



N° d'ordre : 37/2024

Centre des Etudes : **Sciences et Techniques et Sciences Médicales**

Formation doctorale : **Molécules bioactives, santé et biotechnologies**

Discipline : **Biologie**

Spécialité : **Physiologie-Pharmacologie et Santé environnementale**

Laboratoire : **Substances Naturelles, Modélisation, Pharmacologie, Environnement et Qualité de vie**

Thèse de DOCTORAT

Optimisation de l'extraction et des effets pharmacologiques Synergiques *In-vitro* et *In-vivo* des produits de la ruche par plans d'expériences : *Pouvoirs antioxydant, antimicrobien et antidiabétique.*

Présentée par :

ABOULGHAZI ABDERRAZAK

Soutenue le 15 juillet 2024 devant le jury :

Pr. EL AZAMI EL IDRISI MOHAMMED	PES	FMPMD FES	Président
Pr. ZAHIR ILHAM	PH	FPD USMS BENIMELLAL	Rapporteur & examinateur
Pr. BOUYAZZA LAHBOUB	PES	FST -SETTAT	Rapporteur & examinateur
EL ARABI ILHAM	PES	FSDM -FES	Rapporteur & examinateur
Pr. TOUZANI SOUMAYA	PES	FMPMD FES	Examineur
Pr. BENZIANE EL OUARTINI ZINEB	PH	FSDM-FES	Examineur
Pr. FADIL MOUHCINE	PH	FST -FES	Examineur
Pr. LYOUSSI BADIAA	PES	FSDM -FES	Directeur de thèse
Mr. MEZZOUR MOHAMMED	ING	Direction de l'Agriculture Fès	Invité



Dédicaces

A la mémoire de mon défunt père. ...

A la mémoire de mon frère...

À la plus belle créature que Dieu a créé sur terre, À cette source de tendresse et de
générosité, À ma mère.

A ma femme **Youssra** pour la patience, le soutien, l'encouragement et le support dont
elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse et surtout ces derniers mois.

A mes chères petits anges : **Sophia et Mohamed ghazi.**

A mes chers **Mohamed METARFI** et **Hadda MELOUI**

A tous mes amis **FADIL Omar, EL KORCHI Rachid, QMICHCHOU Aziz,**
FADIL Mohamed, EL OUASSETTE Mohamed, SAKER Mohammed.

A mes collègues vous êtes assez nombreux je ne peux vous citer

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer



REMERCIEMENTS

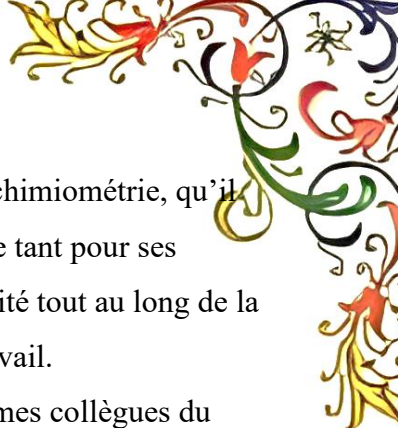
Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Professeur **LYOUSSI BADIAA**, Directrice du SNAMEPEQ USMBA FES pour son encadrement exemplaire tout au long de la réalisation de cette thèse. Sa précieuse expertise, son soutien constant et son engagement sans faille ont été des éléments essentiels qui ont contribué à la réussite de ce travail de recherche. Ses conseils éclairés, sa disponibilité et son enthousiasme ont grandement enrichi mon expérience en tant que doctorant au sein du laboratoire.

Je suis reconnaissant de la confiance qu'elle a placée à mon égard et de l'opportunité qu'elle m'a offerte, Ses encouragements et son accompagnement ont été d'une valeur inestimable pour l'avancement de mes travaux et pour mon développement académique. Je lui adresse donc mes plus vifs remerciements pour son dévouement, son inspiration, qui ont été des moteurs indispensables pour finaliser ce travail. Ses conseils avisés resteront gravés dans ma mémoire.

Mes sincères remerciements sont également adressés à Monsieur **EL AZAMI EL IDRISI** Mohammed, Professeur d'enseignement supérieur à la FMPMD de Fès, d'avoir accepté de présider cette soutenance et de juger ce travail malgré ses préoccupations.

Je tiens également à remercier Monsieur **BOUYAZZA Lahboub**, Professeur de chimie Appliquée et Environnement à la Faculté Sciences et Techniques de Settlat, Madame **ZAHIR Ilham**, professeur de Microbiologie à la faculté pluridisciplinaire de Beni Mellal et madame **EL ARABI Ilham**, Professeur de Ressources naturelles et physiologie en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail. Je vous suis très reconnaissant pour votre précieuse contribution en tant que membres du jury de ma thèse. Vos observations pertinentes et votre engagement ont grandement enrichi mon travail et ont été d'une valeur inestimable pour moi. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre soutien et votre intérêt pour mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux examinateurs de ma thèse, **Pr. BENZIANE EL OUARTINI ZINEB**, Professeur de biologie à FSDM FES, **Pr. TOUZANI Soumaya**, professeur d'anesthésie réanimation à la FMPMD FES, Votre expertise, votre attention et vos commentaires sont extrêmement précieux pour moi. Je suis reconnaissant pour le temps que vous avez consacré à évaluer mon travail et pour les conseils constructifs que vous m'avez prodigués. Merci infiniment pour votre soutien et votre contribution à la réussite de cette étape importante de ma vie académique.



Je remercie sincèrement le Mr. **FADIL MOUHCINE**, Professeur de chimiométrie, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude tant pour ses recommandations, orientations, suggestions, son soutien et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce projet et d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse tous mes sentiments de reconnaissance et du respect pour mes collègues du laboratoire SNAMEPEQ. Je nommerai principalement Professeur **LAAROUSSI HASSAN** et professeur **OUSSAID DRISS**, Phd **SOLOU najoua** pour leurs collaboration et assistance.

Un immense merci à Docteur **Zahra BENANNI** pour sa précieuse collaboration et ses recommandations avisées.



Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	I
Abstract	II
ملخص	III
Listes des figures	IV
Listes des tableaux	V
Liste des abréviations	VI

1^{ERE} PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : DE L'ABEILLE AUX PRODUITS DE LA RUCHE

Introduction Générale	1
I-1/ L'Abeille	4
I-1-1) Historique	4
I-1-2) Classification et morphologie	6
I-1-3) Systématique	7
I-1-4) Morphologie générale	7
I-1-5) Cycle de reproduction	9
I-1-6) Organisation sociale	10
I-1-7) Répartition géographique	11
I-2 / Les produits de la ruche	14
I-2-1) Miel	14
I-2-1-1) Définition	14
I-2-1