \pm 0,87$	$9,62 \pm 0,87$	$9,62 \pm 0,87$
BHA	$3,64 \pm 0,19$	$3,64 \pm 0,19$	$3,64 \pm 0,19$	$3,64 \pm 0,19$	$3,64 \pm 0,19$

### III-1-2-5-Test de la réduction du Fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Nous avons étudié l'activité antioxydante des différents extraits de propolis par la méthode de réduction du fer (FRAP). Cette méthode est basée sur l'aptitude des antioxydants présents dans les différents extraits à réduire le  $\text{TpTz-Fe(III)}$  en  $\text{TpTz-Fe(II)}$  (Li, et al 2008).

La figure-29 représente la variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits de la propolis étudiée.





a : Propolis de Constantine  
 b : Propolis de Mila  
 c : Propolis de Boumerdes  
 d : Propolis de Tébessa

**Figure-29 : Courbes d'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test FRAP**

Les résultats de l'activité antioxydante des différents extraits varient entre  $6.20 \pm 0.43$  µg/mL pour l'extrait méthanolique de la propolis de Constantine considéré comme le plus actif et  $41.55 \pm 1.57$  µg/mL pour l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Mila considéré comme le moins actif (**Tableau-15**). Il est intéressant de noter que l'extrait méthanolique de la propolis de Constantine est plus actif que les deux standards utilisés pour ce test (BHA et acide ascorbique).

Le potentiel antioxydant le plus élevé a été constaté avec les extraits de la propolis de Constantine suivi par les propolis de Boumerdès et Mila. Les extraits de la propolis de Tébessa et Guelma ont exercé un potentiel antioxydant inférieur par rapport à ceux des extraits étudiés. Le BHA et l'acide ascorbique utilisé comme standard dans ce travail ont montré une activité antioxydante puissante. Cette activité est aussi supérieure aux valeurs retrouvées avec tous les extraits testés.

**Tableau- 15 : Valeurs A<sub>0.5</sub> des extraits de la propolis par le test FRAP**

Extrait	A <sub>0.5</sub> µg/mL(FRAP)				
	CN	BN	CHN	TN	GN
MeOH	6,20±0,43	24,19±0,48	38,88±0,18	>50	>50
AcOet	30,38±0,34	>50	41,55±1,57	>50	>50
CHCl <sub>3</sub>	>50	>50	>50	>50	>50
EP	>50	>50	>50	>50	>50
BHT	>50	>50	>50	>50	>50
BHA	8,41±0,67	8,41±0,67	8,41±0,67	8,41±0,67	8,41±0,67
Acide ascorbique	9,01±1,46	9,01±1,46	9,01±1,46	9,01±1,46	9,01±1,46

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, on remarque un écart remarquable. Les extraits de sept propolis marocaine ont un pouvoir réducteur inférieur avec des IC<sub>50</sub> qui varient entre 0.030±0.070 et 1.080±0.130mg/mL (**Touzani, S. et al 2019**). Nos résultats sont assez proches de ceux rapportés par Pratami, D.K.et al (2018) qui ont évalué l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la propolis indonésienne récoltée par des abeilles du genre *Tetragonula*. Les IC<sub>50</sub> varient entre 26.41 et 34.62 µg/mL pour le test FRAP.

Nos résultats indiquent que l'activité antioxydante de la propolis varie en fonction de la zone géographique de la propolis récoltée et du solvant utilisé lors de l'extraction. Notre étude démontre qu'il existe une très forte corrélation entre les différents tests utilisés avec des coefficients de corrélation de 0,99 pour les tests ABTS- β-carotène et CUPRAC. Les techniques FRAP- β-carotène présentent aussi un coefficient de corrélation de 0,98 pour la propolis de Mila uniquement. De plus, la propolis de Boumerdes présente des coefficients variant entre 0,9 et 0,99 pour les tests DPPH- ABTS et β-carotène.

Notre étude indique que l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine est le plus actif. Nos résultats sont en accord avec d'autres travaux réalisés sur la propolis algérienne

qui ont montré que l'extrait acétate d'éthyle possède une activité antioxydante très importante par rapport à d'autres extraits (Segueni, N et al 2017 et boufadi Y.M. et al 2014). De plus Silva, C.C.F. et al (2019) ont montré que l'extrait acétate d'éthyle possède la plus grande activité antioxydante avec deux techniques différents par rapport à l'extrait méthanolique, chloroformique et hexane.

L'analyse de la littérature concernant le meilleur solvant susceptible d'être utilisé pour l'extraction de la propolis et qui permet d'avoir l'effet antioxydant le plus puissant est très intéressante avec des résultats parfois très contradictoire. Hochheim, et al (2018) suggèrent que l'activité antioxydante dépend directement du solvant utilisé dans l'extraction et montrent que l'extrait méthanolique présente une bonne activité antioxydante comparé aux autres extraits étudiés. Nos résultats concernant les propolis de Mila et de Boumerdes sont en accord avec ces travaux.

### III-1-3-Étude de l'activité anticholinestérase

Les résultats des tests de l'activité antioxydante nous ont permis de sélectionner la propolis la plus active (propolis de Constantine). L'activité anticholinestérase de cette propolis a donc été évaluée sur deux enzymes : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les résultats sont représentés dans le tableau-16.

**Tableau-16 : Valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'activité anticholinestérase des extraits de la propolis de Constantine**

Extrait	Butyrylcholinestérase (BChE) (IC <sub>50</sub> µg.ml <sup>-1</sup> )	Acétylcholinestérase (AChE) (IC <sub>50</sub> µg.ml <sup>-1</sup> )
EP	175,91±0,40	141,48±0,55
CHCl <sub>3</sub>	47,98±0,08	81,21±6,06
AcOet	242,02±1,77	ND
MeOH	ND	ND
Galantamine	34,75±1,99	6,27±1,15

Seul l'extrait éther de pétrole et l'extrait chloroformique présentent une activité inhibitrice contre les deux enzymes testées (AChE et BChE). L'extrait chloroformique possède l'activité inhibitrice la plus élevée avec des IC<sub>50</sub> de 81,21±6,06 et 47,98±0,08 µg.ml<sup>-1</sup> respectivement. L'extrait méthanolique ne présente aucune activité. Par contre l'extrait acétate d'éthyle inhibe uniquement la BChE.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature suggère que nos propolis présentent une meilleure activité inhibitrice contre l’AChE et la BChE. La propolis marocaine présente des IC<sub>50</sub> qui varient de 0,085±0,006 à 0,743±0,006 mg/ml (Miguel, Met al 2014). Baltas, N et al 2016 ont rapporté des IC<sub>50</sub> qui varient entre 0,081±0,009 et 1,053±0,016 mg/ml pour la propolis turque.

### III-1-4- Analyse des extraits de la propolis par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Parmi les propolis testées, les propolis de Constantine, Boumerdès et Mila ont démontré une activité antioxydante très intéressante. Les extraits chloroformique, acétate d’éthyle et méthanolique étant les plus actifs, ces extraits ont été analysé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Vingt-deux composés ont été utilisés comme standards pour l’identification des composés phénoliques de ces extraits.

En raison de la faible quantité des extraits de la propolis de Constantine seul l’extrait acétate d’éthyle a été analysé. Ainsi les extraits testés sont : l’extrait acétate d’éthyle de la propolis de Constantine (CN3) et les extraits chloroformique, acétate d’éthyle et méthanolique de la propolis de Boumerdès (BN2, BN3, BN4) et de Mila (CHN2, CHN3, CHN4). Les résultats de l’analyse LC-MS sont rassemblés dans le tableau-17.

**Tableau-17 : Analyse LC-MS des extraits de propolis**

Tr	Composés identifiés	BN2	BN3	BN4	CHN2	CHN3	CHN4	CN3
10,1	Acide gallique	8,758	10,908	15,290	ND	ND	123,441	173,723
13,87	Acide gentisique	ND	ND	4,445	ND	ND	ND	7,861
14,25	Acide Chlorogénique	24,922	36,789	462,569	0,997	0,357	62,469	2,681
14,64	Acide p-hydroxybenzoïque	ND	1007,035	ND	ND	201,051	326,858	ND
15,26	Acide caffeique	28,076	224,566	158,938	128,174	135,683	804,744	8329,142
15,32	Acide p-hydroxybenzoïque	12,037	4,808	1,925	10,694	5,739	10,735	8,818
16,97	Acide p-coumarique	ND	96,728	69,946	126,925	140,021	200,082	1001,206
17,86	Acide Rosmarinique	ND	0,210	0,127	0,061	0,075	4,563	0,540
18,04	Rutine	ND	ND	ND	ND	0,013	7,499	ND

18,29	Oleuropéine	ND	0,156	ND	0,132	0,260	2,469	ND
20,46	Naringénine	20,607	61,495	69,180	248,026	256,116	72,893	424,423
21,92	Kaempférol	ND	ND	ND	77,320	79,364	264,684	824,284
26,83	Hespéridine	3,160	ND	ND	ND	ND	7,497	ND
20,71	Acide cinnamique	ND	ND	138,643	ND	ND	2278,06	ND
15,29	acide protocatéchique	130,753	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15,24	Acide Vanillique	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND : non détecté

BN2 : extrait chloroformique de la propolis de Boumerdès

BN3 : extrait acétate d'éthyle de la propolis de Boumerdès

BN4 : extrait méthanolique de la propolis de Boumerdès

CN3 : extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine

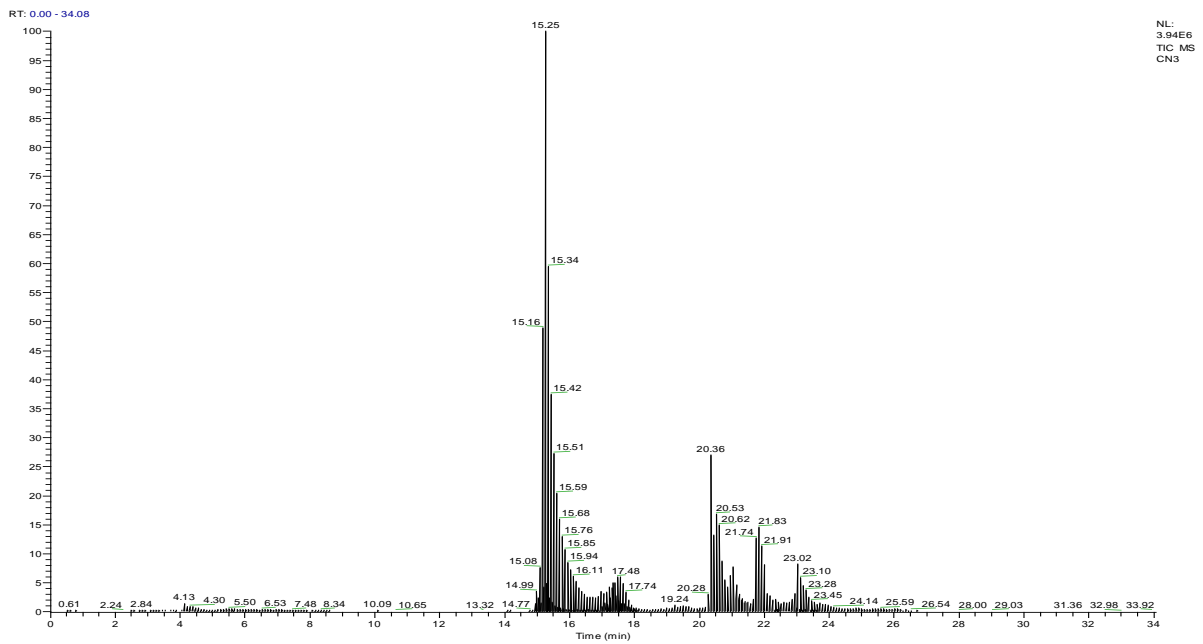
CHN2 : extrait chloroformique de la propolis de Mila

CHN3 : extrait acétate d'éthyle de la propolis de Mila

CHN4 : extrait méthanolique de la propolis de Mila

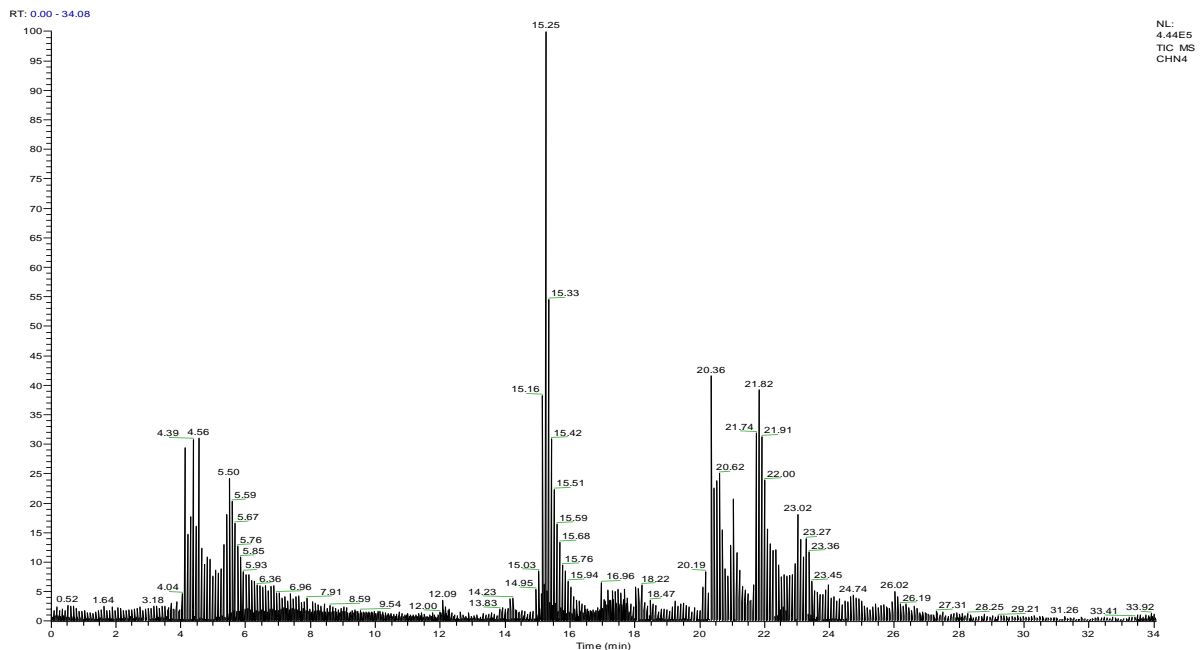
La comparaison entre les différents extraits testés montre l'absence de l'acide vanillique dans l'ensemble des extraits. L'hespéridine n'est présente que dans l'extrait chloroformique de la propolis de Boumerdès (BN2) et l'extrait méthanolique de la propolis de Mila (CHN3). Les acides gentisique et protocatéchique ne sont présents qu'au niveau des extraits méthanol de la propolis de Boumerdès (BN4) et acétate d'éthyle de la propolis de Constantine (CN3) pour le premier acide et l'extrait chloroformique de la propolis de Boumerdès (BN2) pour le deuxième. La rutine par contre n'est présente qu'au niveau de l'extrait méthanolique de la propolis de Mila (CHN4). Malgré les différences détectées entre les extraits, certains composés se sont révélés être communs. C'est le cas par exemple de l'acide caféique et la naringénine.

Nos résultats indiquent que la composition chimique des différents extraits varie qualitativement et quantitativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction et de la zone géographique de la propolis étudiée. L'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine contient majoritairement l'acide caféique, l'acide p-coumarique, le kampférol et la naringénine avec des teneurs de 8329, 1001, 824 et 424 mg/kg d'extrait respectivement. **(Figure-30)**



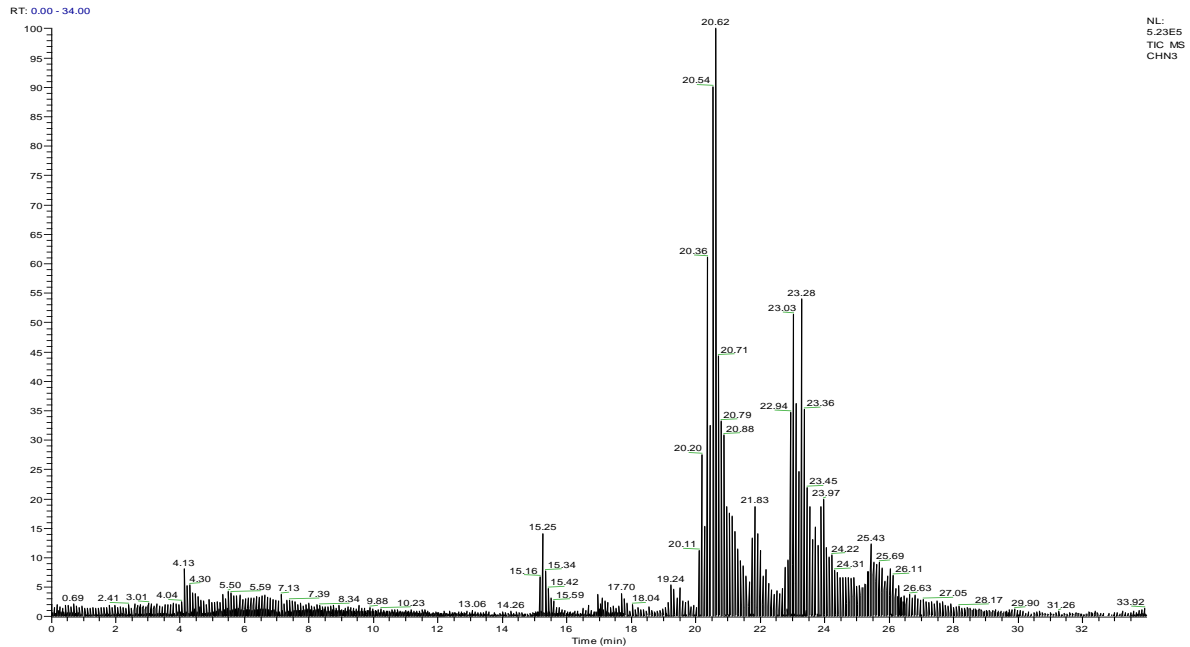
**Figure-30 : chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine**

Pour la propolis de Mila, l'extrait méthanolique (CHN4) est plus riche en acide cinnamique. Ce dernier est majoritaire avec une teneur de 2278 mg /kg suivi par les acides caféique et p-hydroxybenzoïque, le kampférol, les acides p-coumarique et galique et enfin la naringénine. (Figure-31)

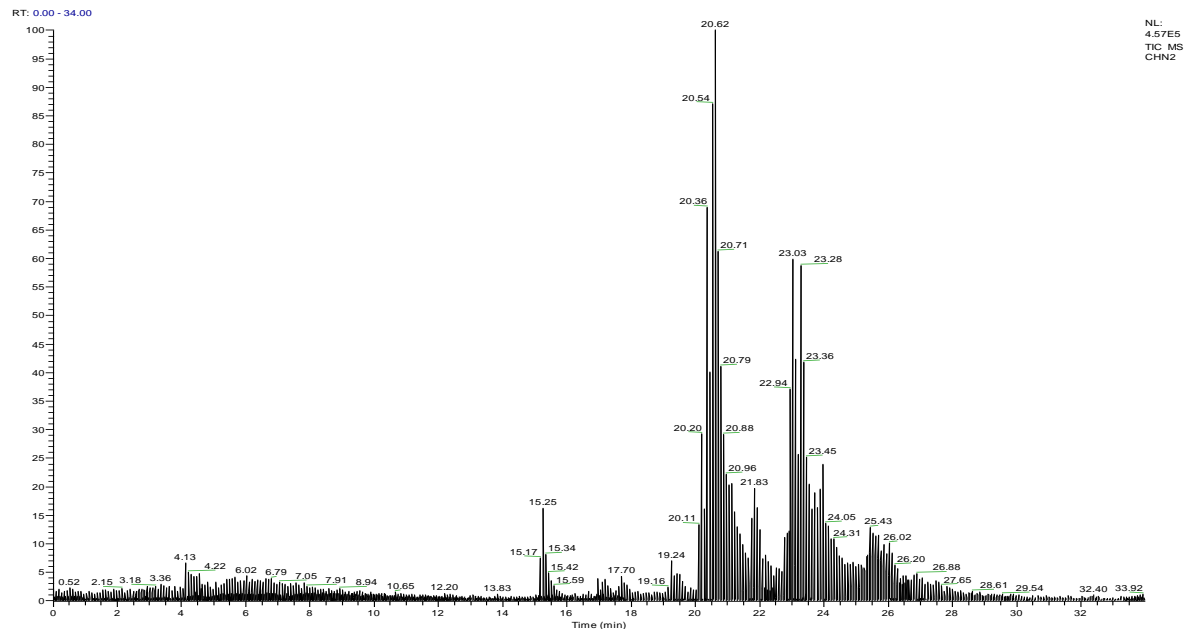


**Figure-31 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de la propolis de Chelghoum  
laid**

L'extrait chloroformique (CHN2) et acétate d'éthyle de la même propolis (CHN3) sont plus riches en acide caféique, acide p-coumarique et en naringénine. L'extrait CHN3 est riche aussi en kampférol et en acide p-hydroxybenzoïque (**Figure-32, Figure -33**)

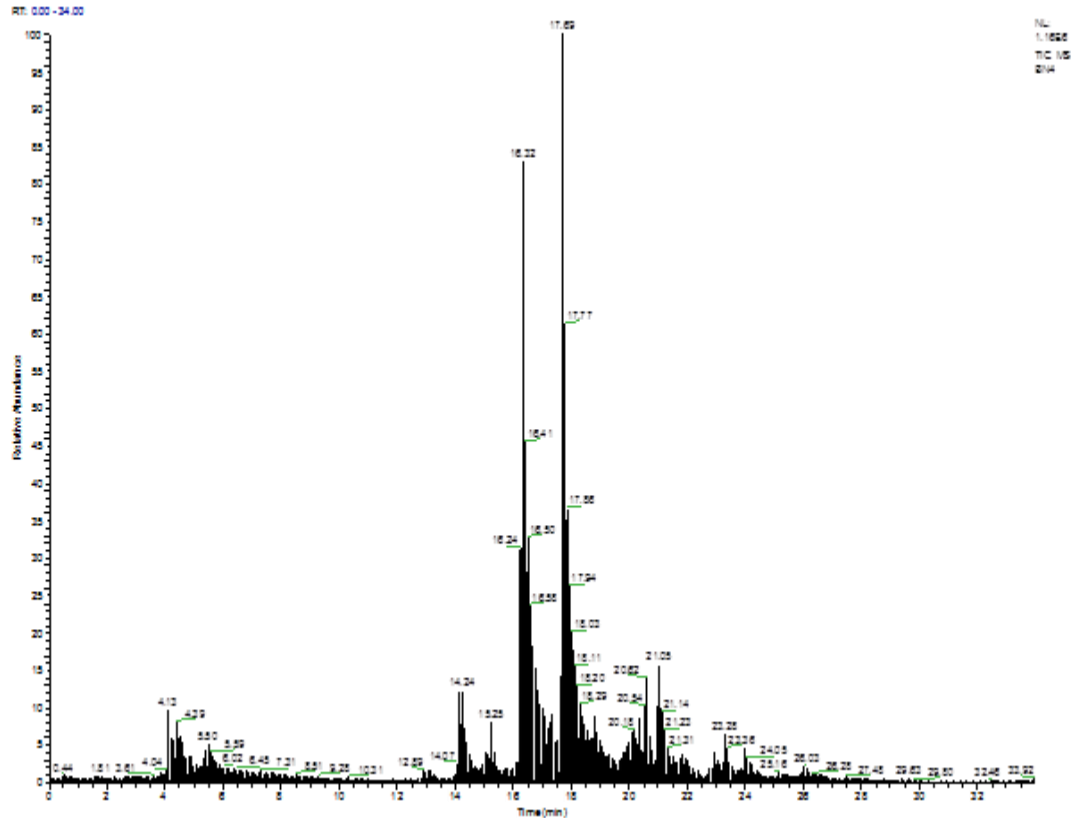


**Figure-32 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Chelghoum laid**



**Figure-33 : Chromatogramme de l'extrait chloroformique de la propolis de Chelghoum laid**

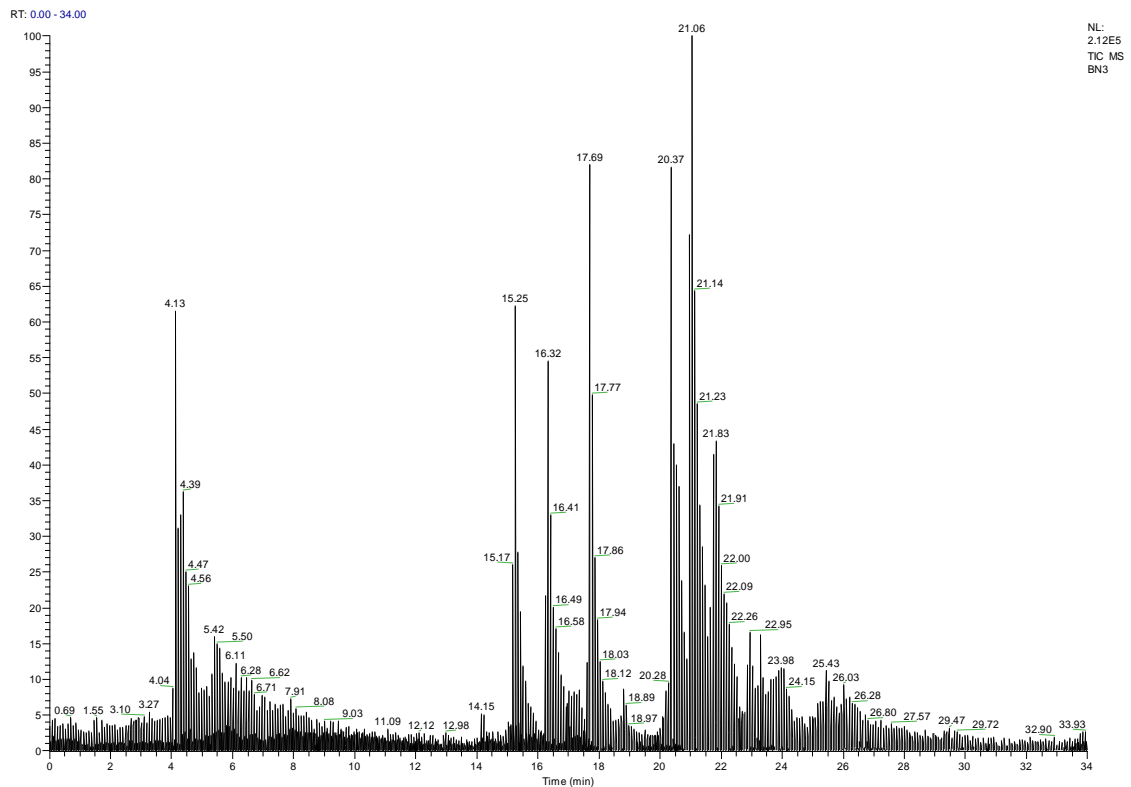
Parmi les vingt-deux composés quantifiés, on remarque que cinq d'entre eux sont les composés majoritaires dans l'extrait méthanolique de la propolis de Boumerdès (BN4). Ces composés sont l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide cinnamique, l'acide p-coumarique et la naringénine (**Figure-34**).



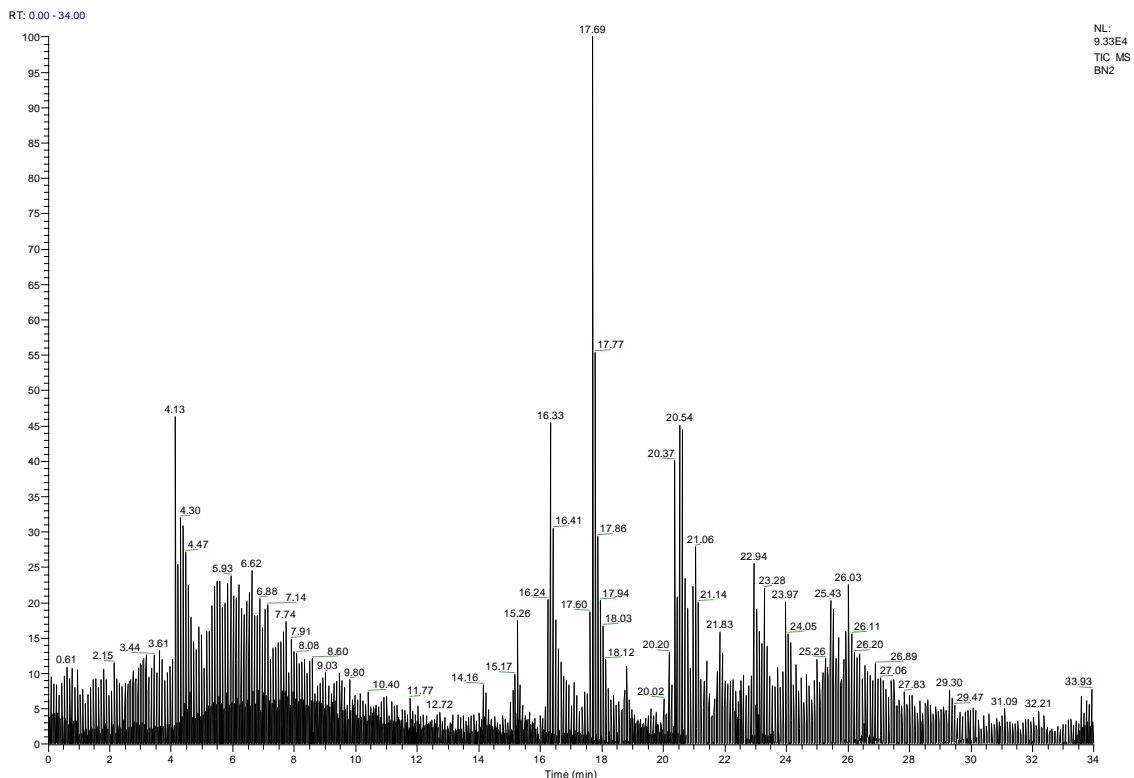
**Figure-34 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de la propolis de Boumerdès**

L'analyse de l'extrait acétate d'éthyle de la même propolis (BN3) montre que les produits majoritaires sont l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et la Naringénine. Cependant, l'acide protocatéchiq est le seul composé majoritaire présent dans l'extrait chloroformique de cette propolis (**Figure -35, Figure-36**).





**Figure-35 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Boumerdès**



**Figure -36 : Chromatogramme de l'extrait chloroformique de la propolis de Boumerdès**

La composition chimique des propolis étudiées indiquent que ces propolis sont du type peuplier. Bankova, et al (2005) ont montré que les propolis riches en composés phénoliques

tels que les flavones, flavonols, flavanones et dihydroflavonols appartiennent à cette classe de propolis. Nos travaux sont en accord avec les travaux de Piccinelli, et al (2013) qui ont confirmé la présence de ce type de propolis en Algérie. Des analyses LC-MS-MS réalisés sur différents propolis algérienne ont détecté la présence des marqueurs chimiques de ce type de propolis.

Les principaux composés phénoliques détectés dans la présente étude sont : les acides caféique, p-coumarique, cinnamique et chlorogénique ainsi que la naringénine et le kampférol. Ces composés sont probablement responsables de l'effet antioxydant observé. Nos résultats sont en accord avec les travaux d'Ahn, et al (2007) qui ont suggéré que l'activité antioxydante de la propolis chinoise considérée comme relativement puissante été dû à la présence de certains composés tels que l'acide caféique, l'acide férulique et l'ester phénéthylique de l'acide caféique. Dans une étude plus récente, les propriétés antioxydant de la propolis polonaise ont été mises en évidence par Woźniak, et al (2019). Les auteurs ont démontré l'intérêt de l'application de la propolis en tant que composants de produits de phytothérapie.

Les radicaux libres et autres agents oxydants peuvent produire de nombreuses toxines cellulaires qui induisent des dommages oxydatifs dans les biomolécules (**Silva-Carvalho, et al 2015; Zheng, et al 2017**). Les flavonoïdes et autres composés phénoliques protègent les cellules contre ces dommages en agissant comme des inhibiteurs potentiels du stress oxydatif. Ce dernier est impliqué dans la pathogenèse de nombreuses pathologies telles que les troubles neurodégénératifs (**Zheng, et al 2017**). De plus, les capacités intracellulaires d'élimination des radicaux libres des composés phénoliques peuvent protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique (**Daleprane et Abdalla, 2013 ; Galeotti, et al 2018**).

La configuration, la substitution et le nombre total de groupes hydroxyles dans les flavonoïdes peuvent influencer les mécanismes de capture des radicaux. La configuration hydroxyle du cycle B détermine le piégeage des espèces réactives de l'oxygène par le don d'hydrogène, produisant des radicaux flavonoïdes relativement stables (**Amorati, et al. 2017**). Les composés phénoliques sont présumés être de bons antioxydants molécules en raison de leurs vastes systèmes conjugués d'électrons  $\pi$  qui facilite le don d'électrons des fractions hydroxyles espèces radicalaires oxydantes.

### **III-2- Étude phytochimique de la propolis de Constantine**

En se basant sur l'importance des activités biologiques, l'étude phytochimique n'a été effectuée que sur l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine (extrait le plus actif).

### III-2-1-Identification des produits isolés de l'extrait acétate d'éthyle

Les composés isolés ont été identifiés par différentes analyses spectroscopiques (RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC) ainsi que la spectrométrie de masse et par comparaison avec la littérature. Cette étude a permis la séparation et l'identification de huit composés.

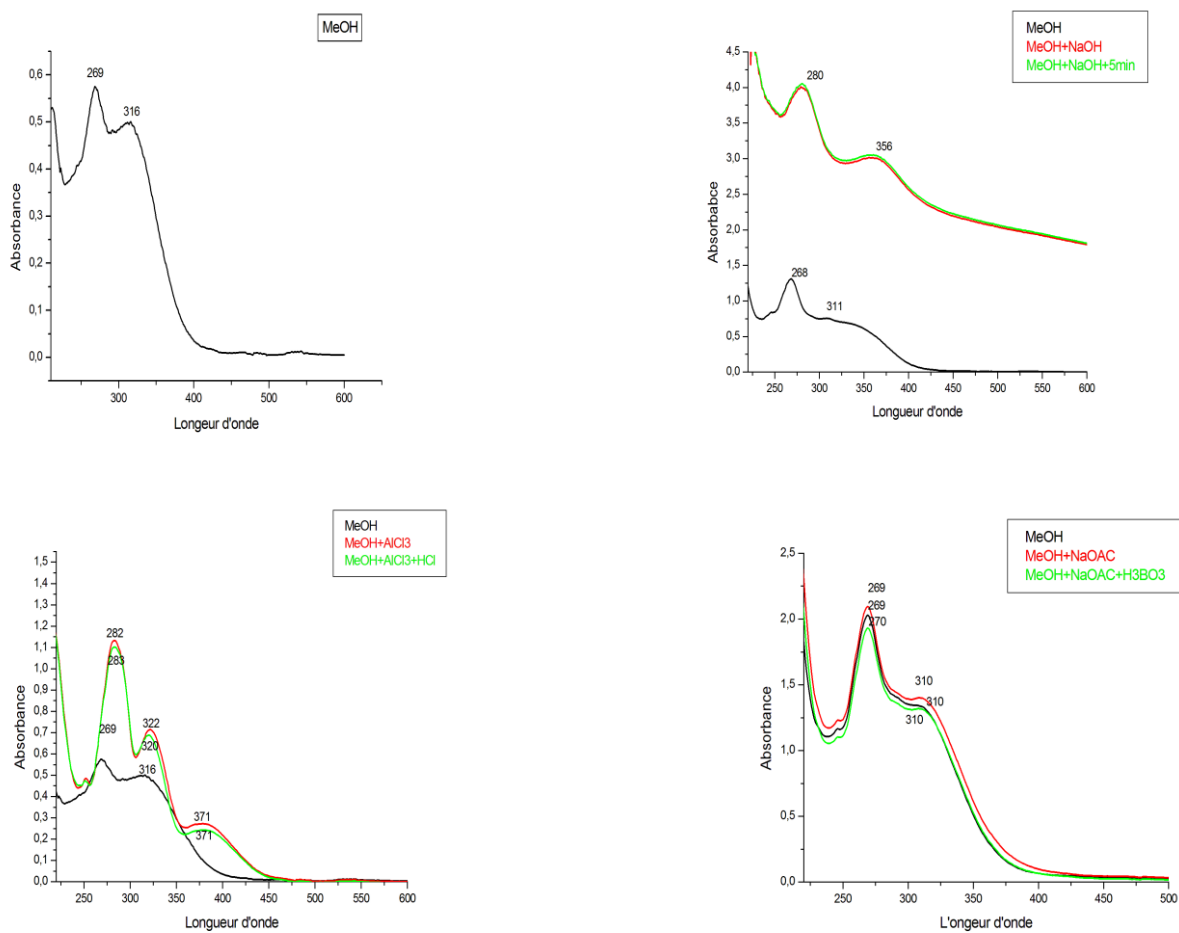
#### III-2-1-1-Elucidation structurale du composé PCA1

Ce composé se présente sous forme de précipité jaune. La fluorescence violette sous UV et les valeurs de R<sub>f</sub> 0.55 et 0.7 dans les systèmes n-hexane / ACOEt (7:3) et EP / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7:3) respectivement sont en faveur d'une structure d'un flavonoïde de type aglycone.

Le spectre UV-visible de ce composé présente dans le méthanol deux bandes d'absorption maximales à 269 et 316 nm caractéristique de la structure d'une flavone. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm dans le spectre enregistré après l'addition de (NaOH) indique que le carbone 7 est non substitué par un OH. Cette information est confirmée par l'absence d'un déplacement de la bande II dans le spectre après l'addition de NaOAC. Un effet bathochrome de ( $\Delta\lambda = +55$  nm) de la bande I avec diminution de l'intensité dans le spectre enregistré dans le (MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl) par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5. La comparaison de la bande I après ajout de HCl et celle en présence de AlCl<sub>3</sub> (AlCl<sub>3</sub>+HCl) ne montre aucun effet bathochrome indiquant l'inexistence de système ortho di OH sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I après l'addition de NaOAC+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH. Les résultats sont résumés dans le tableau-18 et présentés dans la figure-37

**Tableau-18 : Données de la série spectrale UV du composé PCA1**

Réactif	Bande	Bande	Déplacement	Interprétation
	I	II		
MeOH+PCA1	316	269	-	Flavone
MeOH+PCA1+NaOH	356	280	-	7-OR
MeOH+PCA1+AlCl <sub>3</sub>	371	282	-	Pas d'ortho-di-OH
MeOH+PCA1+AlCl <sub>3</sub> +HCl	371	283	+55	5-OH
MeOH+PCA1+ NaOAC	310	269	-	7-OR
MeOH+PCA1+NaOAC+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	310	270	-	Pas d'ortho-di-OH



**Figure-37 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA1**

Le spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique montre un pic moléculaire  $[M]^+$  à  $m/z = 268.02$  correspondant à la formule brute  $C_{16}H_{12}O_4$ . Ce spectre montre également des signaux correspondant au réarrangement caractéristique des flavones.

Un signal à  $m/z = 267$  correspondant à la perte d'un H  $[M-H]^+$

Un signal à  $m/z = 240$  correspondant à la perte de CO  $[M-CO]^+$

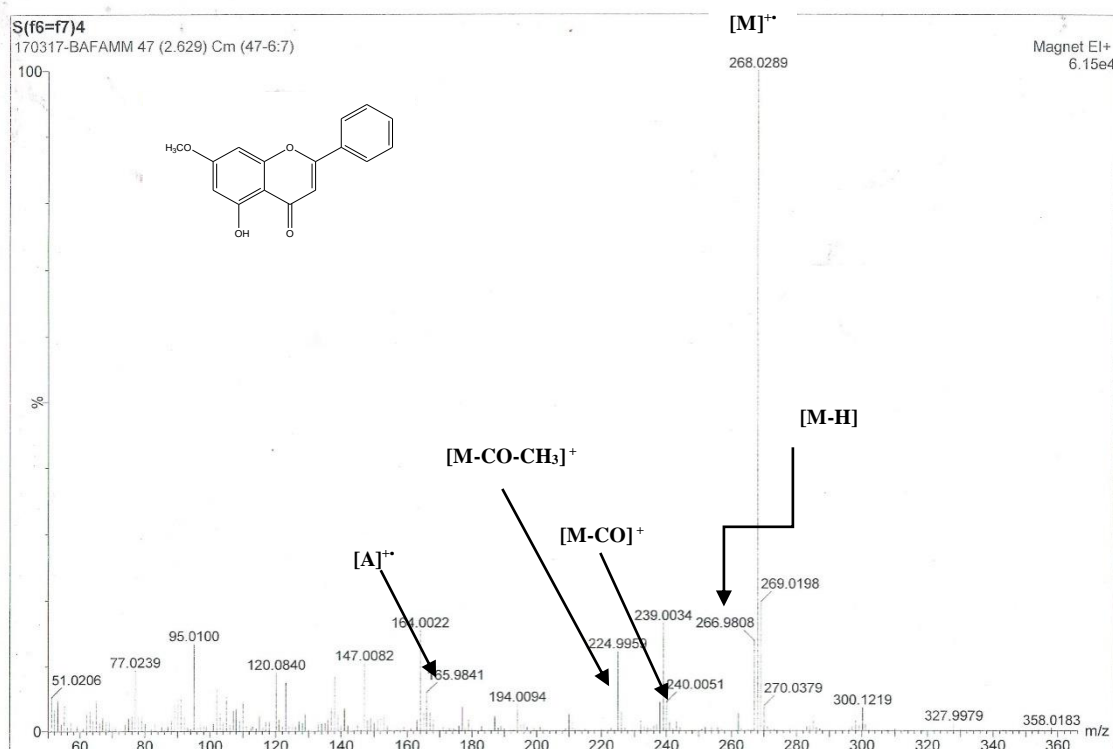
Un signal à  $m/z = 225$  correspondant à la perte de CO et  $CH_3$   $[M-CO-CH_3]^+$

Un signal à  $m/z = 166$  correspondant au fragment  $A^+$  confirmant bien une hydroxylation et une méthylation du cycle A.

Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations de ce composé sont résumées dans le tableau-19 et présentés dans la figure-38

**Tableau-19: Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA1**

Fragments	$m/z$
$[M]^{++}$	268
$[M-H]^+$	267
$[M-CO]^{++}$	240
$[M-CO-CH_3]^+$	225
$[A]^{++}$	166


**Figure-38 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA1**

L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H enregistré dans l'acétone à 600 MHz et son étalement (Figure-39 et 40, tableau-20) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Un doublet d'intégration 2H à  $\delta = 8$  ppm avec une constante de couplage ( $J = 6,9$  Hz) caractéristiques des protons en couplage ortho attribué aux protons H-2', H-6'

- Un multiplet d'intégration 3H à  $\delta = 7,59-7,61$  ppm caractéristiques des protons H-3', H-4' et H-5'.
- Un singlet d'intégration 1H à  $\delta = 6,8$  ppm correspondant au proton H-3.
- Deux doublet d'intégration 1H chacun à 6,7 ppm avec une constante de couplage ( $J = 2,2$  Hz) et l'autre à 6,3 ppm avec une constante de couplage ( $J = 2,2$  Hz) caractéristique des protons méta couplés (H-8 et H-6).
- Un singlet d'intégration 3H à 3,9 ppm attribué au groupement méthoxyle.

Tableau-20 : Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCA1.

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
8	d	2H	6.9	H-2', H-6'
7.2	m	3H	-	H-3', H-4', H5'
6.8	s	1H	-	H-3
6.6	d	1H	2.2	H-8
6.3	d	1H	1.9	H-6
3.9	s	3H	-	OMe

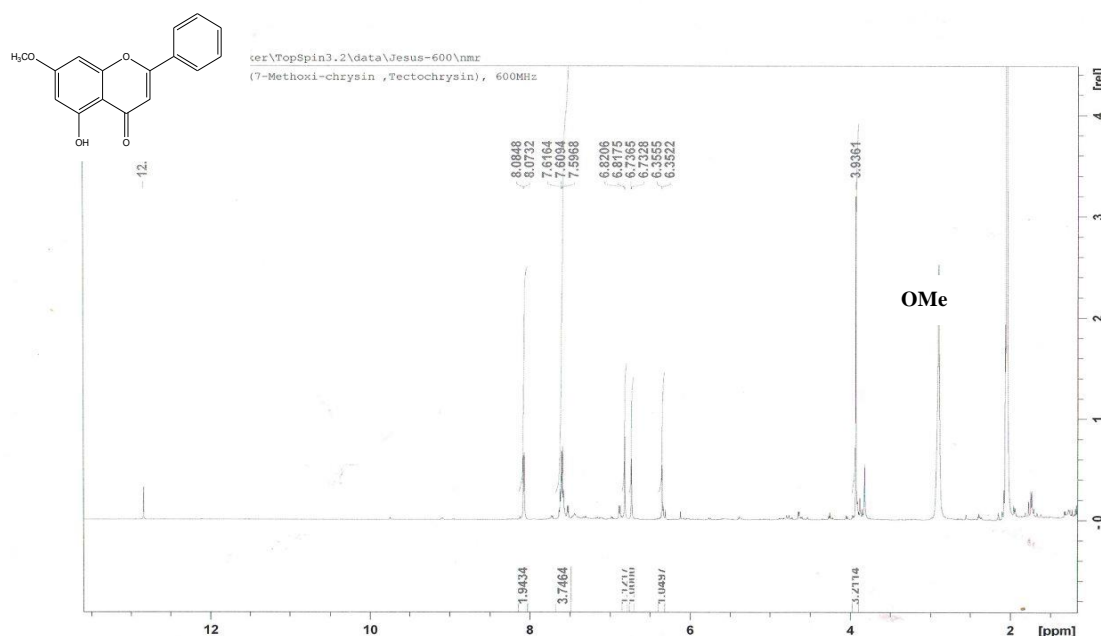
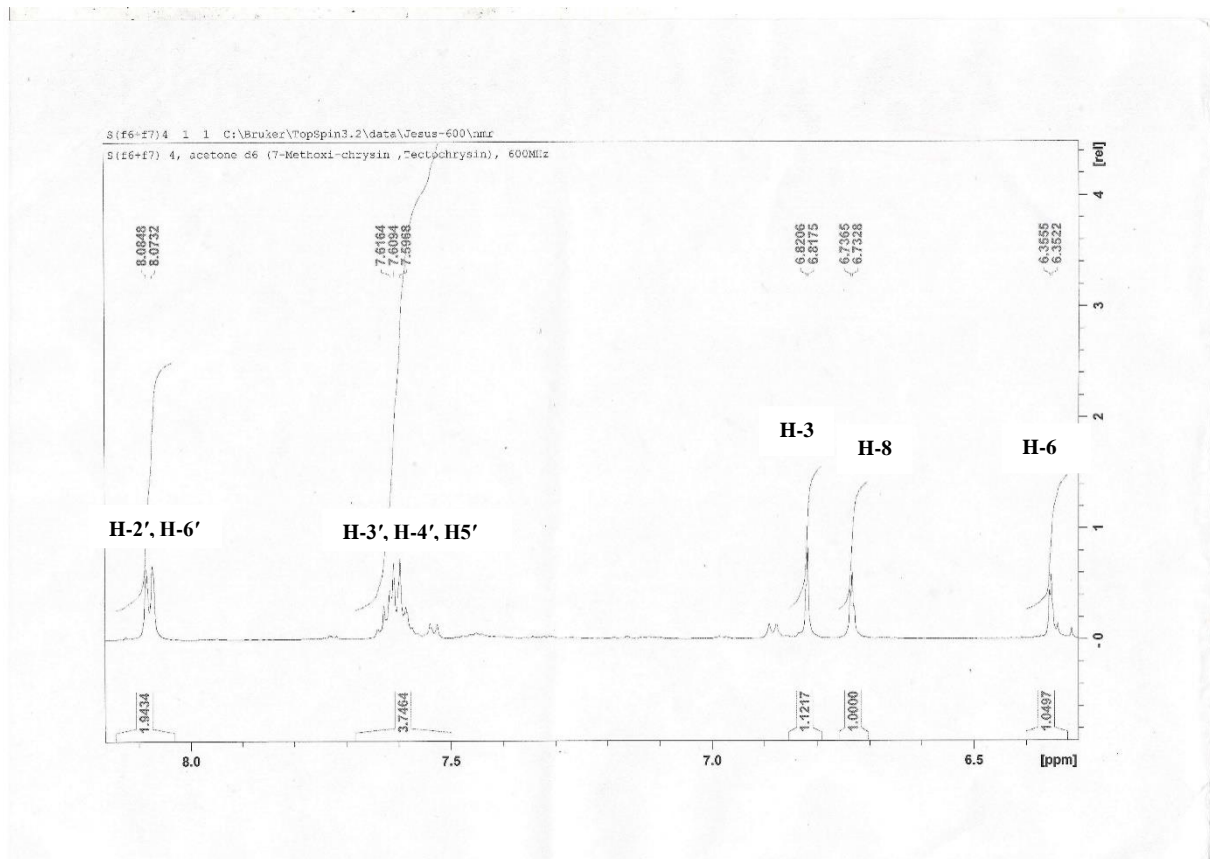


Figure-39 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acetone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA1



**Figure-40 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acetone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA1 (étalement)**

Sur le spectre RMN-<sup>13</sup>C (figure-41) nous observons des signaux situés dans la zone 127,3 ppm et 132,8 ppm correspondant à ceux du cycle A (C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), trois carbones à  $\delta = 104,3$  ppm,  $\delta = 98,9$  ppm et  $\delta = 93,5$  ppm correspondant à des CH (C-3, C-6 et C-8 respectivement), un signal à  $\delta = 162,8$  ppm attribuable à un carbone porteur d'un groupement OH (C-5), cinq carbones quaternaires à 183,2, 164,9, 163,1, 158,9, 106,4 correspondant à (C-4, C-7, C-2, C-9 et C-10 respectivement) et enfin un signal relatif à un groupement CH<sub>3</sub> à  $\delta = 56,5$  attribuable à un groupement méthoxyle.

Les données relatives au spectre RMN-<sup>13</sup>C de ce composé sont représentées dans le tableau-21 suivant :

Tableau-21: Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PCA1.

Carbone	Déplacement chimique
2	163,1
3	104,3
4	183,2
5	162,8
6	98,9
7	164,9
8	93,5
9	158,9
10	106,4
1'	132,8
2',6'	127,3
3',5'	129,5
4'	130
OMe	56,55

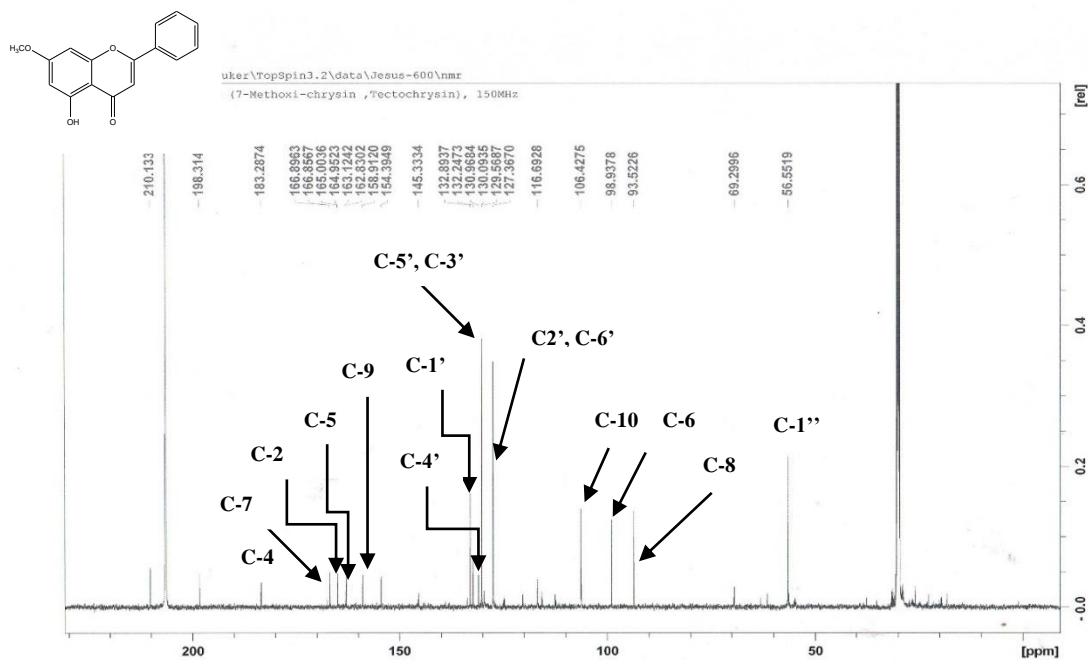
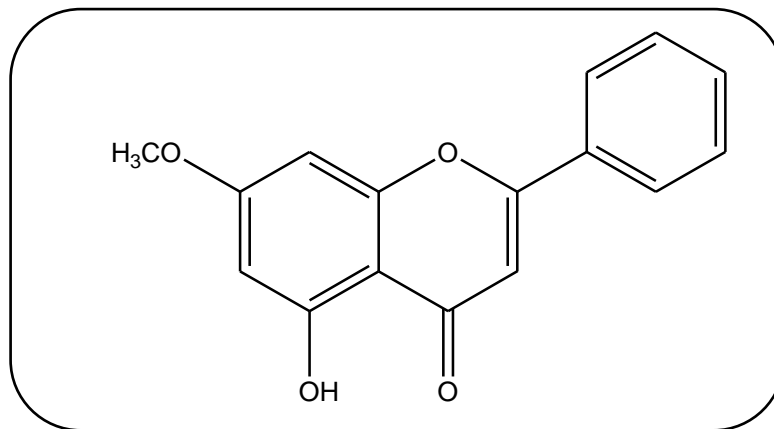


Figure-41 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone d-6, δ ppm) du composé PCA1.



L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure : 7-méthoxy-5-hydroxy flavone (techtochrysin) **figure-42**. Nos résultats sont en accord avec la littérature (**Sutthanut K et al. 2007**).



**Figure-42 :7-méthoxy-5-hydroxy flavone (techtochrysin)**

### III-2-1-2-Élucidation structurale du composé PCA2

Ce composé se présente sous forme de précipité jaune soluble dans le MeOH et l'acétone. La fluorescence violette sous UV et la valeur de Rf 0.23 et 0.53 dans les systèmes n-hexane/ ACOEt (8 :2) et EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 :3) respectivement et sont en faveur d'une structure d'un flavonoïde de type aglycone.

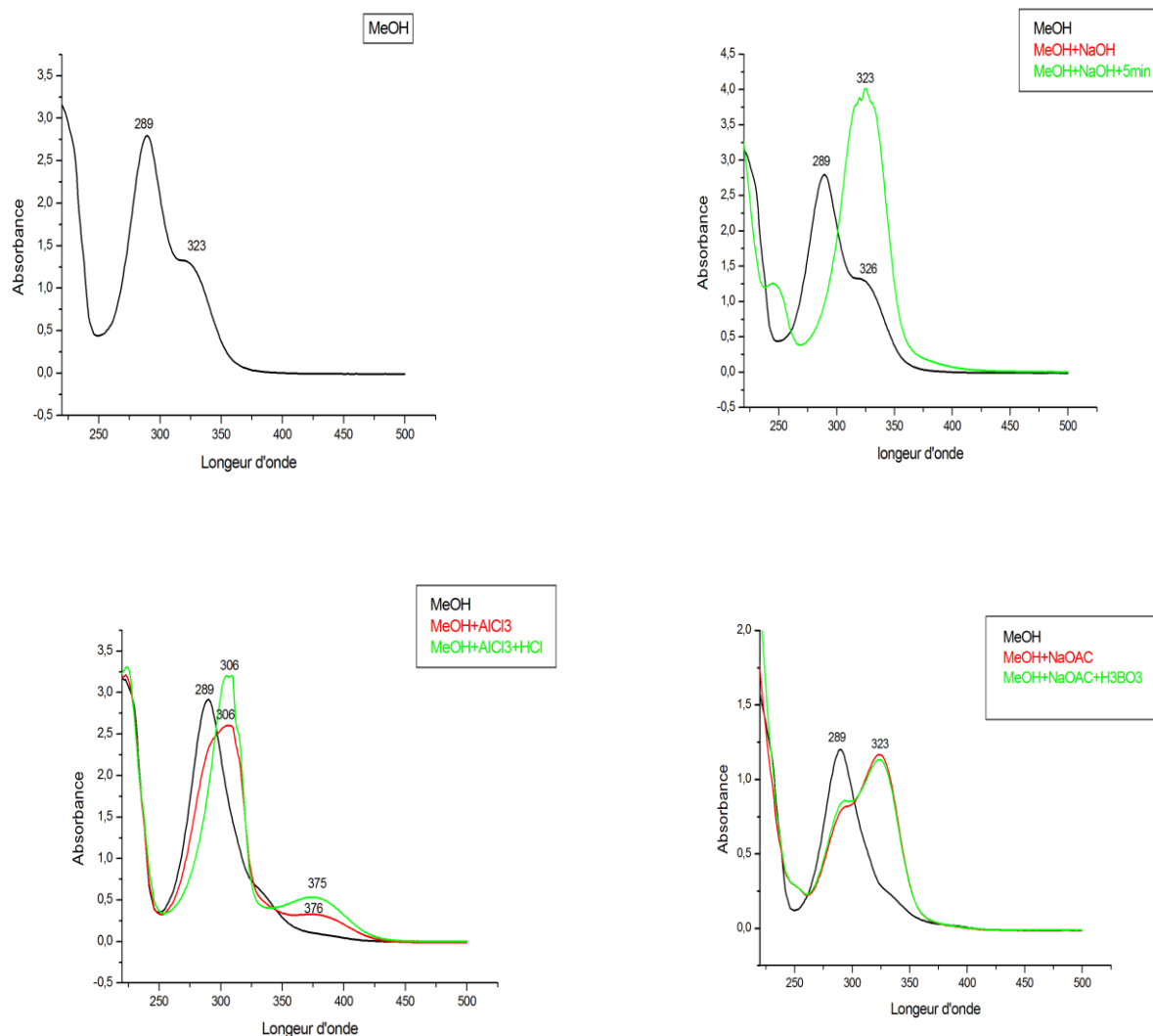
Le spectre UV-visible présente une bande d'absorption à 289 nm et un épaulement aux environs de 326 nm caractéristiques d'une structure de type flavanone ou dihydroflavonol.

Le déplacement bathochrome de 34 nm de la bande II dans le spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport à celui du méthanol indique la présence d'un hydroxyle libre en position 7. Cette hypothèse est confirmée par le déplacement bathochrome de 34 nm avec augmentation de l'intensité de la même bande du spectre enregistré en présence de NaOH par rapport au spectre méthanolique.

La présence de l'hydroxyle libre en position 5 est suggérée par le déplacement bathochrome de 17 nm de la bande II du spectre enregistré dans AlCl<sub>3</sub>+HCl par rapport au spectre méthanolique.

La comparaison entre le spectre AlCl<sub>3</sub> et AlCl<sub>3</sub>+HCl au niveau de la bande II (pas d'effet bathochrome) montre l'absence d'un système ortho di-OH, ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I après l'addition de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par rapport au spectre MeOH.

Les résultats sont résumés dans le tableau-22 et présentés dans la figure-43.



**Figure-43 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA2**

Le spectre de masse (figure-44) en impact électronique EI-MS montre un pic moléculaire correspondant à une masse moléculaire de 256 compatible avec la formule brute  $C_{15}H_{12}O_4$ . Ce composé possède donc 2 groupements hydroxyles. Ces derniers se trouvent en position 5 et 7 ce qui nous permet d'identifier ce composé comme étant la dihydrochysine.

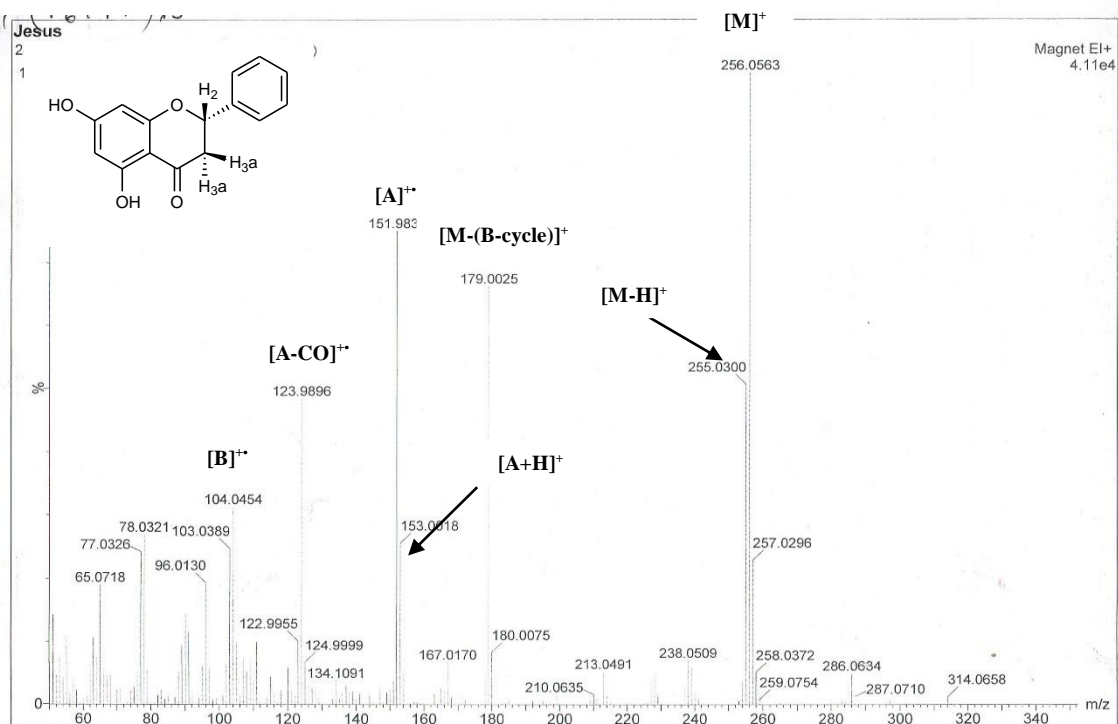
Le tableau-22 suivant rassemble les données des différents fragments de ce composé.

**Tableau-22 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé**

**PCA2**

Fragments	$m/z$
$[M]^{+\bullet}$	256
$[M-H]^+$	255
$[M-(\text{cycle B})]^+$	179

[A] <sup>++</sup>	152
[A+H] <sup>+</sup>	153
[A-CO] <sup>++</sup>	124
[B] <sup>++</sup>	104



**Figure-44 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA2**

Les signaux présents sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H (Figure-45,46, Tableau-23) du composé PCA2, et particulièrement dans la région de protons aromatiques renforcent l'hypothèse de la présence d'un squelette flavonoïde, cela est expliqué par le déplacement chimique et les constantes de couplage de protons du cycle A et ceux du cycle B.

- Un doublet d'intégration 2H à  $\delta = 7,6$  ppm ( $J = 6,9$  Hz) caractéristiques des protons en couplage ortho attribués aux protons H-2', H- 6'
- Un multiplet d'intégration 3H à  $\delta = 7,24-7,40$  ppm caractéristiques les protons H-3', H-4', H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6$  ppm avec constante de couplage ( $J = 2,1$ ) correspondant au proton H-8.

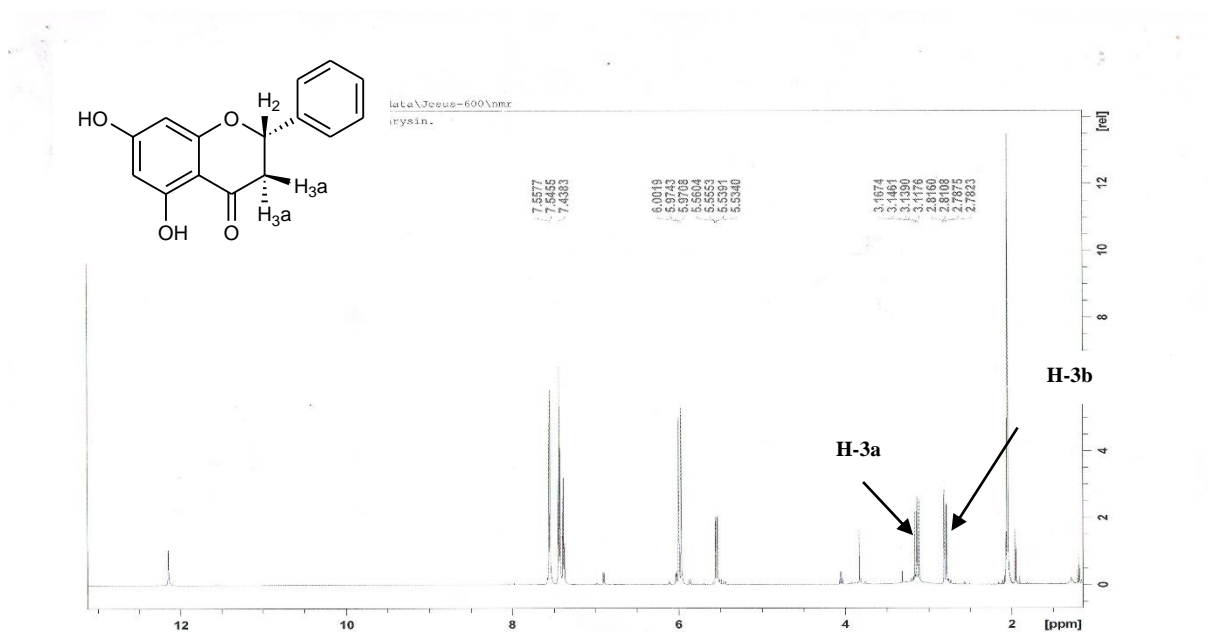
- Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à  $\delta = 5,98$  ppm avec constante de couplage ( $J=2.1$ ) correspondant au proton H-6.

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H du composé PCA2 présente aussi :

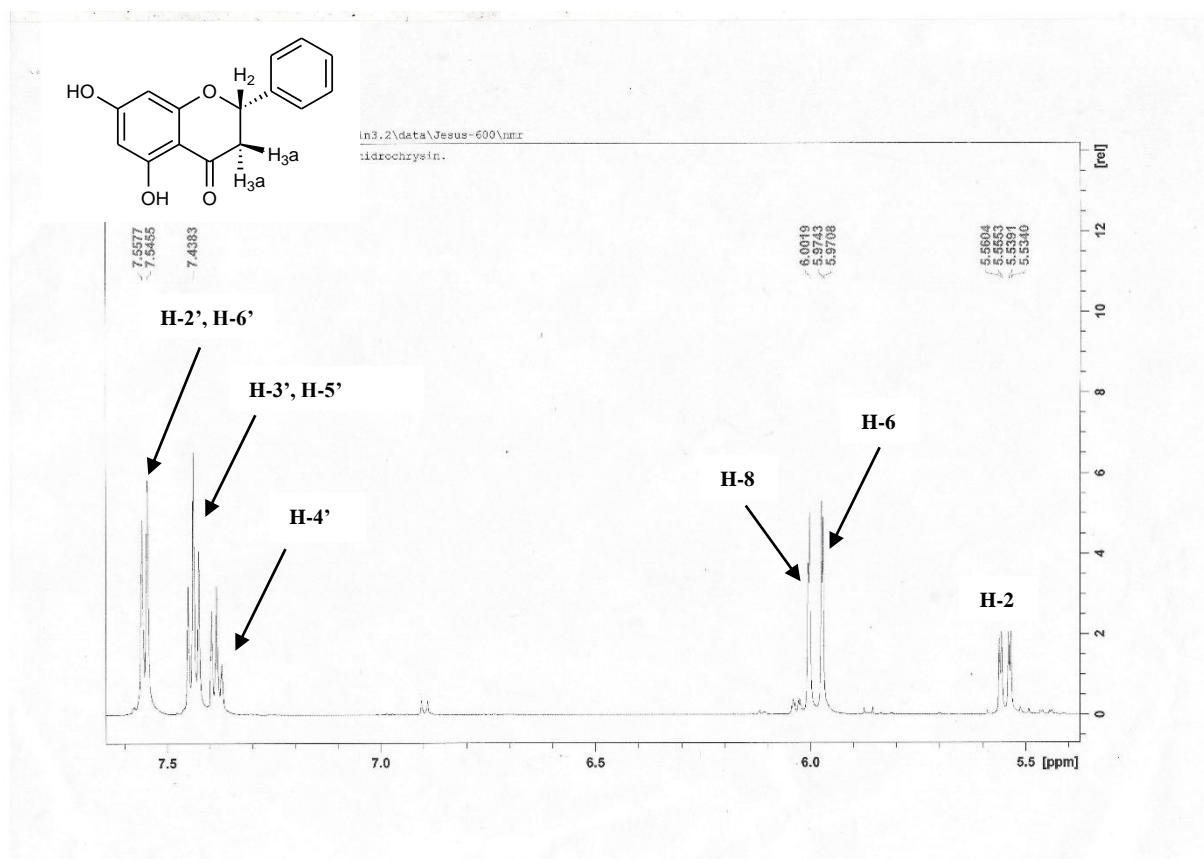
- Un doublet dédoublé à 5,52 ppm d'intégration 1H avec les constantes de couplage  $J = 12,7$  et 3 Hz correspondant au proton H-2.
- Deux doublet dédoublé apparaissent à 3.1 ppm ( $J = 17,1, 12,8$  Hz), et 2,78 ppm ( $J = 17,1, 3,12$  Hz) caractéristique des protons H-3a et H-3b d'une flavanone.

**Tableau-23 : Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCA2.**

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	$J$ (Hz)	Attribution
7,6	d	2H	7,3	H-2', H-6'
7,24-7,40	m	3H	-	H-3', H-4', H5'
6	d	1H	2,1	H-8
5,98	d	1H	2,1	H-6
5,52	dd	1H	12,7, 3	H-2
3,1	dd	1H	17,1, 12,8	H-3a
2,78	dd	1H	17,1, 3,12	H-3b



**Figure-45 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acetone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA2**



**Figure-46 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acetone d-6, δ ppm) du composé PCA2 (étalement)**

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C (Figure-47) enregistré dans l'acétone à 150 MHz révèle la présence de 15 atomes de carbones, nous observons des signaux situés dans la zone [127,46- 140,21ppm] correspondent aux groupements CH du cycle B [C-1', C-2', C-3', C-4', C-5'et C-6'] , les autres signaux sont attribués d'une part aux groupements du cycle A [C-6 (97,09ppm),C-8 (96,12ppm),C-5 (165,2ppm), C-7 (167,5ppm) , C-9 (164,3ppm) et C-10 (103,3ppm)] et d'autre part à ceux du cycle C [ C-2(80,11 ppm) , C-3 (43,8 ppm) et C-4 (196,8 ppm) ].

Toutes les données relatives au spectre RMN-<sup>13</sup>C concernant le composé **PCA2** sont regroupées dans le tableau-24 sous mentionné :

**Tableau-24 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PCA2.**

Carbone	Déplacement chimique
2	80,1
3	43,8
4	196,8
5	165,2

6	97
7	167,5
8	96,12
9	164,3
10	103,3
1'	140,2
2',6'	127,4
3',5',4'	129,6

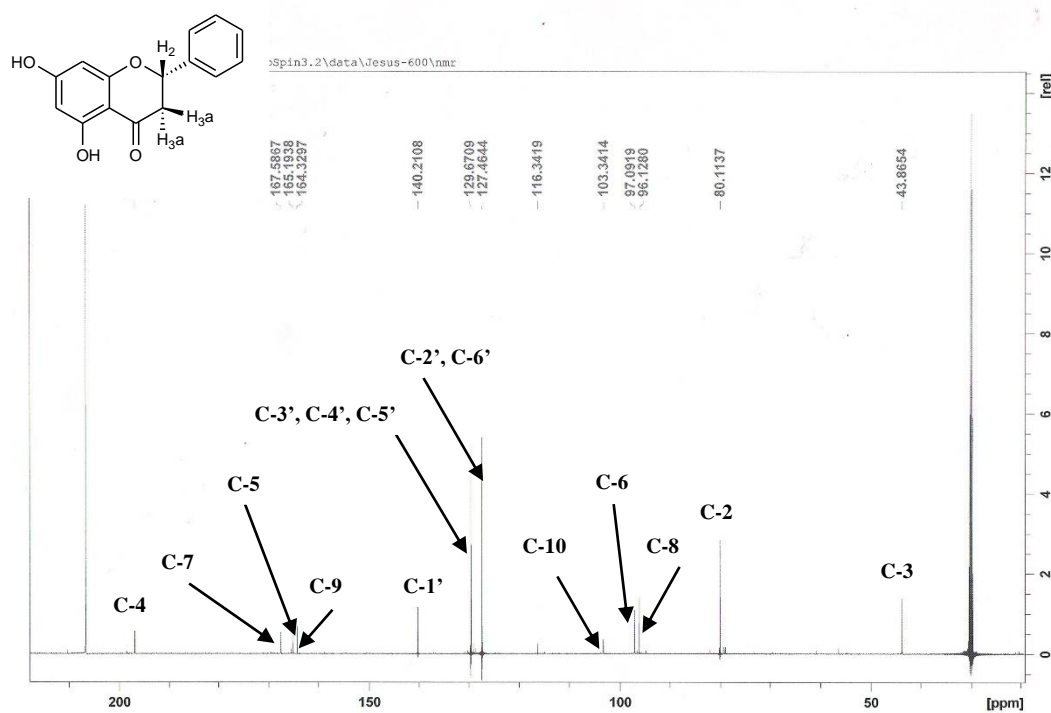


Figure-47 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA2.

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure : 5,7-dihydroxy-flavone (Pinocembrine) (Figure-48). Nos résultats sont en accord avec la littérature (Bertelli et al 2012)

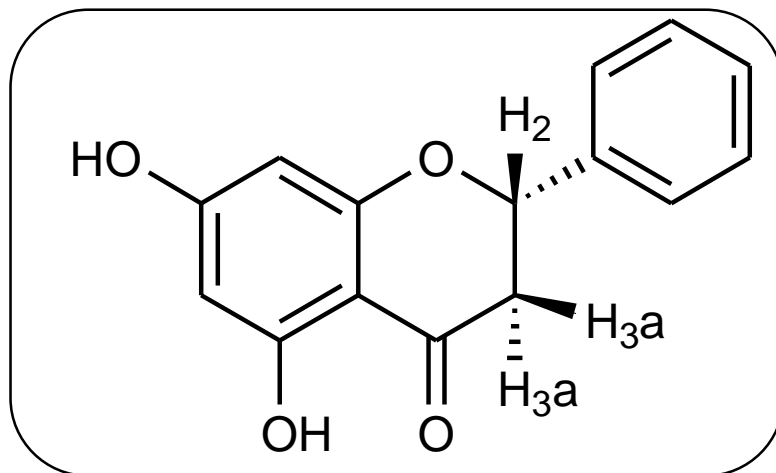


Figure-48 : 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine).

### III-2-1-3-Élucidation structurale du composé PCA3

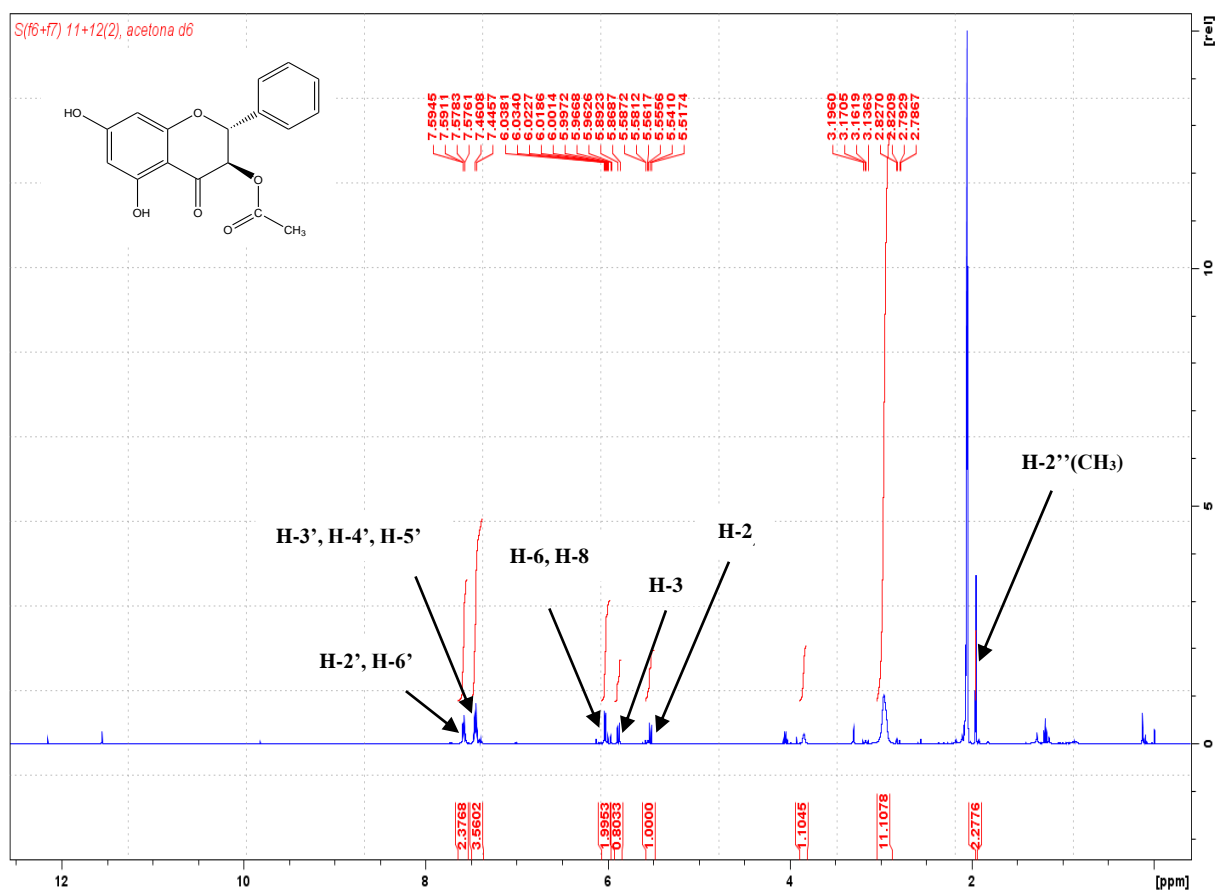
Ce produit soluble dans l'acétone apparaît sous forme d'une monotache qui absorbe sous UV à 254 et 365nm. Après révélation la couleur est jaune et la valeur de  $R_f = 0.35$  dans le système n-hexane/ AcOet (7 :3).

Le spectre RMN- $^1\text{H}$  enregistré dans l'acétone- $d_6$  (Figure-49 tableau-26) donne les indications suivantes :

- Un doublet dédoublé d'intégration 2H à 7,6 ppm avec une constante de couplage  $J=9$  et 2 Hz, correspondant aux protons H-2' et H-6'.
- Un multiplet d'intégration 3H à 7,4 ppm correspondant aux protons H-3', H-4' et H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H à 6 ppm avec une constante de couplage  $J=2.1$  Hz, correspondant au proton H-8.
- Un doublet d'intégration 1H à 5.96 ppm avec une constante de couplage  $J=2.1$  Hz, correspondant au proton H-6.
- Un doublet d'intégration 1H à 5,9 ppm avec une constante de couplage  $J= 11,7$  Hz, correspondant au proton H-3.
- Un doublet d'intégration 1H à 5.5 ppm avec une constante de couplage  $J= 11,7$  Hz, correspondant au proton H-2.
- Un singulet à 2 ppm intégrant 3H attribué au groupement  $\text{CH}_3$ .

Tableau-25 : Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCA3.

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.6	dd	2H	9,2	H-2', H-6'
7.4	m	3H	-	H-3', H-4', H5'
6	d	1H	2.1	H-8
5.96	d	1H	2.1	H-6
5.9	d	1H	11.7	H-3
5.5	d	1H	11.7	H-2
2	s	3H	-	H-2'' (CH <sub>3</sub> )


 Figure-49 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acétone d-6, δ ppm) du composé PCA3

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C (Figure-50) du composé PCA3, présente 17 signaux dont 6 résonant à : 136,96 ppm (C-1'), 130,23 ppm (C-4'), 129,5 ppm (C-3' et C-5'), 128,5 ppm (C-2' et C-6') sont attribuable aux carbones du cycle B.



Quatre signaux à 81,2 ppm, 72,5 ppm, 97,4 ppm, 95,9 ppm relatifs au groupement –CH du cycle A et C.

Un signal à 20,2 ppm correspond au groupement CH<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>C-C=O).

Six signaux relatifs au carbone quaternaire à 191,52 ppm (C-4), 164,5 ppm (C-5), 165,28 ppm (C-7), 162,5 ppm (C-9), 101,1 ppm (C-10), 169,52 ppm C-1'' (O-C=O).

Toutes les données relatives au spectre RMN-<sup>13</sup>C concernant le composé PCA3 sont regroupées dans le tableau-26 sous mentionné :

**Tableau-26 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PCA3.**

Carbone	Déplacement chimique
2	81,3
3	72,5
4	191,6
5	164,5
6	97,4
7	165,28
8	95,9
9	162,5
10	101,9
1'	136,96
4'	130,23
2',6'	128,5
3',5'	129,5
1''	169,52
2''	20,2

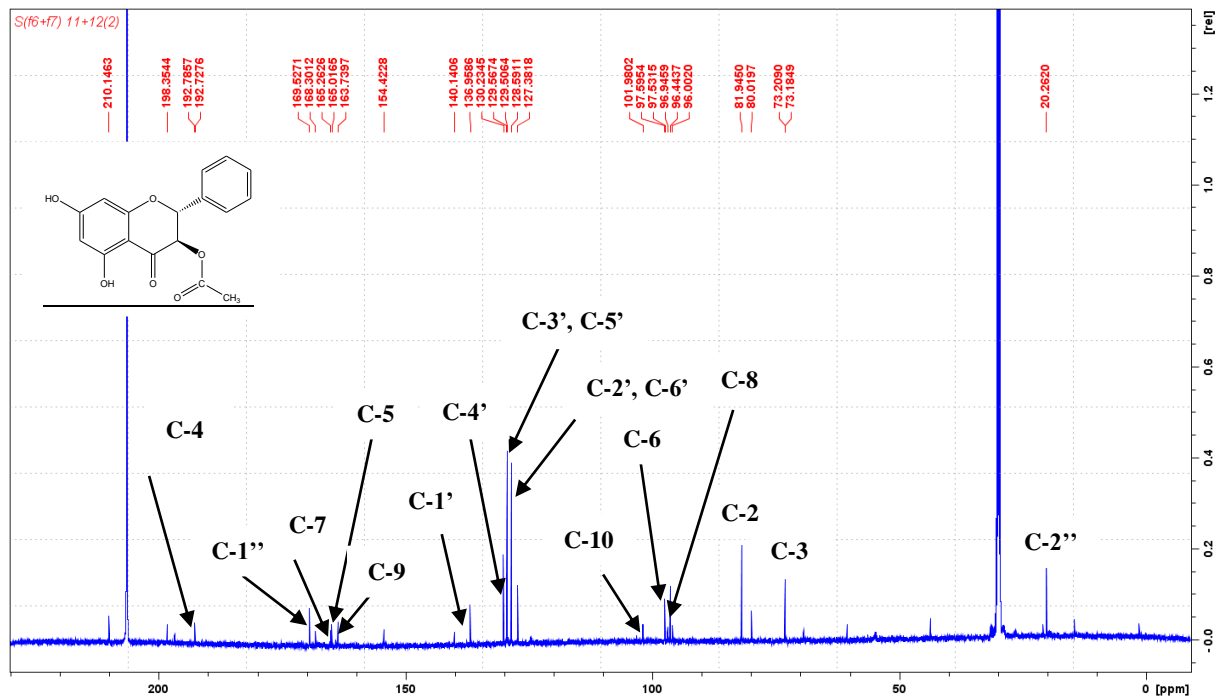


Figure-50 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA3.

Le spectre Cosy du composé PCA3 (figure-51) permet de déterminer rapidement les connectivités suivantes :

- Une tache de corrélation entre les deux protons H-2 à  $\delta = 5,5$  ppm et H-3 à  $\delta = 5,9$  ppm
- Une tache de corrélation entre H-6 et un proton résonnant sous forme d'un doublet à  $\delta = 6,1$  ppm attribuable à H-8
- Une tache de corrélation entre (H-2', H-6') à  $\delta = 7,6$  ppm et (H-3', H-4', H-5') à  $\delta = 7,4$  ppm.
- Les 3H de groupement CH<sub>3</sub> corrélient entre eux à  $\delta = 2$  ppm.

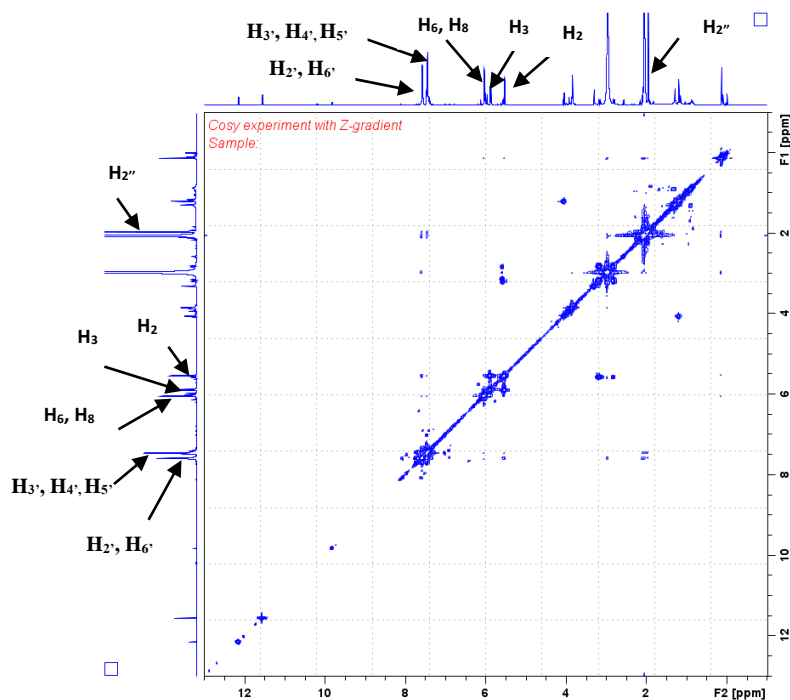


Figure-51 : Spectre COSY du composé PCA3

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (figure-52) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants :

- Le H-2'' permet l'attribution du signal à  $\delta = 20.2$  ppm à l'atome de carbone C-2''.
- Le H-3 permet l'attribution du signal à  $\delta = 72.5$  ppm à l'atome de carbone C-3.
- Le H-2 permet l'attribution du signal à  $\delta = 81.3$  ppm à l'atome de carbone C-2.
- Les H-6 et H-8 permettent l'attribution des signaux à  $\delta = 95.9$  ppm et  $97.4$  ppm aux atomes de carbones C-8 et C-6.
- Les H-2' et H-6' permettent l'attribution du signal à  $\delta = 128.5$  ppm aux atomes de carbones C-2', 6'.
- Les H-3', 4', 5' permettent l'attribution du signal à  $\delta = 129.5$  ppm aux atomes de carbone C-3', 5' et le signal à  $\delta = 130.2$  ppm au carbone C-4'.

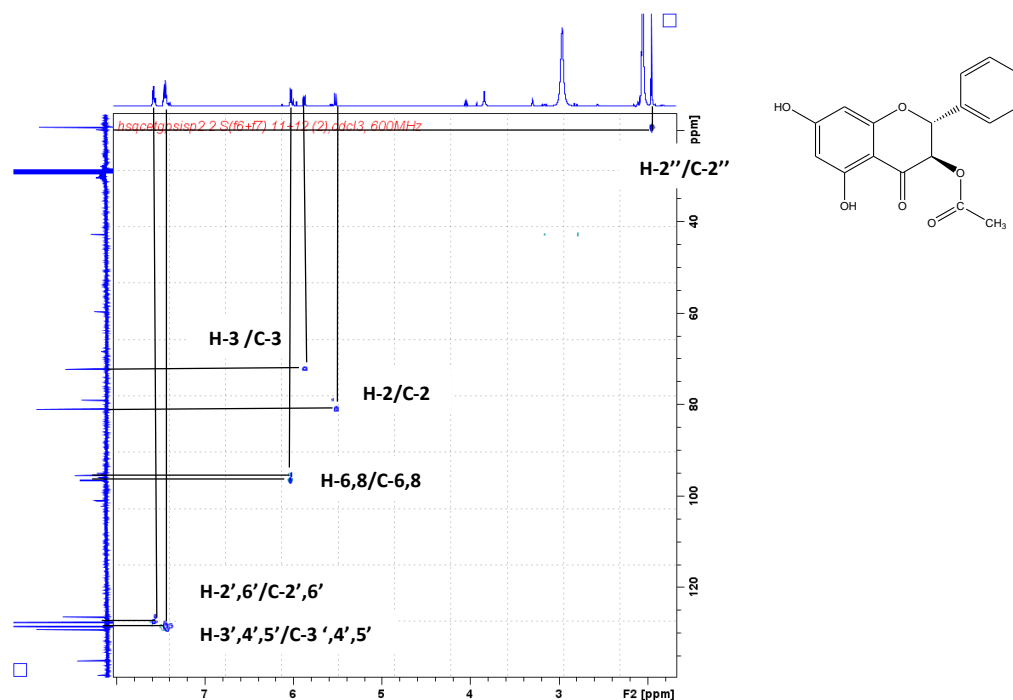


Figure-52 : Spectre HSQC du composé PCA3

Le spectre HMBC du composé PCA3 (figure-53) nous permet d'observer les couplages longues distances entre :

- Le proton H-2'' résonnant à 2 ppm et les carbones C-2'', C-1'' et C-3.
- Le proton H-2 résonnant à 5.5 ppm et les carbones C-2, C-3, C-4, C-1' et C-2',6'.
- Le proton H-3 résonnant à 5.9 ppm et les carbones C-3, C-2, C-4, C-1'' et C-1'.
- Le proton H-6, H-8 résonnant à 6.1 ppm et les carbones C-6, C-8, C-5, C-7, C-9, C-10 et C-3.
- Le proton H-3', H-4', H-5' résonnant à 7.4 ppm et les carbones C-3',5', C-4', C-2',6', C-1'.
- Le proton H-2',6' résonnant à 7.6 ppm et les carbones C-2',6', C-3',5', C-4', C-1'.
- Le proton H-5 résonnant à 12.16 ppm et les carbones C-5, C-6 et C-10.
- Le proton H-7 résonnant à 11.55 ppm et les carbones C-7, C-6 et C-5,C-10

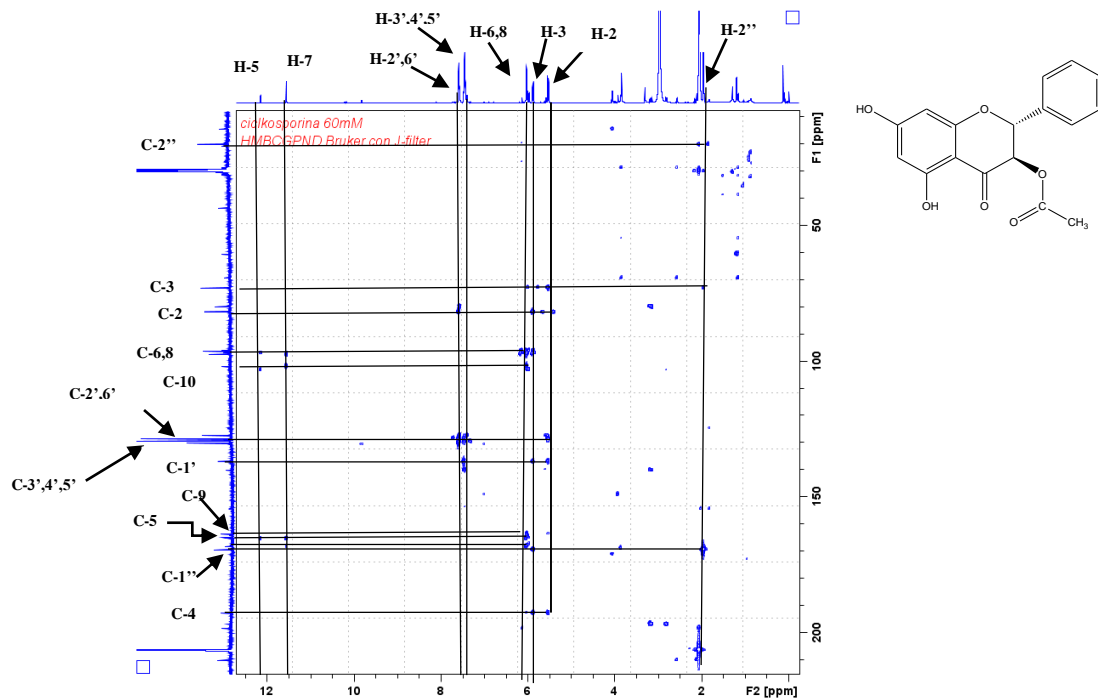


Figure-53 : Spectre HMBC du composé PCA3

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure : Pinobanksin-3-acétate figure-54. Nos résultats sont en accord avec la littérature (**Fang et al. 1988**).

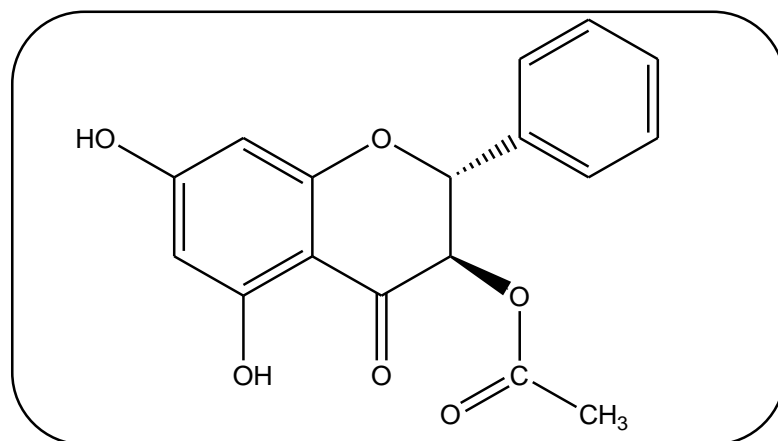


Figure-54 : Pinobanksin-3-acétate

#### III-2-1-4-Élucidation structurale du composé PCA4

Ce produit est soluble dans le méthanol et l'acétone et absorbe sous UV à 245 et 365 nm. La fluorescence jaune sous UV ainsi que les valeurs de Rf 0.35 et 0.4 dans les systèmes n-hexane/ACOEt (8 :2) et EP/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 :3) suggèrent que ce produit est un flavonoïde aglycone.

Le spectre UV-visible présente dans le méthanol deux bandes d'absorption maximales à 266 nm et 359 nm indique qu'il s'agit probablement d'un flavonoïde de type flavonol (3-OH)

Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda=+47\text{nm}$ ) du spectre enregistré en présence de NaOH avec diminution de l'intensité indique la présence d'un OH libre en position 3 et l'absence du OH en position 4'.

Le déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda=+10\text{nm}$ ) du spectre enregistré en présence de NaOAc indique la présence d'un OH libre en position 7.

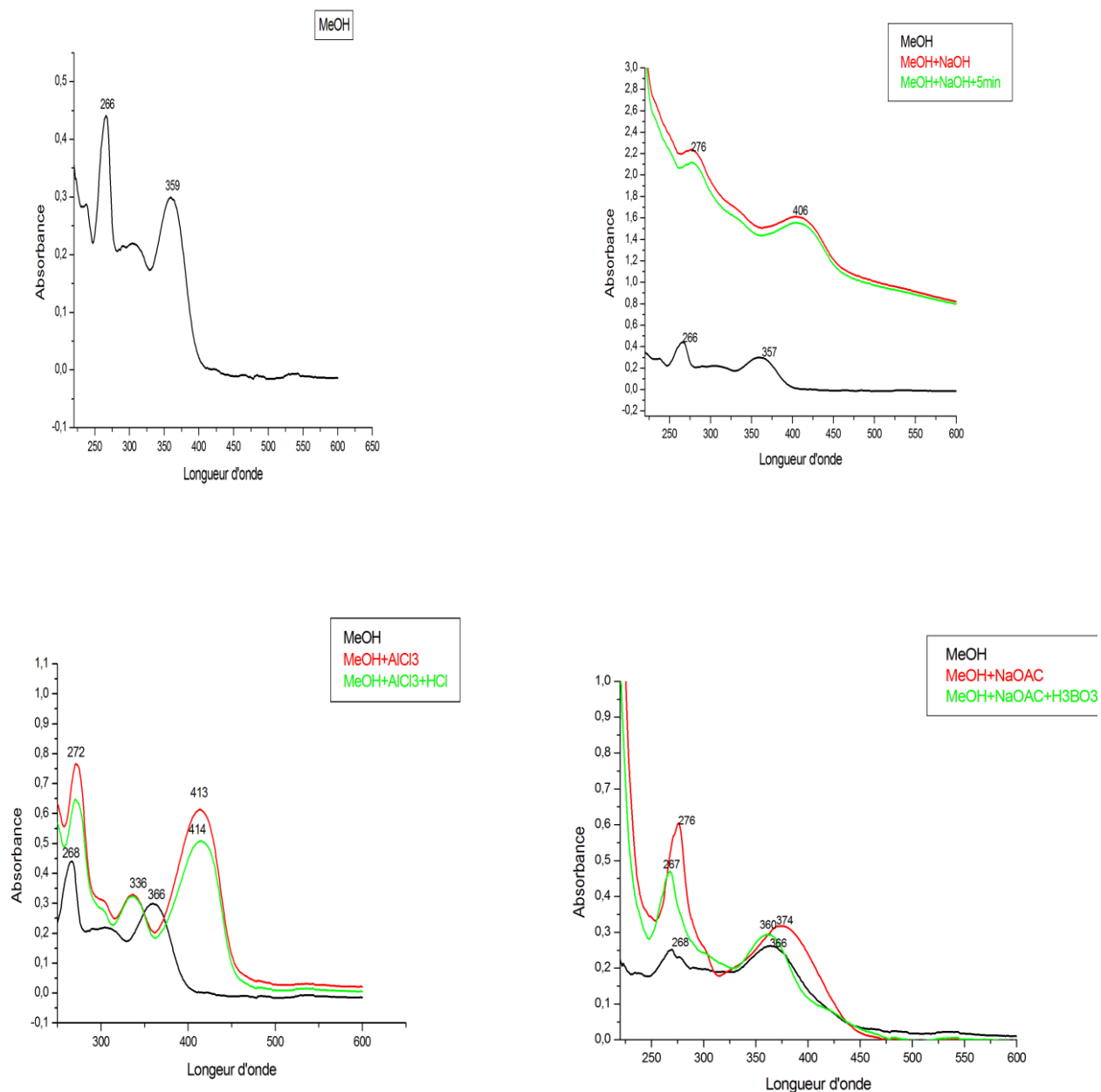
Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda=+55\text{ nm}$ ) enregistré dans le milieu  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol suggère la présence d'un OH libre en position 5.

La comparaison entre le spectre  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  au niveau de la bande I montre l'absence d'un système ortho di-OH. Cette suggestion est confirmée par l'absence d'effet bathochrome de la bande I après l'addition de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  par rapport au spectre MeOH.

Les résultats sont résumés dans le tableau-27 et présentés dans la figure-55.

**Tableau-27 : Données de la série spectrale UV du composé PCA4**

Réactif	Bande	Bande	Déplacement	Interprétation
	I	II		
MeOH+PCA4	359	266	-	Flavonol (3-OH)
MeOH+PCA4+NaOH	406	276	+47	3-OH
MeOH+PCA4+ $\text{AlCl}_3$	413	272	-	Pas d'ortho-di-OH
MeOH+PCA4+ $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$	414	272	+55	5-OH
MeOH+PCA4+NaOAc	374	276	+10	7-OH
MeOH+PCA4+NaOAc+ $\text{H}_3\text{BO}_3$	360	267	-	Pas d'ortho-di-OH

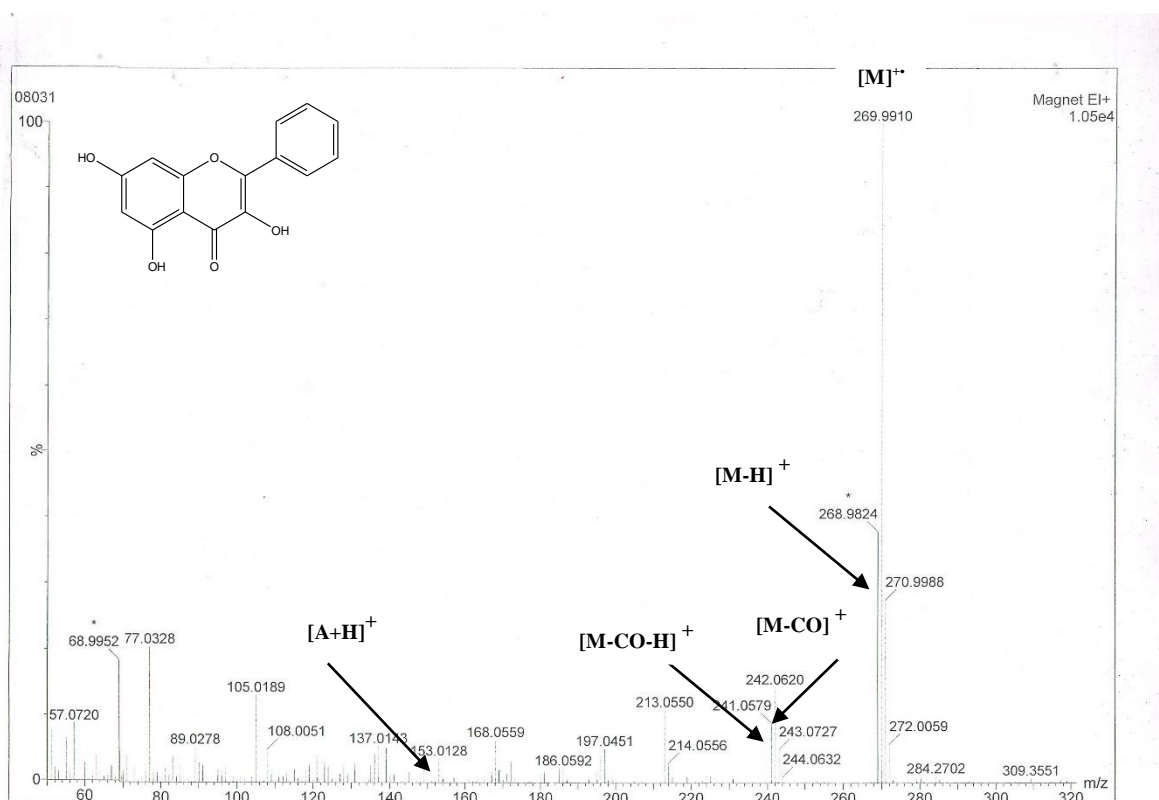


**Figure-55 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA4**

Le spectre de masse en impact électronique EI-MS (figure-56) montre un pic moléculaire  $[M^{+}]$  à  $m/z=270$  avec une intensité de 100% correspond à une formule moléculaire  $C_{15}H_{10}O_5$  indiquant ainsi un squelette du flavonol. La présence du pic à  $m/z = 242$  correspond à  $[M-CO]^+$ , de même le pic à  $m/z = 141$  correspond à  $[M-CO-H]^+$ , le pic à  $m/z = 153$  correspond à  $[A+H]^+$ . Le tableau-28 suivant rassemble les données des différents fragments de ce composé.

**Tableau-28 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA4**

Fragments	$m/z$
$[M]^{++}$	270
$[M-H]^+$	269
$[M-CO]^+$	242
$[M-CO-H]^+$	241
$[A+H]^+$	153


**Figure-56 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA4**

L'examen du spectre RMN- $^1H$  enregistré dans l'acétone- $d_6$  à 600 MHz (Figure-57, 58) montre :

- Un doublet qui apparaît à  $\delta = 8,2$  ppm d'intégration 2H avec une constante de couplage  $J=7,6$  Hz attribuable aux protons H-2' et H-6'.
- Un multiplet d'intégration 3 H à  $\delta = 7,6-7,5$  ppm attribuable aux protons H-3', H-4' et H-5'.



- Deux doublets le premier à  $\delta = 6,20$  ppm et le second à  $\delta = 6,19$  ppm d'intégration 1H chacun avec une constante de couplage de  $J=2,1$ Hz attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement.

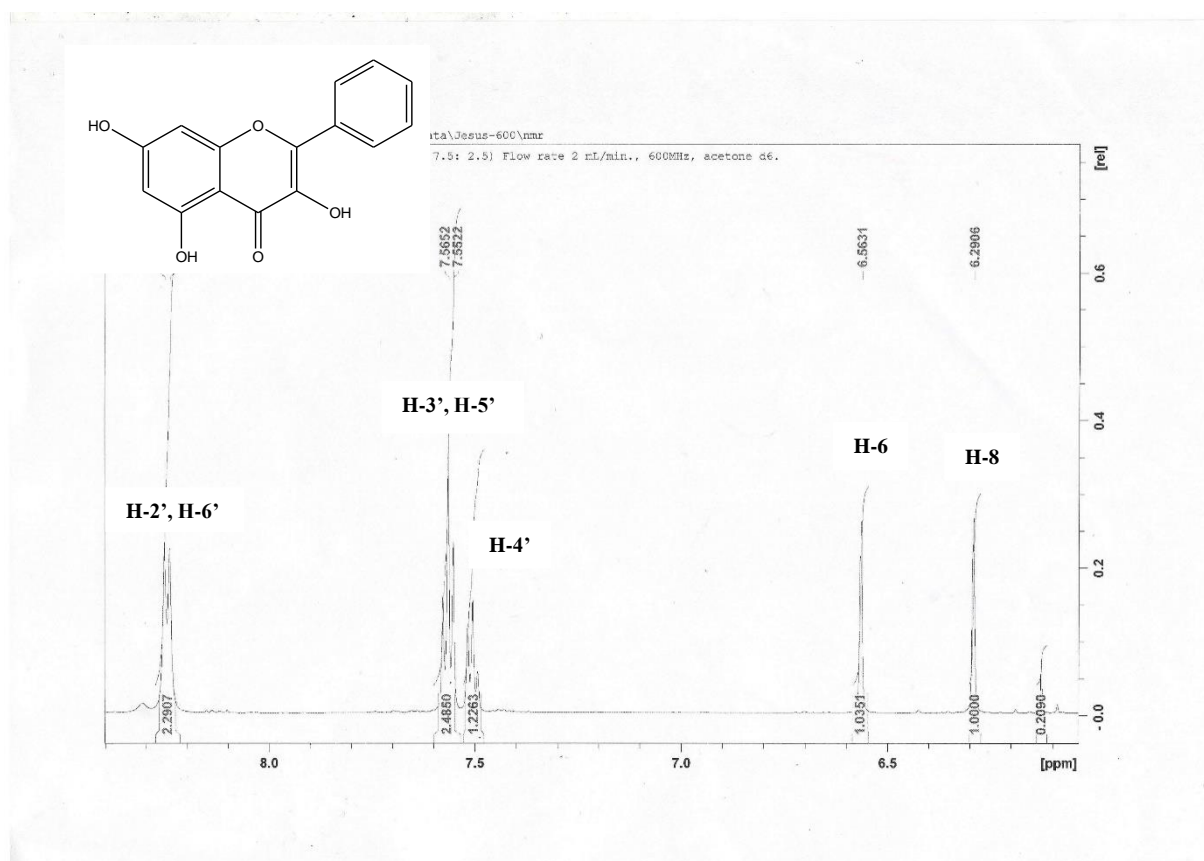
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau-29.

**Tableau-29 : Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCA4**

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	$J$ (Hz)	Attribution
8,2	d	2H	7,6	H-2', H-6'
7,6-7,5	m	3H	-	H-3', H-4', H5'
6,2	d	1H	2,1	H-6
6,19	d	1H	2,1	H-8



**Figure-57 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acétone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA4**



**Figure-58 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acétone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA4 (étalement)**

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C (Figure-59) confirme la structure par les signaux caractéristiques suivant : à  $\delta = 198,9$  ppm (C-4),  $\delta = 165,3$  ppm (C-7),  $\delta = 162,2$  ppm (C-5),  $\delta = 158,1$  ppm (C-9),  $\delta = 146,1$  ppm (C-2),  $\delta = 138$  ppm (C-3),  $\delta = 132,2$  ppm (C-1'),  $\delta = 130,9$  ppm (C-4'),  $\delta = 129,4$  ppm (C-3', C-5'),  $\delta = 128,5$  ppm (C-2', C-6'),  $\delta = 104,3$  ppm (C-10),  $\delta = 99,26$  ppm (C-6),  $\delta = 94,65$  ppm (C-8), et  $\delta = 80,11$  ppm (C-2).

Les résultats du spectre RMN-<sup>13</sup>C, déplacements chimiques et l'attribution des signaux sont résumés dans le tableau-30 :

**Tableau-30 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PCA4.**

Carbone	Déplacement chimique
2	146,1
3	138
4	198,9
5	162,2
6	99,26

7	165,3
8	94,65
9	158,1
10	104,3
1'	132,2
4'	130,9
2',6'	128,5
3',5'	129,4

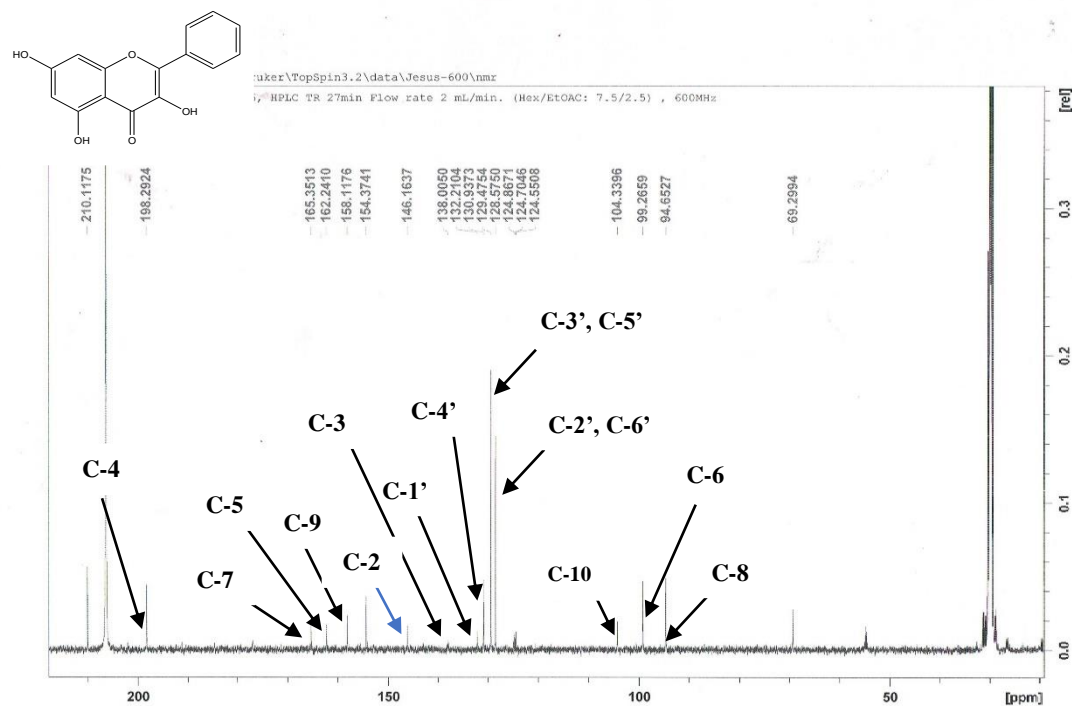


Figure-59 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone d-6, δ ppm) du composé PCA4

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure : 3, 5,7- trihydroxyflavone (galangine) (Figure-60). Nos résultats sont en accord avec la littérature (Bertelli et al. 2012).

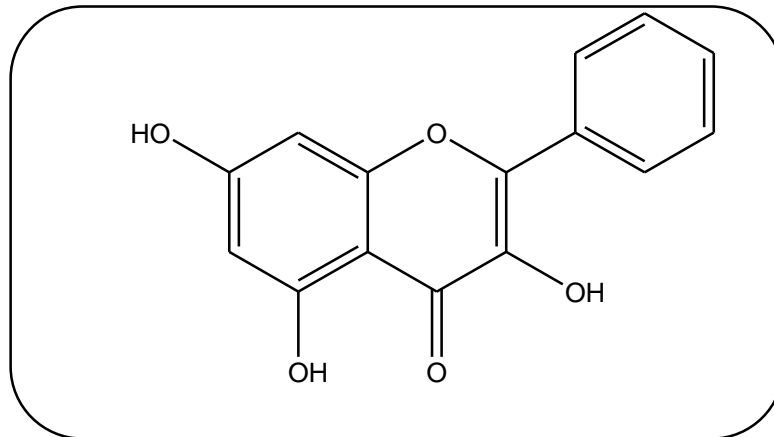


Figure-60 : 3, 5,7 trihydroxyflavone (Galangine)

### III-2-1-5-Élucidation structurale du composé PCA5

Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le MeOH et l'acétone qui absorbe sous UV à 254 et 365nm. La couleur est jaune après révélation.

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood et les valeurs de Rf 0.64 et 0.4 dans les systèmes n-hexane / ACOEt (1 :1) et cyclohexane / Et<sub>2</sub>O (6 :4) indiquent que ce composé est un flavonoïde de type aglycone.

Le spectre UV-visible présente deux bandes d'absorption à 268 et 318 nm caractéristiques d'une structure flavone.

L'apparition d'une nouvelle bande à 330 nm dans le spectre enregistré en présence de NaOH indique la présence d'un hydroxyle en position 7. Ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de 4 nm de la bande II du spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport au spectre méthanolique.

Le déplacement bathochrome de 47 nm de la bande I du spectre AlCl<sub>3</sub> + HCl par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I du spectre AlCl<sub>3</sub> + HCl par rapport à celui enregistré en présence d'AlCl<sub>3</sub> indique l'absence d'un système ortho dihydroxyle sur le noyau B.

Les résultats sont résumés dans le tableau-31 et présentés dans la figure-61.

Tableau-31 : Données de la série spectrale UV du composé PCA5

Réactif	$\lambda$ max (nm)			Déplacement nm	Interprétation
	Bande I	Autre bande	Bande II		
MeOH	318	-	268	-	Flavone
MeOH+NaOH	384	330	280	-	7-OH
MeOH+ AlCl3	365	-	276	-	Pas d'ortho-di-OH
MeOH+ AlCl3+HCl	365	-	276	+47	5-OH
MeOH+NaOAC	351	-	272	+4	7-OH
MeOH+NaOAC+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	330	-	268	-	Pas d'ortho-di-OH

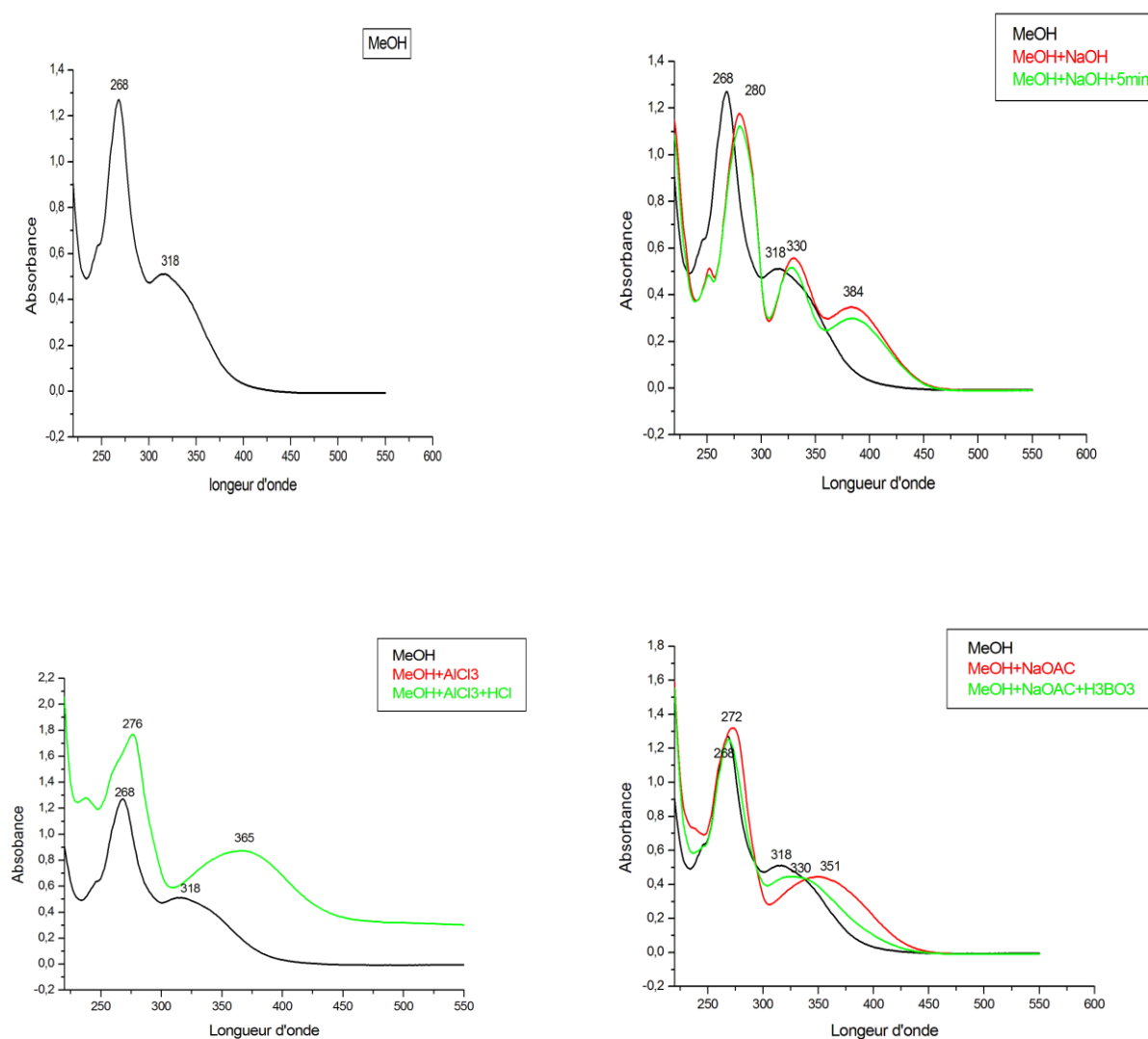


Figure-61 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PCA5

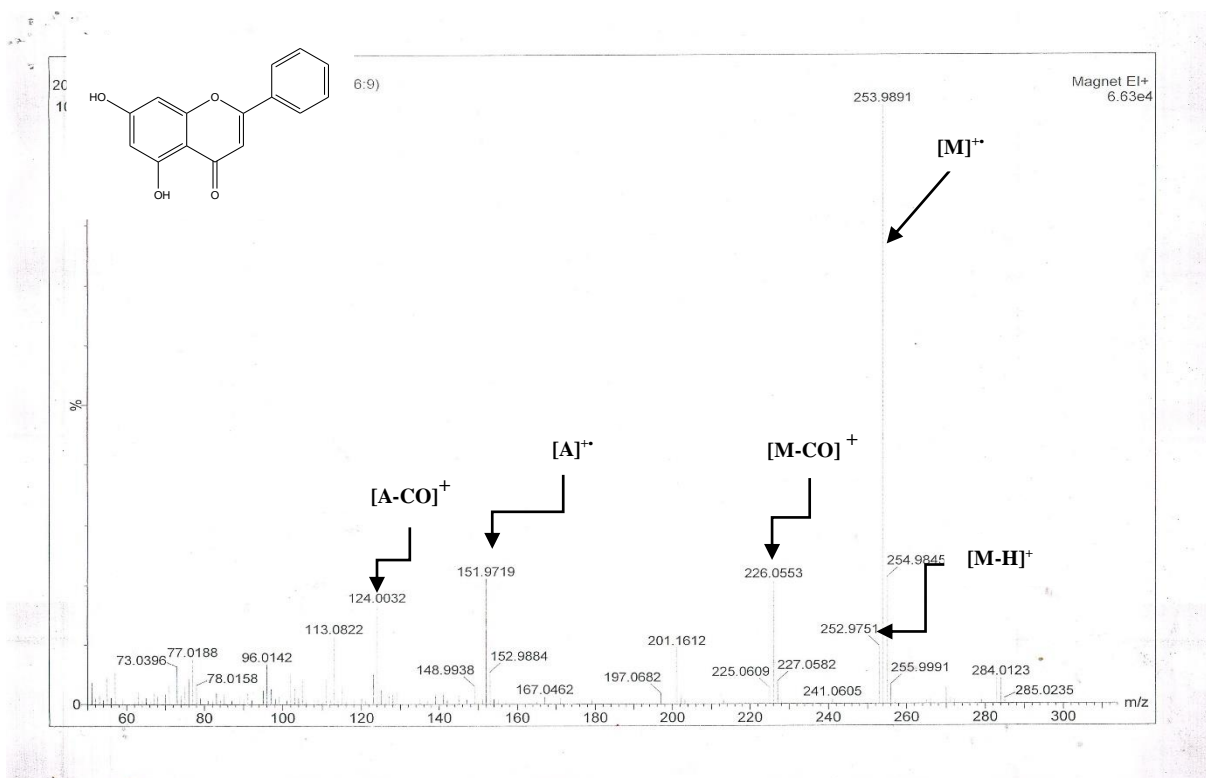
Le spectre de masse en impact électronique EI-MS a donné un pic à  $m/z = 254$  ce qui correspond à la formule brute  $C_{15}H_{10}O_4$ . Ce composé posséderait donc deux groupements hydroxyles.

- Le pic à  $m/z = 226$  correspond au fragment  $[M-CO]^+$ .
- Le pic à  $m/z = 152$  correspond donc au fragment  $[A]^+$  avec deux groupements hydroxyles qui ne peuvent être qu'on position 5 et 7.
- Le pic à  $m/z = 124$  correspond au fragment  $[A-CO]^+$ .

Les différents fragments du composé PCA5 sont représentés dans le tableau-32:

**Tableau-32 : Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations du composé PCA5**

Fragments	$m/z$
$[M]^{++}$	254
$[M-H]^+$	253
$[M-CO]^+$	226
$[A]^{++}$	152
$[A-CO]^+$	124



**Figure-62 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA5**

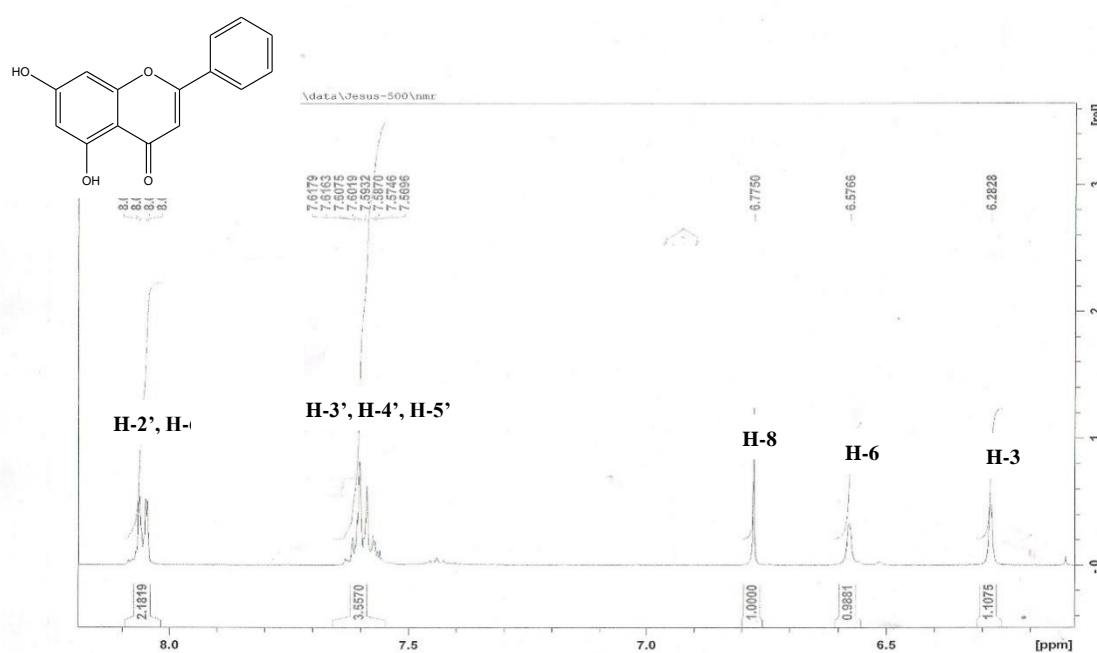
Le spectre RMN- $^1H$  enregistré dans l'acétone- $d_6$  (figure-63) montre :

- Un doublet de doublet à 8,2 ppm d'intégration 2H avec une constante de couplage  $J=9,3, 2,1$  Hz correspondant aux protons H-2' et H-6'.
- Un multiplet à 7,6-7,5 ppm d'intégration 3H relatifs aux protons H-3, H-4' et H-5'.
- Un doublet à 6,8 ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage  $J=2,1$  correspondant au proton H-8.
- Un doublet à 6,6 ppm d'intégration 1H avec une constante de couplage  $J=2,1$  correspondant au proton H-6.
- Un singulet d'intégration 1H à 6,3 ppm correspondant au proton H-3.

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau-33:

**Tableau-33 : Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCA5**

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
8,2	dd	2H	9,3-2,1	H-2', H-6'
7,6-7,5	m	3H	-	H-3', H-4', H5'
6,8	d	1H	2,1	H-8
6,6	d	1H	2,1	H-6
6,3	s	1H	-	H-3



**Figure-63 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acétone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA5**

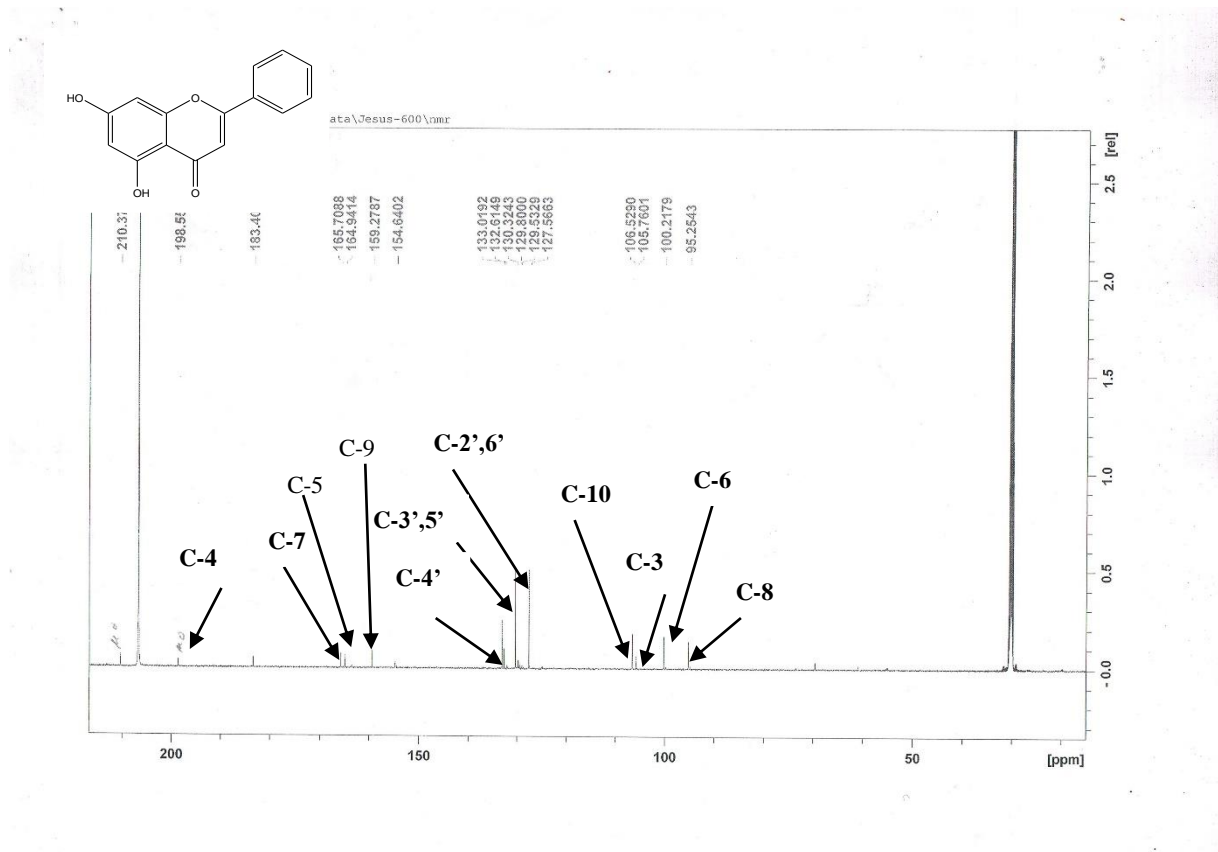
La structure de ce composé est encore confirmée par le spectre RMN-<sup>13</sup>C (**figure-64**). Le spectre RMN-<sup>13</sup>C confirme la structure par les signaux caractéristiques suivant : à  $\delta = 105,7$  ppm (C-3),  $\delta = 198,5$  ppm (C-4),  $\delta = 164,9$  ppm (C-5),  $\delta = 100,2$  ppm (C-6) ,  $\delta = 165,7$  ppm (C-7),  $\delta = 95,2$  ppm (C-8),  $\delta = 159,2$ ppm (C-9),  $\delta = 106,5$  ppm (C-10),  $\delta = 130,9$  ppm (C-1'),  $\delta = 132,1$  ppm (C-4'),  $\delta = 127,5$  ppm (C-2',6'),  $\delta = 129,4$  ppm (C-3',5').

Les résultats du spectre RMN-<sup>13</sup>C, déplacements chimiques et l'attribution des signaux sont résumés dans le tableau-34.

**Tableau-34 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PCA5.**

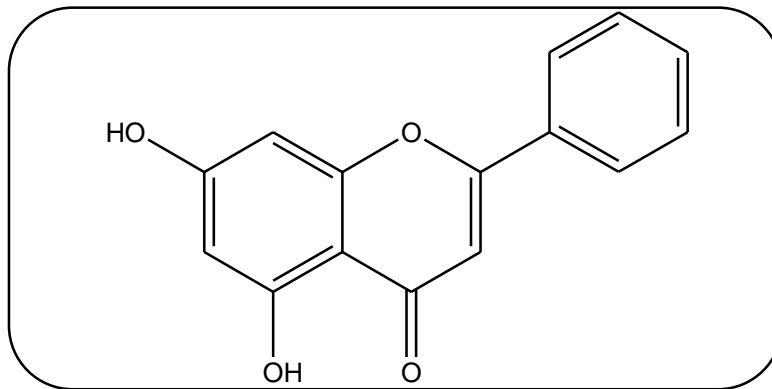
Carbone	Déplacement chimique
3	105,7
4	198,5
5	164,9
6	100,2
7	165,7
8	95,2
9	159,2
10	106,5
1'	130,9
4'	132,1
2',6'	127,5
3',5'	129,4





**Figure-64 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone, δ ppm) du composé PCA5.**

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure : 5,7-dihydroxyflavone (Chryisine) (**Figure-65**). Nos résultats sont en accord avec la littérature (**Chen et al. 2003**).



**Figure-65 :5,7-dihydroxyflavone (Chryisine)**

### III-2-1-6-Élucidation structurale du composé PCA6

Le composé PCA6 a été isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe. Invisible sous UV (245,365) de couleur marron après la révélation.

L'analyse élémentaire du composé PCA6 indique que ce composé à une masse moléculaire  $m/z=320$  correspondant à la formule brute  $C_{20}H_{32}O_3$  (Figure-66).

Elemental Composition Report

Page 1

Multiple Mass Analysis: 1579 mass(es) processed - displaying only valid results

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

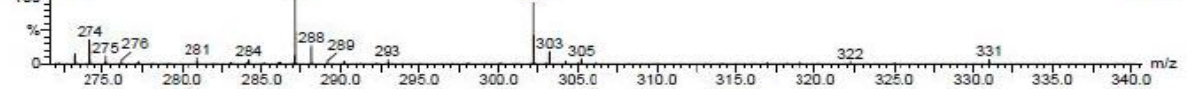
1241 formula(e) evaluated with 44 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 19-20 H: 29-32 O: 0-3

240317-B 67 (3.748)

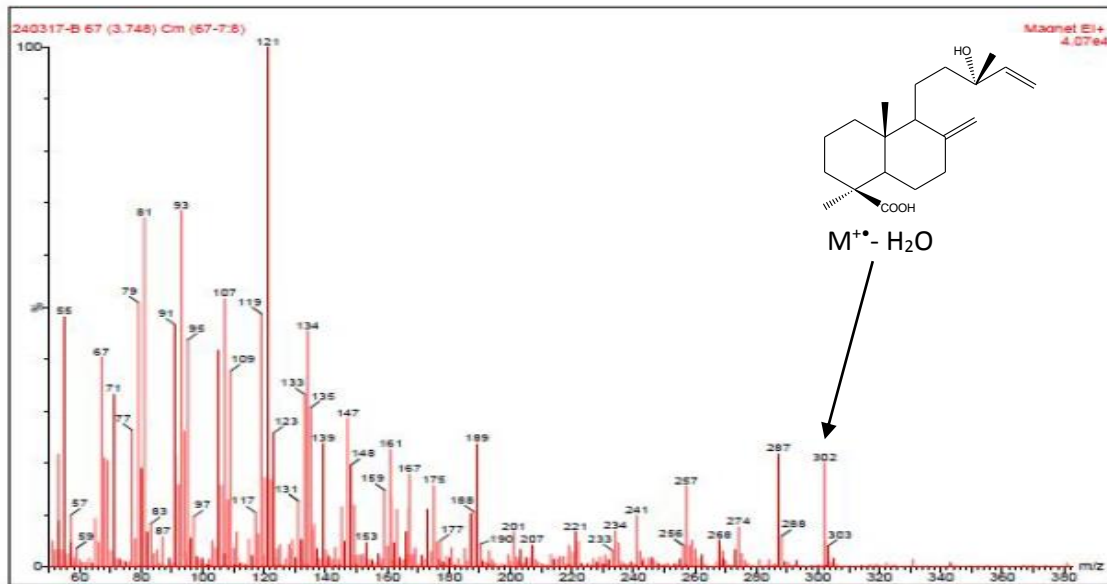
Magnet EI+



Mass	RA	Calc. Mass	nDa	PPM	DBE	Formula
320.2249	0.14	320.2351	-0.2	-0.6	5.0	C20 H32 O3
320.2231	0.37	320.2351	-2.0	-6.2	5.0	C20 H32 O3
306.2216	0.11	306.2195	2.1	6.9	5.0	C19 H30 O3
306.2199	0.60	306.2195	0.4	1.3	5.0	C19 H30 O3
306.2182	0.49	306.2195	-1.3	-4.2	5.0	C19 H30 O3
306.2165	0.24	306.2195	-9.0	-9.5	5.0	C19 H30 O3
305.2145	0.34	305.2117	2.8	9.2	5.5	C19 H29 O3
305.2128	1.85	305.2117	1.1	3.6	5.5	C19 H29 O3
305.2111	3.51	305.2117	-0.6	-2.0	5.5	C19 H29 O3
305.2094	4.44	305.2117	-2.3	-7.5	5.5	C19 H29 O3
304.2409	0.16	304.2402	0.7	2.3	5.0	C20 H32 O2
304.2393	0.86	304.2402	-0.9	-3.0	5.0	C20 H32 O2
304.2376	1.18	304.2402	-2.6	-8.5	5.0	C20 H32 O2
303.2353	0.61	303.2324	2.9	9.6	5.5	C20 H31 O2
303.2337	1.55	303.2324	1.3	4.3	5.5	C20 H31 O2
303.2320	1.73	303.2324	-0.4	-1.2	5.5	C20 H31 O2
303.2303	2.29	303.2324	-2.1	-6.9	5.5	C20 H31 O2
302.2264	16.39	302.2246	1.8	6.0	6.0	C20 H30 O2
302.2247	25.09	302.2246	0.1	0.3	6.0	C20 H30 O2
302.2231	35.56	302.2246	-1.5	-5.0	6.0	C20 H30 O2
291.2300	0.21	291.2324	-2.4	-8.2	4.5	C19 H31 O2
290.2255	0.33	290.2246	1.2	4.1	5.0	C19 H30 O2
290.2242	0.19	290.2246	-0.4	-1.4	5.0	C19 H30 O2
290.2226	0.35	290.2246	-2.0	-6.9	5.0	C19 H30 O2
289.2155	0.59	289.2168	-1.3	-4.5	5.5	C19 H29 O2
289.2139	0.78	289.2168	-2.9	-10.0	5.5	C19 H29 O2
288.2437	0.44	288.2453	-1.6	-5.6	5.0	C20 H32 O

Figure-66 : Analyse élémentaire du composé PCA6

Le spectre de masse en impact électronique EI-MS (Figure-67) montre un pic moléculaire à  $m/z=302$  correspondant à  $[M^{+-} - H_2O]$



**Figure-67 : Spectre de masse en mode impact électronique du composé PCA6**

On observe sur le spectre RMN-<sup>1</sup>H cinq signaux identiques entre 1,07 et 2,38 ppm suggérant la présence d'un noyau décaline caractéristique des noyaux diterpéniques de type labdane, ces signaux correspondant aux protons H-1, H-2, H-3, H-6, H-7 (**Figure-68**).

On observe aussi sur le même spectre :

- Un doublet de doublet à 1,36 ppm avec une constante de couplage ( $J=14,3$ ) correspondant au proton H-5 (CH)
- Un doublet à 1,58 ppm avec une constante de couplage ( $J=10,7$ ) correspondant au proton H-9 (CH)
- Un doublet à 1,66 ppm avec une constante de couplage ( $J=11$ ) et un doublet de doublet à 1,33 avec une constante de couplage ( $J=11,11$ ) correspondant au proton H-11a et H-11b respectivement.
- Un doublet à 1,68 ppm avec une constante de couplage ( $J=12$ ) et un doublet de doublet à 1,26 avec une constante de couplage ( $J=12,8$ ) correspondant au proton H-12a et H-12b respectivement.
- Trois singulets à 0,62, 1,21, 1,20 ppm correspondant aux protons H-20, H-16 et H-18 respectivement.
- 2 singulets à 4,55, 4,82 ppm correspondant au proton H-17(CH<sub>2</sub>).
- Un doublet de doublet à 5,21 ppm avec une constante de couplage ( $J=17,4, 1,9$ ) et un doublet de doublet à 4,97 avec une constante de couplage ( $J=10,8, 1,9$ ) correspondant aux protons H-15a et H-15b respectivement.

- Un doublet de doublet à 5,92 ppm avec une constante de couplage ( $J=17,4, 10,8$ ) correspondant au proton H-14

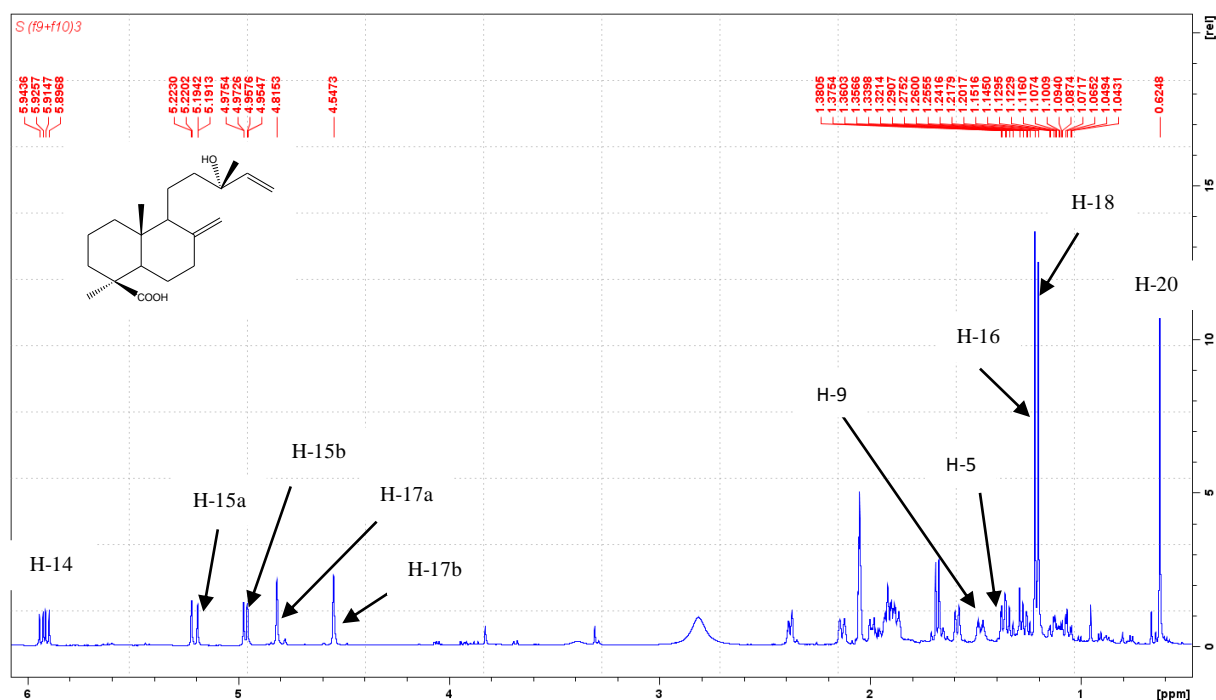


Figure-68 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz, acétone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA6

Le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  (Figure-69) montre la présence de vingt atomes de carbone avec les signaux caractérisant la décaline. Les informations supplémentaires fournies de l'expérience HSQC, HMBC permettent de distinguer :

Neuf groupements  $\text{CH}_2$  [ $\delta = 40,1 ; 20,9 ; 39,16 ; 27,2 ; 39,6 ; 18,8 ; 42,6$  ( $-\text{CH}_2-$ );  $11,8$  ( $=\text{CH}_2$ ),  $107,4$  ( $=\text{CH}_2$ )].

Trois groupements  $\text{CH}$  ( $\delta = 56,9 ; 57,9 ; 147,6$ )

Cinq carbones quaternaires [ $\delta = 44,6 ; 41,5, 73,3 ; 149,5 ; 178,7$  ( $\text{COOH}$ )]

Trois carbones ont des déplacements chimiques caractéristiques de méthyles ( $\delta = 28,6 ; 29,5 ; 13,3$ ).

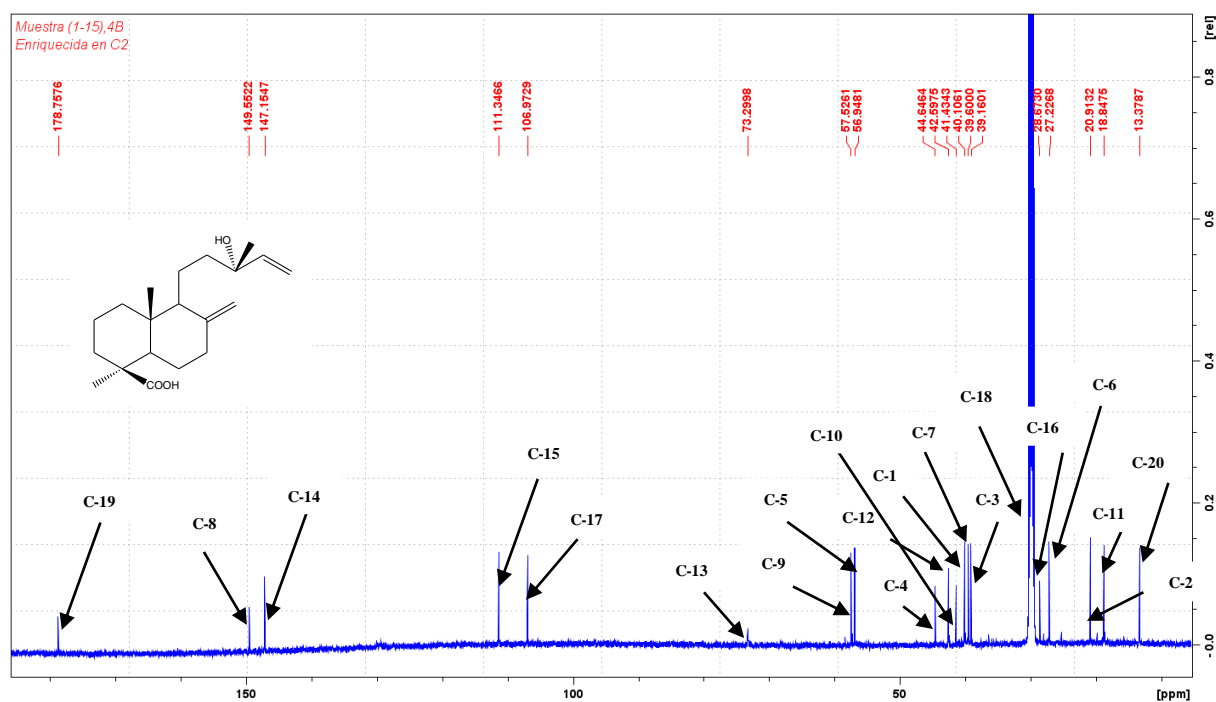


Figure-69: Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone d-6, δ ppm) du composé PCA6

Les résultats du spectre RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C sont résumés dans le tableau-35.

Tableau-35 : RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C du composé PCA6

Proton	Déplacement chimique	Multiplicité	<i>J</i>	Carbone	Déplacement chimique
H-1a	1,87	m	-	C-1	40,1
H-1b	1,12	ddd	14, 14, 4		
H-2a	1,89	m	-	C-2	20,9
H-2b	1,47	dddd	14, 4, 4,3		
H-3a	2,13	d	14	C-3	39,16
H-3b	1,07	ddd	14, 14,4		
				C-4	44,6
H-5	1,36	dd	14,3	C-5	56,9
H-6a	1,99	m	-	C-6	27,2
H-6b	1,92	m	-		
H-7a	2,38	ddd	11,5, 3, 2,5	C-7	39,6
H-7b	1,91	m			
				C-8	149,5
H-9	1,58	d	10,7	C-9	57,6
				C-10	41,5
H-11a	1,66	d	11	C-11	18,8
H-11b	1,33	dd	11, 11		
H-12a	1,68	d	12	C-12	42,6
H-12b	1,26	dd	12, 8,4		

				C-13	73,3
H-14	5,92	dd	17,4, 10,8	C-14	147,6
H-15a	5,21	dd	17,4, 1,9	C-15	111,8
H-15b	4,97	dd	10,8, 1,9		
H-16	1,21	s	-	C-16	28,6
H-17a	4,82	s	-	C-17	107,4
H-17b	4,55	s	-		
H-18	1,20	s	-	C-18	29,5
				C-19	178,7
H-20	0,62	s	-	C-20	13,3

Ces différents éléments font penser à un diterpène renfermant le noyau décaline.

L'expérience de corrélation HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) permet de visualiser le couplage entre le proton et le carbone. Les taches de corrélation du noyau décaline sont claires dans ce spectre (Figure-70)

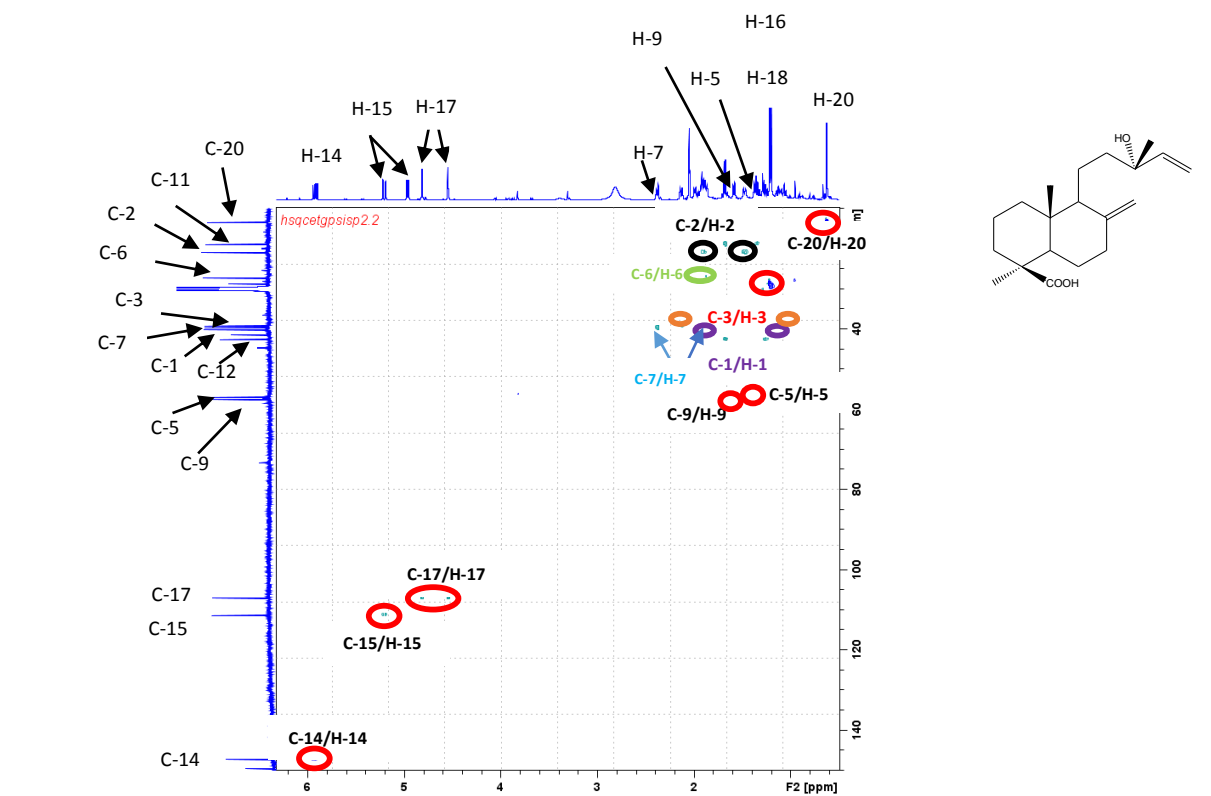


Figure-70 : Spectre HSQC du composé PCA6

Enfin, la structure peut être déterminée après l'analyse des données de l'expérience HMBC qui permet de visualiser les couplages de type  $2J$  ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) et  $3J$  ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (Figure-71).

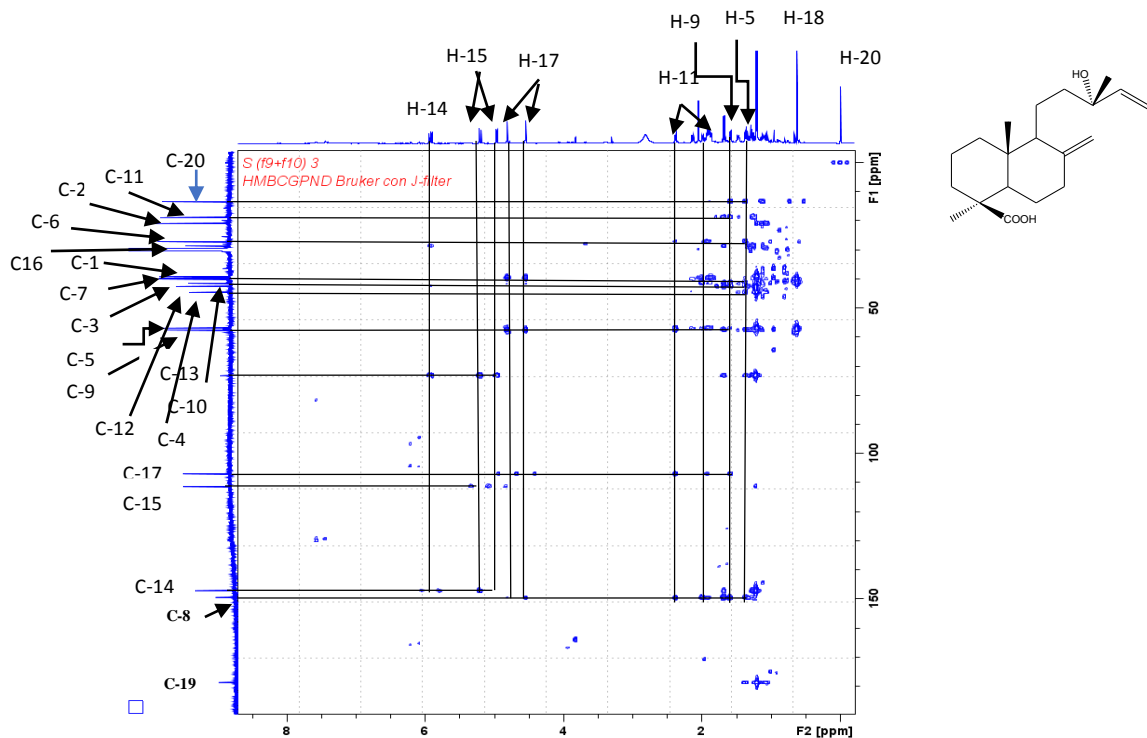


Figure-71: Spectre HMBC du composé PCA6

L'ensemble de ces données spectrales indique que le composé **PCA6** a la structure de base d'un diterpène (**Figure-72**). Sa structure finale peut être ainsi établie comme étant l'acide cupressique. Nos résultats sont en accord avec la littérature (**Piccinelli, et al 2013**).

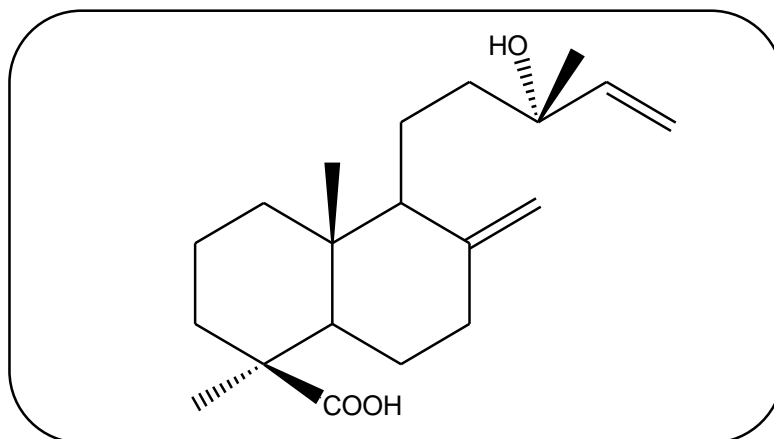
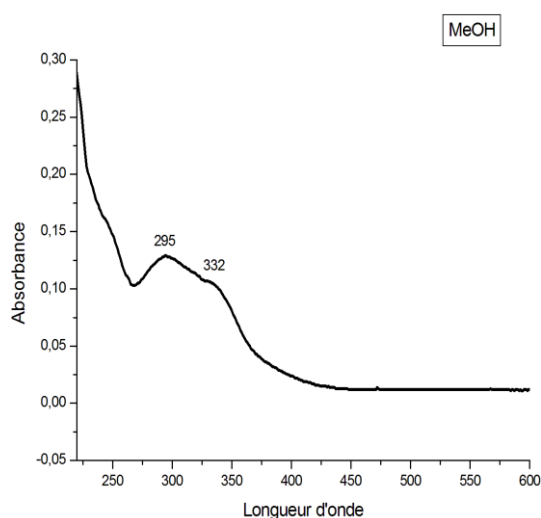


Figure-72 : Acide cupressique

### III-2-1-7-Élucidation structurale du composé PCA7 et PCA8

Le spectre UV-visible du composé **PCA7-PCA8** enregistré dans le méthanol montre la présence d'une bande à 295 nm et un épaulement 332 nm. L'absence de deux bandes montre que ce composé n'est pas un flavonoïde (**Figure-73**).



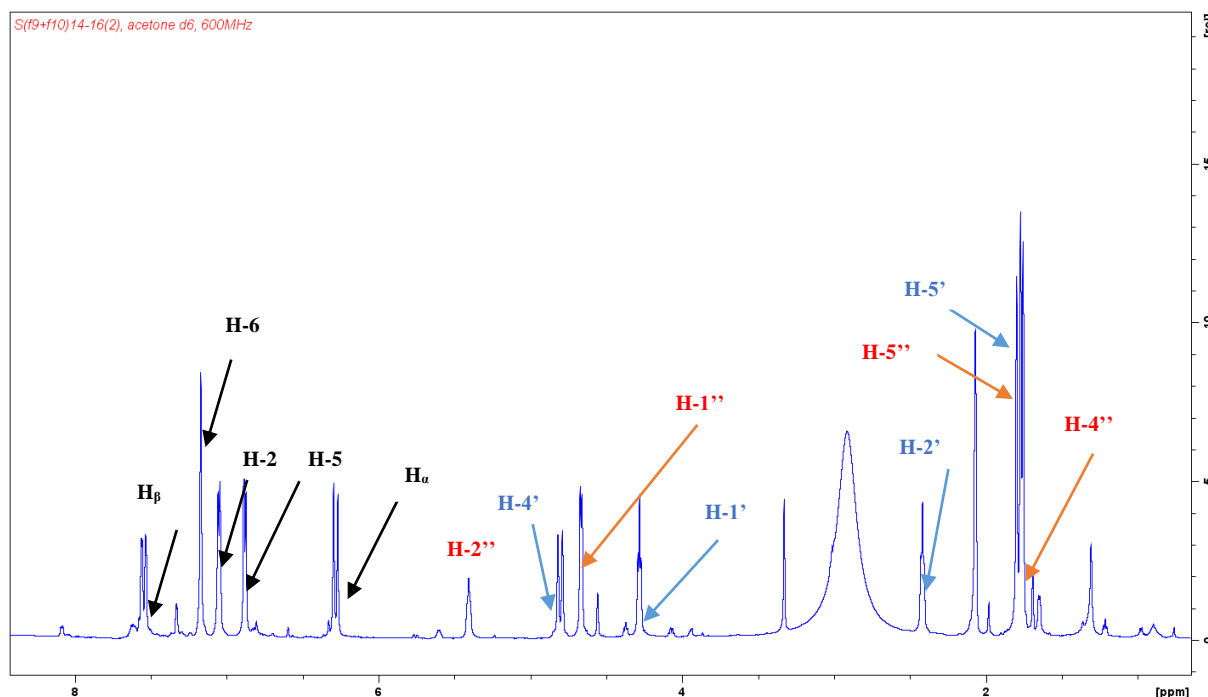
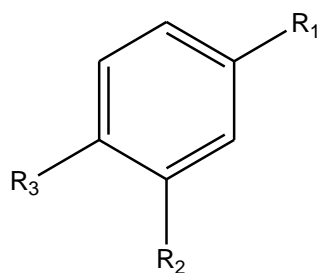
**Figure-73 : Spectre UV du composé PCA7 et PCA8**

L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H (Figure-74) montre que le composé **PCA7-PCA8** est un composé aromatique trisubstitué, caractérisé par les signaux :

- Un doublet d'intégration 1H à 7,15 ppm avec une constante de couplage de 2 Hz attribuable à H-2.
- Un doublet d'intégration 1H à 6,86 ppm avec une constante de couplage de 8 Hz attribuable à H-5.
- Le doublet dédoublé d'intégration 1H à 7,3 ppm montre que ce proton est ortho couplé à un premier proton avec une constante de couplage de 8 Hz et méta couplé à un second proton avec une constante de couplage de 2 Hz attribuable à H-6.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun à 6,22 et 7,52 ppm de même constante de couplage ( $J = 16$  Hz) correspondants respectivement aux protons H<sub>α</sub> et H<sub>β</sub> en position trans.

La multiplicité des signaux des protons aromatiques montre qu'il s'agit d'une substitution 1, 3,4, l'un des substituant comporte le groupement CH=CH.





**Figure-74: Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, acétone d-6,  $\delta$  ppm) du composé PCA7 et PCA8**

La structure de cette molécule n'a pu être déterminée que par le spectre RMN-<sup>13</sup>C (**figure-75**) et HSQC (**figure-76**) qui ont montré la présence de deux hydroxyles sur le noyau aromatique et une fonction carboxylique. Les données relatives à ces spectres sont reportées dans le **tableau-38** :

**Tableau-36 : RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C du composé PCA7 et PCA8**

Carbone	Déplacement chimique	proton	Déplacement chimique
C-1	127,7	-	-
C-2	115,2	H-1	7,15 (d, $J=2$ )
C-3 (C-OH)	145,8	-	-
C-4 (C-OH)	149,0	-	-
C-5	122,6	H-5	6,86 (d, $J=8$ )
C-6	116,5	H-6	7,03 (dd, $J=8, 2$ )

C-β	145,7	H-β	7,52 (d, $J=16$ )
C-α	115,5	H-α	6,22 (d, $J=16$ )
COO	167,6	-	-

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (**figure-77**) permet de mettre en évidence les corrélations proton carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Le proton H<sub>β</sub> donne quatre taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta = 115,5$  ppm attribuable à C<sub>α</sub>.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 122,6$  ppm attribuable à C-6.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta = 127,7$  ppm attribuable à C-1.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta = 167,6$  ppm attribuable à COO.

Le proton H<sub>α</sub> donne trois taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta = 127,7$  ppm attribuable à C-1.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 145,7$  ppm attribuable à C<sub>β</sub>.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta = 167,6$  ppm attribuable à COO.

Le proton H-2 donne trois taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta = 127,7$  ppm attribuable à C-1.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 145,7$  ppm attribuable à C<sub>β</sub>.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta = 149$  ppm attribuable à C-4.

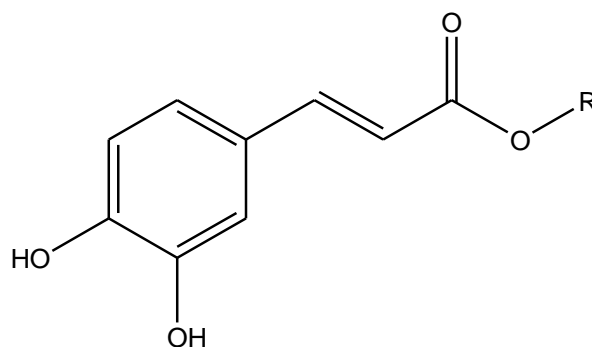
Le proton H-6 donne quatre taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta = 115,2$  ppm attribuable à C-2.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 116,5$  ppm attribuable à C-5.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta = 145,7$  ppm attribuable à C<sub>β</sub>.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta = 149$  ppm attribuable à C-4.

Le proton H-5 donne quatre taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à  $\delta = 122,6$  ppm attribuable à C-6.
- La deuxième avec l'atome de carbone à  $\delta = 127,7$  ppm attribuable à C-1.
- La troisième avec l'atome de carbone à  $\delta = 145,8$  ppm attribuable à C-3.
- La quatrième avec l'atome de carbone à  $\delta = 149$  ppm attribuable à C-4.

Ces données mènent à la structure partielle :



Le spectre RMN-  $^1\text{H}$  du mélange de ces composés indique la présence de deux motifs caféates et nous renseigne grâce aux différentes proportions que le premier contient un groupement minoritaire et le second un groupement majoritaire.

Les spectres RMN- $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC confirment la structure finale du composé PCA7 et PCA8 et les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau-37 : RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  du composé PCA7 et PCA8 (substitution R)**

Carbone	Déplacement chimique	proton	Déplacement chimique
C-1'	63	H-1'	4,25 (2H, t, $J = 6,8$ Hz)
C-2'	38	H-2'	2,39 (2H, t, $J = 6,7$ Hz)
C-3'	139,2	-	-
C-4'	112,7	H-4' <sub>a, b</sub>	4,79 (m), 4,76(m)
C-5'	22,7	H-5'	1,77 (3H, m)
C-1''	61,4	H-1''	4,64 (2H, d, $J = 7.3$ Hz)
C-2''	120,3	H-2''	5,38 t ( $J = 7.3, 1.4$ )
C-3''	139,2	-	
C-4''	18,1	H-4''	1,75 (3H, m)
C-5''	25,9	H-5''	1,77 (3H, m)

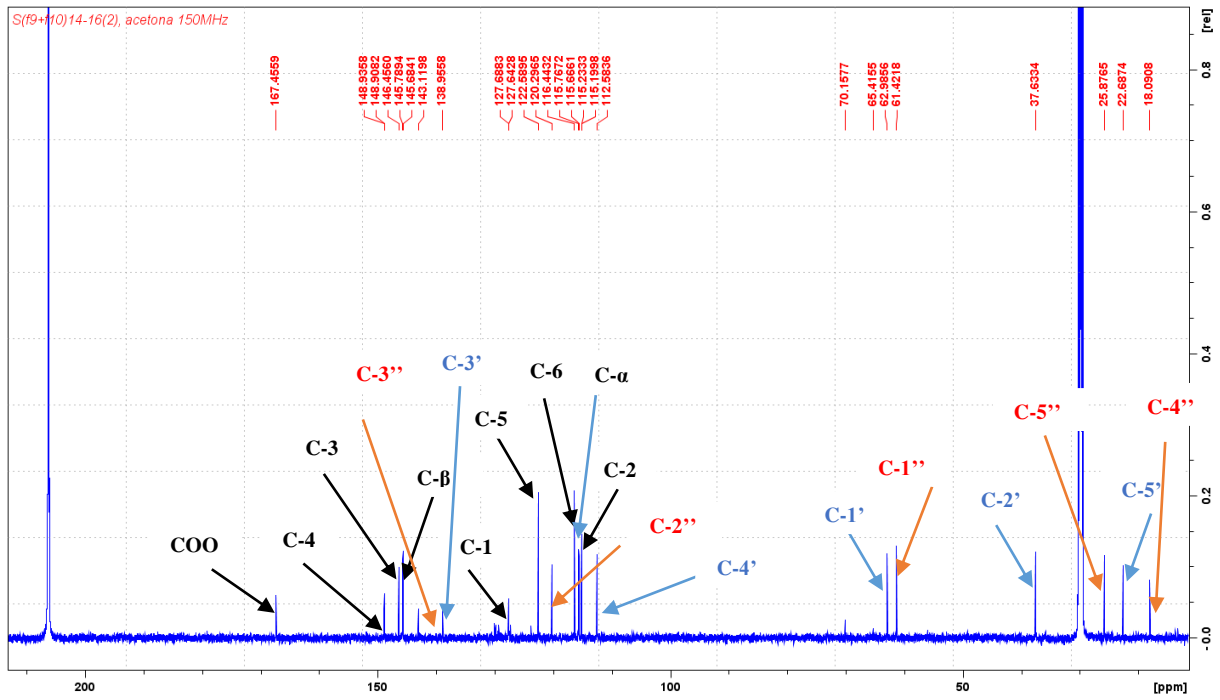


Figure-75 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, acétone d-6, δ ppm) du composé PCA7 et PCA8

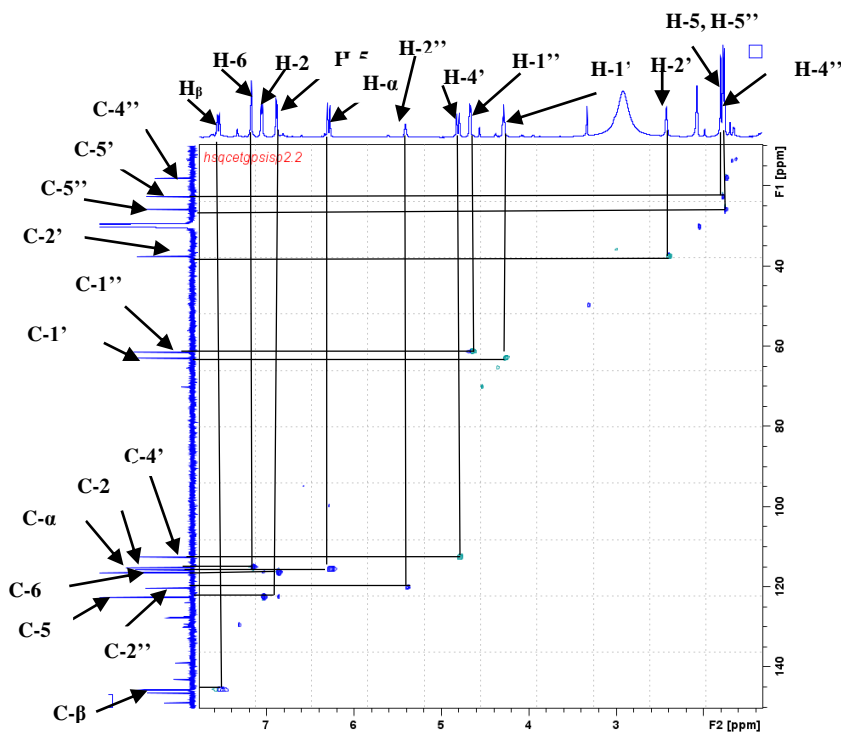


Figure-76: Spectre HSQC du composé PCA7 et PCA8

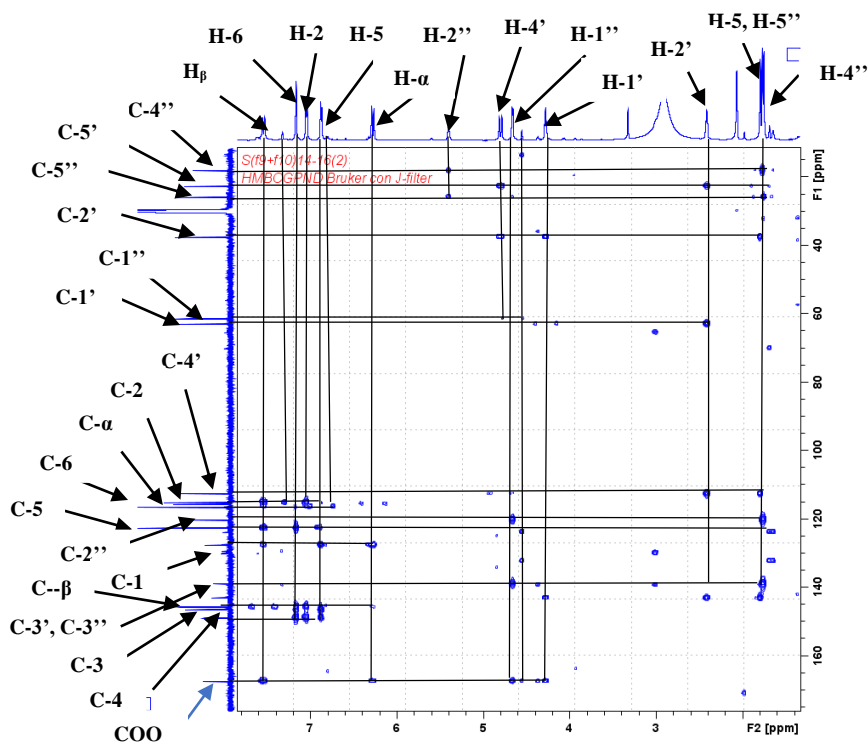


Figure-77: Spectre h HMBC du composé PCA7 et PCA8

L'ensemble de ces données spectrales indique que le composé **PCA7** et **PCA8** est un mélange de deux produit (1 /1) (**figure-78**). Les structures finales peuvent ainsi être établies comme étant le 3-méthyl-3-butényl (E)-Cafféate (**7**) et 2- méthyl-2-butényl (E)-Cafféate (**8**). Nos résultats sont en accord avec la littérature **Salah, N. M. et al 2017**.

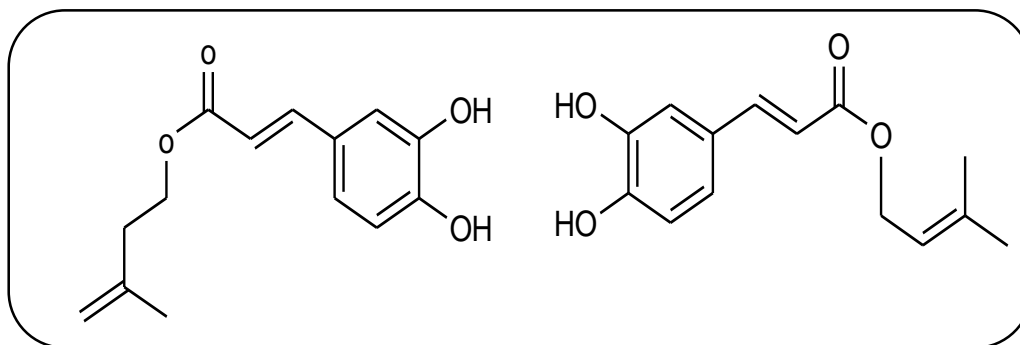


Figure-78 : 3-méthyl-3-butényl (E)-Cafféate et 2- méthyl-2-butényl (E)-Cafféate

## Références

- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, *101*(4), 1383-1392.
- Amorati, R., Baschieri, A., Cowden, A., & Valgimigli, L. (2017). The antioxidant activity of quercetin in water solution. *Biomimetics*, *2*(3), 9.
- Baltas, N., Yildiz, O., & Kolayli, S. (2016). Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*(sup1), 52-55.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacology*, *100* (1-2), 114–117.
- Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G. L., & Plessi, M. (2012). <sup>1</sup>H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochemical Analysis*, *23*(3), 260-266.
- Bittencourt, M. L., Ribeiro, P. R., Franco, R. L., Hilhorst, H. W., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, *76*, 449-457.
- Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., ... & Van Antwerpen, P. (2014). Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(2), 2327-2345.
- Chen, L. J., Games, D. E., & Jones, J. (2003). Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, *988*(1), 95-105.
- da Graça Miguel, M., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D., & Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Science and Biotechnology*, *23*(1), 313-322.
- Daleprane, J. B., & Abdalla, D. S. (2013). Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*.
- Debab, M., Toumi-Benali, F., & Dif, M. M. (2017). Antioxidant activity of propolis of West Algeria. *Phytothérapie*, *15*(4), 230-234.

- Deghbar, N., Mezioug, D., Kahina, T., Medjdoub, Y. M., & Touil-Boukoffa, C. (2019). Antihydatic and immunomodulatory effects of Algerian propolis ethanolic extract: In vitro and in vivo study. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(3), 106.
- Fang, J. M., Su, W. C., & Cheng, Y. S. (1988). Flavonoids and stilbenes from armand pine. *Phytochemistry*, 27(5), 1395-1397.
- Galeotti, F., Maccari, F., Fachini, A., & Volpi, N. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods*, 7(3), 41.
- Hernandez Zarate, M. S., Abraham Juarez, M. D. R., Ceron Garcia, A., Ozuna Lopez, C., Gutierrez Chavez, A. J., Segoviano Garfias, J. D. J. N., & Avila Ramos, F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*, (AHEAD).
- Hochheim, S., Guedes, A., Faccin-Galhardi, L., Rechenchoski, D. Z., Nozawa, C., Linhares, R. E., ... & Cordova, C. M. M. D. (2019). Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 339-350.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2), 584-589.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. (2004). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Bbiochemistry*, 68(1), 260-262.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(10), 5434-5440.
- Mohdaly, A. A., Mahmoud, A. A., Roby, M. H., Smetanska, I., & Ramadan, M. F. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 538-547.
- Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S., & Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some Algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*, 88, 85-90.
- Nedji, N., & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(6), 433-437.

- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Pratami, D. K., Mun'im, A., Sundowo, A., & Sahlan, M. (2018). Phytochemical profile and antioxidant activity of propolis ethanolic extract from tetragonula bee. *Pharmacognosy Journal*, 10(1).
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Salah, N. M., Souleman, A. M., Shaker, K. H., Hawary, S. E., & El-Hady, F. K. A. (2017). Acetylcholinesterase, alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from Egyptian propolis. *International Journal of Pharmacognosy Phytochemistry Research*, 9, 528-536.
- Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., & Kolayli, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castania sativa* Mill.) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33(4), 470-481.
- Segueni N., Demircan, E., Salah, A., & Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 1417-1423.
- Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C., & Jay, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 227-233.
- Silva, C. C. F. D., Salatino, A., Motta, L. B. D., Negri, G., & Salatino, M. L. F. (2019). Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis from Ceará state. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 309-318.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Touzani, S., Al-Waili, N., El Menyiy, N., Filipic, B., Pereyra, A., Arabi, I. E., ... & Lyoussi, B. (2018). Chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(7), 436.
- Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., & Ratajczak, I. (2019). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Propolis Extracts From Poland. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X19849777.



- Zheng, Y. Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D. F., Guo, R., & Lai, R. C. (2017). Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

La propolis est une résine présente sur les bourgeons, jeunes rameaux, blessures de certains arbres et arbustes. Cette résine est récoltée par les abeilles. Ce produit occupe de plus en plus une place de choix en thérapeutique. Les recherches entreprises sur la propolis ont permis de montrer que celle-ci pouvait être une alternative efficace dans bon nombre de troubles et pathologies, mais également en association avec certains traitements pharmacologiques.

Le but de notre travail été l'étude de la composition chimique et des propriétés antioxydantes de la propolis algérienne. Au début de ce travail, nous avons choisi cinq propolis collectées dans différentes zone géographiques du nord algérien : Constantine, Boumerdès, Chelghoum laide située dans la wilaya de Mila, Tébessa et Guelma. Les extraits testés ont été obtenus par macération dans quatre solvants différents : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol.

Une étude comparative a été réalisée en fonction de l'activité antioxydante des différents extraits de chaque propolis. Dans un premier temps nous avons effectué une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux. Les résultats obtenus varient entre  $9.89 \pm 0.23$  et  $233,72 \pm 9,25$  mg EGA/ g pour le TPC et entre  $6,22 \pm 0,20$  et  $73,26 \pm 2,98$  mg EQ / g pour le TFC. Les TPC et TFC des différents extraits testés ont diminué dans l'ordre suivant: extrait méthanolique > extrait acétate d'éthyle > extrait chloroformique > extrait éther de pétrole. Concernant l'influence de la zone géographique sur les TPC et TFC étudiés. Nos résultats indiquent que la propolis de Constantine présente des teneurs largement supérieures aux teneurs des autres propolis suivie par les propolis de Mila et Boumerdès. L'effet antioxydant a été évalué par la combinaison de cinq techniques complémentaires (DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotène, CUPRAC et FRAP). La propolis de Constantine a enregistré les activités antioxydantes les plus élevées. Ce résultat nous a encouragés à étudier l'activité anticholinestérase des extraits de cette propolis. Les résultats obtenus montrent que seuls les extraits éther de pétrole et chloroforme présentent une activité inhibitrice contre l'AChE. L'extrait chloroformique possède une activité inhibitrice plus élevée contre les deux enzymes AChE et BChE avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de  $81.21 \pm 6.06$  et  $47.98 \pm 0.08$   $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  respectivement.

Cette première partie de notre travail nous a permis de faire une première classification des propolis étudiées et de sélectionner les extraits les plus actifs sur lesquels nous avons réalisé une analyse par la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse dans le but d'étudier leurs profile chimique. L'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine est l'extrait le plus actif. Cet extrait présente les teneurs les plus élevés en acide

caféique, acide p-coumarique, naringénine et kaempférol. Nos résultats suggèrent que l'effet antioxydant est probablement dû à la présence de ces composés. Notre travail montre qu'il existe une relation entre l'activité antioxydante de la propolis et sa composition en produits flavoniques. Nous pensons que la composition qualitative et quantitative en flavonoïdes est très importante. Cette composition permettra une meilleure classification de la propolis. Elle permettra aussi la standardisation de ce produit pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine. Après l'extraction, séparation et purification, nous avons obtenus 8 produits à l'état pur. La détermination structurale de ces composés a été réalisée à l'aide des différentes techniques spectroscopiques de RMN mono (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C) et bidimensionnelles (HSQC, HMBC) ainsi que la spectrométrie de masse EI-MS. Les 8 composés isolés sont identifiés comme suit :

- 7-méthoxy-5-hydroxy flavone (tectochry sine)
- 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine).
- Pinobanksin-3-acétate
- 3, 5,7 trihydroxyflavone (Galangine)
- 5,7-dihydroxyflavone (Chry sine)
- Acide cupressique
- 3-méthyl-3-butényl (E) –Cafféate
- 2-méthyl-2-butényl (E) –Cafféate

## Résumé

Notre étude s'intéresse à l'investigation de la composition chimique et des activités biologiques de la propolis Algérienne. Ce produit occupe de plus en plus une place de choix dans la médecine traditionnelle à cause de ses nombreuses propriétés biologiques. Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à plusieurs propolis du Nord Algérien. Une étude comparative en fonction de leur activité antioxydante a été réalisée. De plus, l'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux a aussi été évalué. La propolis de Constantine a enregistré les activités antioxydantes les plus élevées. Ce résultat nous a encouragés à étudier l'activité anticholinestérase des extraits de cette propolis.

Cette première partie de notre travail nous a permis de faire une première classification des propolis étudiées et de sélectionner les extraits les plus actifs sur lesquels nous avons réalisé une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrophotométrie de masse dans le but d'étudier leurs profile chimique. L'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Constantine est l'extrait le plus actif. Cet extrait présente les teneurs les plus élevés en acide caféique, acide *p*-coumarique, naringénine et kaempférol. Nos résultats suggèrent que l'effet antioxydant est probablement dû à la présence de ces composés.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la propolis Algérienne. Après l'extraction, séparation et purification, nous avons obtenus 8 produits à l'état pur, cinq flavonoides (tectochryine, pinocembrine, pinobksin-3-acétate, chryisine, galangine), un diterpène (acide cupressique) et deux dérivés d'acide caféique (3-méthyl-3-butényl (E)-Cafféate et 2- méhyl-2-butényl (E)-Cafféate).La détermination structurale de ces composés a été réalisé à l'aide des différentes techniques spectroscopiques de RMN mono (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C) et bidimensionnelles (HSQC, HMBC, Cosy) ainsi que la spectrométrie de masse EI-MS.

### Mot clés :

Propolis, étude comparative, activité antioxydante, activité anticholinestérase, polyphénols, flavonoïdes, LC-MS.

## Abstract

Our study is interested in the investigation of the chemical composition and the biological activities of Algerian propolis. Due to its several biological activities, propolis has been extensively used in folk medicine. In the first part of our study we examined several propolis harvested from north of Algeria in order to compare their antioxydant activity, In addition, the total phenolic and flavonoid contents were evaluated. Propolis of Constantine exhibited the highest antioxydant activity. This result encouraged us to study the anticholinesterase activity of the extracts of this propolis.

This first part of our work allowed us to make a first classification of the propolis studied and to select the most active extracts on which we performed an analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrophotometry LC-MS for the purpose of studying their chemical profile. The ethyl acetate extract of propolis of Constantine was the most active extract. This extract has the highest levels of caffeic acid, *p*-coumaric acid, naringenin and kaempferol. Our results suggest that the antioxydant effect is probably due to the presence of these compounds.

In the second part of our study we investigated the chemical composition of Algerian propolis. The separation and purification of propolis extracts lead to the identification of 8 compounds, five flavonoids (tectochryin, pinocembrine, pinobksin-3-acetate, chrysin, galangin), one diterpene (cupressic acid) and two derivatives of caffeic acid (3-methyl-3-butenyl (E) -Caffeate and 2-methyl-2 -butenyl (E) -Caffeate). Their structures has been established by spectral analysis including NMR mono (NMR-<sup>1</sup>H, NMR-<sup>13</sup>C) and bidimensionelle spectra (HSQC, HMBC) and impact electronic mass spectra.

### Key-words:

Propolis, comparative study, antioxidant activitie, anticholinesterase activitie, phenolics, flavonoids, LC-MS.

## ملخص

نهتم من خلال دراستنا بالتركيب الكيميائي والأنشطة البيولوجية للعكبر (البروبوليس) الجزائري. يحتل هذا المنتج مكانا بارزا بشكل متزايد في العلاج بسبب خصائصه البيولوجية والدوائية. في الجزء الأول من عملنا قمنا بالمقارنة بين عدة أنواع من عكبر الشمال الجزائري وفقا لنشاطها المضاد للأوكسدة، في البداية تم تحديد مجموع محتويات الفلافونويد وعديدات الفينول من مستخلصات عينات العكبر. بروبوليس قسنطينة سجلت اعلى نشاط مضاد للاكسدة، شجعتنا هذه النتيجة على دراسة النشاط المضاد للكولينستراز لمستخلصات هذا العكبر.

سمح لنا هذا الجزء الأول من عملنا بإجراء تصنيف أول للعكبر المدروس واختيار أكثر المستخلصات نشاطاً أجرينا عليها تحليلاً بواسطة كروماتوغرافيا السائلة المقترنة بمقياس الطيف الكتلي لغرض دراسة تركيبها الكيميائي. مستخلص أسيتات الإيثيل لعكبر قسنطينة هو المستخلص الأكثر نشاطاً. يحتوي هذا المستخلص على أعلى مستويات حمض الكافيك وحمض الكوماريك والنارينجين والكيبيفيرول. تشير نتائجنا إلى أن التأثير المضاد للأوكسدة ربما يرجع إلى وجود هذه المركبات. في المرحلة الثانية انصب اهتمامنا حول دراسة المكونات الكيميائية للعكبر الجزائرية، بعد القيام بفصل وتنقية مختلف المستخلصات تعرفنا على ثمانية (08) مركبات في حالة نقية، خمسة مركبات فلافونويد (tecto-chrysin) في المرحلة الثانية انصب اهتمامنا حول دراسة المكونات الكيميائية للعكبر الجزائرية، بعد القيام بفصل وتنقية مختلف المستخلصات تعرفنا على ثمانية (08) مركبات في حالة نقية، خمسة مركبات فلافونويد (tecto-chrysin) و مشتقين من حمض الكافيك (3-acétate pinobanksine، pinocembrine، chrysin، galangine) و مركب من عائلة التربينات الثنائية (acide cupressique) و مشتقين من حمض الكافيك (3-méthyl-3-butényl (E)-Cafféate et 2- méhyl-2-butényl) تم تحديد بنيتها الكيميائية باستعمال مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية وثنائية الأبعاد وكذلك مطيافية الكتلة.

## الكلمات المفتاحية

العكبر، المضاد للأوكسدة، المضاد للكولينستراز، جهاز الكروماتوغرافيا السائلة المقترن بمقياس الطيف الكتلي، الفلافونويد، عديدات الفينول

## Références bibliographiques :

- Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R. K., Tran, V. H., & Duke, C. C. (2012). Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry*, 77, 251-259.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383-1392.
- Alencar, S. M. D., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., ... & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 278-283.
- Alexandare, F. 1984. Apiculture Aujourd'hui. *Eds. Rustica, Paris*.
- Amorati, R., Baschieri, A., Cowden, A., & Valgimigli, L. (2017). The antioxidant activity of quercetin in water solution. *Biomimetics*, 2(3), 9.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Baltas, N., Yildiz, O., & Kolayli, S. (2016). Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup1), 52-55.
- Bankova, V. S., Popov, S. S., & Marekov, N. L. (1982). High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography A*, 242(1), 135-143.
- Bankova, V., & Kuleva, L. (1989). Phenolic compound of propolis from different regions of Bulgaria. *Animal Science*, 26,94–98.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., & Zamjansan, Z. (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23(1), 79-85.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A. G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(5-6), 530-533.



- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2001). Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8(1), 16-23.
- Banskota, A. H., Nguyen, N. T., Tezuka, Y., Le Tran, Q., Nobukawa, T., Kurashige, Y., ... & Kadota, S. (2004). Secoisolariciresinol and isotaxiresinol inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent hepatic apoptosis in mice. *Life Sciences*, 74(22), 2781-2792.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bertelli, D., Papotti, G., Bortolotti, L., Marcazzan, G. L., & Plessi, M. (2012). <sup>1</sup>H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 260-266.
- Bittencourt, M. L., Ribeiro, P. R., Franco, R. L., Hilhorst, H. W., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis : Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, 76, 449-457.
- Bonvehí, J. S., & Gutiérrez, A. L. (2011). Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1387-1395.
- Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., ... & Van Antwerpen, P. (2014). Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2327-2345.
- Boutabet, K., Kessa, W., Alyane, M., & Lahouel, M. (2011). Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal of Nephrology*, 21(2), 101.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1).

- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363.
- Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A., Montes De Oca Porto, R., Márquez Hernández, I., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2008). GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 9927-9932.
- Challem, J. (1995). Medical journals document value of bee propolis, honey, and royal jelly. *Natural Foods Merchandiser*.
- Cao, Y. H., Wang, Y., & Yuan, Q. (2004). Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 59(1-2), 135-140.
- Carvalho, A. A., Finger, D., Machado, C. S., Schmidt, E. M., da Costa, P. M., Alves, A. P. N. N., ... & dos Santos, J. M. T. (2011). In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 126(3), 1239-1245.
- Castro, M. L., do Nascimento, A. M., Ikegaki, M., Costa-Neto, C. M., Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2009). Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(14), 5332-5335.
- Çelemlı, Ö. G., Hatjina, F., Charistos, L., Schiesser, A., & Özkırım, A. (2013). More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 68(11-12), 429-438.
- Chen, C. N., Wu, C. L., Shy, H. S., & Lin, J. K. (2003). Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *Journal of Natural Products*, 66(4), 503-506.
- Chen, C. N., Hsiao, C. J., Lee, S. S., Guh, J. H., Chiang, P. C., Huang, C. C., & Huang, W. J. (2012). Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. *Natural product research*, 26(2), 116-124.
- Chi, J., Xue, B., & Chen, H. (1996). The chemical constituents of flavonoids from Liaoxi propolis. *Zhongguo Yao xue za zhi (Zhongguo yao xue hui: 1989)*, 31(5), 264-266.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., & Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*, 20(06), 531-536.
- Cottica, S. M., Sawaya, A. C., Eberlin, M. N., Franco, S. L., Zeoula, L. M., & Visentainer, J. V. (2011). Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(5), 929-935.
- Crane, E. (1988) Beekeeping: Science, Practice and World Recourses. *Heinemann London*.

- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B. A., Ramírez-Apan, T., & Cárdenas, J. (2002). Polyisoprenylated Benzophenones In Cuban Propolis; Biological Activity Of Nemorosone §. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 372-378.
- Cvek, J., Medić-Šarić, M., Vitali, D., Vedrina-Dragojević, I., Šmit, Z., & Tomić, S. (2008). The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *Journal of apicultural research*, 47(1), 35-45.
- Dalben-Dota, K. F., Faria, M. G., Bruschi, M. L., Peloso, S. M., Lopes-Consolaro, M. E., & Svidzinski, T. I. (2010). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(3), 285-290.
- Daleprane, J. B., & Abdalla, D. S. (2013). Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Darwish, R. M., Ra'ed, J., Zarga, M. H. A., & Nazer, I. K. (2010). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(36).
- da Graça Miguel, M., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D., & Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 313-322.
- da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... & Dellagostin, O. A. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137-142.
- Dausch, A., Moraes, C. S., Fort, P., & Park, Y. K. (2008). Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(4), 435-441.
- Dealey, C. (2008). *The care of wounds : A guide for nurses*. John Wiley & Sons.
- Debab, M., Toumi-Benali, F., & Dif, M. M. (2017). Antioxidant activity of propolis of West Algeria. *Phytothérapie*, 15(4), 230-234.
- de Barros, M. P., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & de Andrade, S. F. (2007). Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 567-571.
- de Castro Ishida, V. F., Negri, G., Salatino, A., & Bandeira, M. F. C. (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125(3), 966-972.

- Deghbar, N., Mezioug, D., Kahina, T., Medjdoub, Y. M., & Touil-Boukoffa, C. (2019). Antihydatic and immunomodulatory effects of Algerian propolis ethanolic extract: In vitro and in vivo study. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(3), 106.
- Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G., & Ozer, B. (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research*, 108(1), 95-105.
- El Hady, F. K. A., & Hegazi, A. G. (2002). Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 386-394.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Eric Debuyser. La propolis. Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante. Faculté de pharmacie, **1984**.
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 887-897.
- Fang, J. M., Su, W. C., & Cheng, Y. S. (1988). Flavonoids and stilbenes from armand pine. *Phytochemistry*, 27(5), 1395-1397.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A. M., Cunha, A., & Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481-493.
- Galeotti, F., Maccari, F., Fachini, A., & Volpi, N. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods*, 7(3), 41.
- Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (1993). Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 48(9-10), 731-735.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1987). The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences*, 232(1268), 249-272.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., MORI, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., ... & OKUDA, T. (1989). Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: effects of

tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(8), 2016-2021.

- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32(7), 1141-1148.

- Hegazi, A. G. (1998). Propolis an overview. *J. Bee Informed*, 5(5), 22-23.

- Hegazi, A. G., & El Hady, F. K. A. (2002). Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 395-402.

- Heller, W., & Forkmann, G. (1993). The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 399-425.

- Hernández, I. M., Fernandez, M. C., Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2005). Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 68(6), 931-934.

- Hernandez Zarate, M. S., Abraham Juarez, M. D. R., Ceron Garcia, A., Ozuna Lopez, C., Gutierrez Chavez, A. J., Segoviano Garfias, J. D. J. N., & Avila Ramos, F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*, (AHEAD).

- Hochheim, S., Guedes, A., Faccin-Galhardi, L., Rechenchoski, D. Z., Nozawa, C., Linhares, R. E., ... & Cordova, C. M. M. D. (2019). Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 339-350.

- Holz, J. (1999). *Zur Wirksamkeit von Propoliszubereitungen bei Otitis externa des Hundes sowie Untersuchungen der antibakteriellen, antiviralen Aktivitäten von ethanolschen Propolisextrakten und deren Wirkung auf Zellkulturen* (Doctoral dissertation).

- Inui, S., Shimamura, Y., Masuda, S., Shirafuji, K., Moli, R. T., & Kumazawa, S. (2012). A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), 1038-1040.

- Isidorov, V. A., Szczepaniak, L., & Bakier, S. (2014). Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry*, 142, 101-106.

- Ivanov, T. (1980). Composition and physico-chemical properties of propolis. *Zhivotnovudni Nauki*, 17(8), 96-103.

- Joëlle, M., Marie, C.M., & Monique, S. (2006). Chapitre 18 : Matières premières produites par l'abeille. 2- La propolis. In *Actifs et additifs en cosmétologie (3<sup>e</sup> Éd.)* ; Lavoisier ,338–350.
- Jusbin, O. S. (1996). Chemical Composition and application. *Bee Products*, 1, 25-26.
- Kartal, M., Kaya, S., & Kurucu, S. (2002). GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 905-909.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2), 584-589.
- Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., & Cury, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45(2), 141-148.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping* (No. 124). Food & Agriculture Org.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. (2004). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(1), 260-262.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233-237.
- Lavie, P. (1975). La propolis. Edition : Apimondia. *Bucharest*, 65, 63-71.
- Li, H., Kapur, A., Yang, J. X., Srivastava, S., McLeod, D. G., Paredes-Guzman, J. F., ... & Rhim, J. S. (2007). Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *International Journal of Oncology*, 31(3), 601-606.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(10), 5434-5440.
- Li, F., Awale, S., Zhang, H., Tezuka, Y., Esumi, H., & Kadota, S. (2009). Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *Journal of Natural Products*, 72(7), 1283-1287.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H., & Kadota, S. (2010). Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73(4), 623-627.

- Li, F., He, Y. M., Awale, S., Kadota, S., & Tezuka, Y. (2011). Two new cytotoxic phenylallylflavanones from Mexican propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(9), 1194-1196.
- Lin, H. P., Lin, C. Y., Liu, C. C., Su, L. C., Huo, C., Kuo, Y. Y., ... & Chuu, C. P. (2013). Caffeic Acid phenethyl ester as a potential treatment for advanced prostate cancer targeting akt signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5264-5283.
- Liu, A. L., Wang, H. D., Lee, S. M., Wang, Y. T., & Du, G. H. (2008). Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), 7141-7147.
- Lu, L. C., Chen, Y. W., & Chou, C. C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 213-220.
- Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24(8), 1171-1179.
- Marchenay, P. (1977). *La propolis : histoire naturelle, arts et traditions populaires, emplois actuels*.
- Marco, G.J., A (1968), rapid method for evaluation of antioxidants, *J Am Oil ChemSoc*, 45, 594–598.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., ... & Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 105-112.
- Marquez Hernandez, I., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rosado Perez, A., Montes de Oca Porto, R., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2010). Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4725-4730.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70(06), 515-519.
- Melliou, E., Stratis, E., & Chinou, I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece–Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103(2), 375-380.
- Metzner, J., & Schneidewind, E. M. (1978). Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Die Pharmazie*, 33(7), 465-465.

- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3), 239-246.
- Mohdaly, A. A., Mahmoud, A. A., Roby, M. H., Smetanska, I., & Ramadan, M. F. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), 538-547.
- Mouhoubi-Tafnine, Z., Ouchemoukh, S., & Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*, 88, 85-90.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- Nagy, E., Papay, V., Litkei, G., & Dinya, Z. (1986). Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. *Stud. Org. Chem. (Amsterdam)*, 23, 223-232.
- Najafi, M. F., Vahedy, F., Seyyedini, M., Jomehzadeh, H. R., & Bozary, K. (2007). Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology*, 54(1), 49-56.
- Nedji, N., & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(6), 433-437.
- Negri, G., Marcucci, C., Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2000). Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11(5), 453-457.
- Nikolaev, A. B. (1978). Defending the bee town. *Remarkable, hive product: Propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. APIMONDIA standing commission on beekeeping technology and equipment, Bucharest.*
- Oliveira, A. P., França, H. S., Kuster, R. M., Teixeira, L. A., & Rocha, L. M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(1), 121-130.
- Ordóñez, R. M., Zampini, I. C., Moreno, M. N., & Isla, M. I. (2011). Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microbiological Research*, 166(7), 578-584.



- Orhan, I., Kartal, M., Tosun, F., & Şener, B. (2007). Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11-12), 829-832.
- Orsatti, C. L., Missima, F., Pagliarone, A. C., Bachiega, T. F., Búfalo, M. C., Araújo Jr, J. P., & Sforcin, J. M. (2010). Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, 24(8), 1141-1146.
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44(9-10), 375-378.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr.*, 44(6), 307-315.
- Papachroni, D., Graikou, K., Kosalec, I., Damianakos, H., Ingram, V., & Chinou, I. (2015). Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples from Cameroon and Congo. *Natural Product Communications*, 10(1), 1934578X1501000118.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Moura, F. F., & Ikegaki, F. F. M. (1999). Atividade biológica da própolis. *Revista OESP–Alimentação*, 27, 46-53.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502-2506.
- Pereira, A. S., Nascimento, E. A., & de Aquino Neto, F. R. (2002). Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(7-8), 721-726.
- Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., & Bankova, V. (2010). New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia*, 81(6), 509-514.
- Piccinelli, A. L., Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., De Simone, F., & Rastrelli, L. (2005). Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9010-9016.

- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Popova, M., Bankova, V., Chimov, A., & Silva, M. V. (2002). A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from Myroxylon balsamum trees. *Apidologie*, 33(1), 87-88.
- Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., & Bankova, V. S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70(10), 1262-1271.
- Popova, M. P., Graikou, K., Chinou, I., & Bankova, V. S. (2010). GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3167-3176.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... & Bankova, V. (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126(3), 1431-1435.
- Popravko, S. A., & Sokolov, I. V. (1980). Plant sources of propolis. *Pchelovodstvo*, (2), 28-29.
- Pratami, D. K., Mun'im, A., Sundowo, A., & Sahlan, M. (2018). Phytochemical profile and antioxidant activity of propolis ethanolic extract from tetragonula bee. *Pharmacognosy Journal*, 10(1).
- Pratsinis, H., Kletsas, D., Melliou, E., & Chinou, I. (2010). Antiproliferative activity of Greek propolis. *Journal of Medicinal Food*, 13(2), 286-290.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Ramos, A. F. N., & Miranda, J. D. (2007). Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 697-710.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1994). [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. In *Methods in Enzymology* (Vol. 234, pp. 279-293). Academic Press.

- Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., & Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2363-2370.
- Rushdi, A. I., Adgaba, N., Bayaqoob, N. I., Al-Khazim, A., Simoneit, B. R., El-Mubarak, A. H., & Al-Mutlaq, K. F. (2014). Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *SpringerPlus*, 3(1), 253.
- Russo, A., Longo, R., & Vanella, A. (2002). Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, S21-S29.
- Salah, N. M., Souleman, A. M., Shaker, K. H., Hawary, S. E., & El-Hady, F. K. A. (2017). Acetylcholinesterase, alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from Egyptian propolis. *International Journal of Pharmacognosy Phytochemistry Research*, 9, 528-536.
- Salatino, A., Teixeira, É. W., & Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33-38.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28(5), 925-936.
- Sarikaya, A. O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., & Kolayli, S. (2009). Antioxidant activity and phenolic acid constituents of chestnut (*Castania sativa* Mill.) honey and propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33(4), 470-481.
- Silva, C. C. F. D., Salatino, A., Motta, L. B. D., Negri, G., & Salatino, M. L. F. (2019). Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis from Ceará state. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 309-318.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., & Braga, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 1-7.
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K. H., & Reichling, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*, 24(S1), S20-S28.
- Segueni, N., Magid, A. A., Decarme, M., Rhouati, S., Lahouel, M., Antonicelli, F., ... & Hornebeck, W. (2011). Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Medica*, 77(10), 999-1004.
- Segueni, N., Benlabeled, K., Hassane, B., Moussaoui, F., Zellagui, A., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2014). Antibacterial activity of two Algerian propolis. *Inter. J. Pharmaceu. Sci. Rev.Res.*, 25: 106-110.

- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2016). Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S425-S428.
- Segueni N., Evren, D., Akkal, S., Beraat, Ö., & Rhouati, S. (2017) Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 1417-1423.
- Sha, N., Guan, S. H., Lu, Z. Q., Chen, G. T., Huang, H. L., Xie, F. B., ... & Guo, D. A. (2009). Cytotoxic constituents of Chinese propolis. *Journal of Natural Products*, 72(4), 799-801.
- Shrestha, S. P., Narukawa, Y., & Takeda, T. (2007). Chemical constituents of Nepalese propolis: isolation of new dalbergiones and related compounds. *Journal of Natural Medicines*, 61(1), 73-76.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A., & Alencar, S. M. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5(3), 313-316.
- Silva, V., Genta, G., Möller, M. N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., ... & Fierro, W. (2011). Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59(12), 6430-6437.
- Silva, C. C. F. D., Salatino, A., Motta, L. B. D., Negri, G., & Salatino, M. L. F. (2019). Chemical characterization, antioxidant and anti-HIV activities of a Brazilian propolis from Ceará state. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 309-318.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Silva, V., Genta, G., Möller, M. N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., ... & Fierro, W. (2011). Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59(12), 6430-6437.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sosnowski, L., & Mathewson, T. (1984). *U.S. Patent No. 4, 454,427*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Sun, L. P., Chen, A. L., Hung, H. C., Chien, Y. H., Huang, J. S., Huang, C. Y., ... & Chen, C. N. (2012). Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(47), 11748-11758.
- Sun, S., Liu, M., He, J., Li, K., Zhang, X., & Yin, G. (2019). Identification and determination of seven phenolic acids in Brazilian green propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules*, 24(9), 1791.
- Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C., & Jay, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 227-233
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., & Krol, W. (2011). Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology*, 38(4), 941-953.
- Tamas, M., Marinescu, I., & Ionescu, F. (1979). Flavonoide le din muguri de plop, Stud. Cercet. *Biochim*, 22, 207–213.
- Teixeira, É. W., Negri, G., Meira, R. M., & Salatino, A. (2005). Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 85-92.
- Tomás-Barberán, F. A., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., & Tomás-Lorente, F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, 34(1), 191-196.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.
- Touzani, S., Al-Waili, N., El Menyiy, N., Filipic, B., Pereyra, A., Arabi, I. E., ... & Lyoussi, B. (2018). Chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(7), 436.
- Tran, V. H., Duke, R. K., Abu-Mellal, A., & Duke, C. C. (2012). Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry*, 81, 126-132.
- Trusheva, B., Todorov, I., Ninova, M., Najdenski, H., Daneshmand, A., & Bankova, V. (2010). Antibacterial mono-and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 1-4.

- Usia, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2002). Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of Natural Products*, 65(5), 673-676.
- Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L., & Carvalho, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 86-92.
- Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I., & Kujumgiev, A. (2000). Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(9-10), 790-793.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), I1-1.
- Wiryowidagdo, S., Simanjuntak, P., & Heffen, W. L. (2009). Chemical composition of propolis from different regions in Java and their cytotoxic activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 180-183.
- Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., & Ratajczak, I. (2019). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Propolis Extracts From Poland. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X19849777.
- Yang, H. Y., Chang, C. M., Chen, Y. W., & Chou, C. C. (2006). 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*, 86(6), 937-943.
- Zainullin, R. A., Kunakova, R. V., Gareev, V. F., Galyautdinov, I. V., Sadretdinova, Z. R., Muslimov, Z. S., & Odinokov, V. N. (2018). Flavanones and Flavones from Bashkir Propolis. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(5), 975-977.
- Zargar, M., Azizah, A. H., Roheeyati, A. M., Fatimah, A. B., Jahanshiri, F., & Pak-Dek, M. S. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of different extracts from *Vitex negundo* leaf. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2525-2532.
- Zhou, X., Peng, J., Fan, G., & Wu, Y. (2005). Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of Chromatography A*, 1092(2), 216-221.

- Zheng, Y. Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D. F., Guo, R., & Lai, R. C. (2017). Antioxidant activity of quercetin and its glucosides from propolis: A theoretical study. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11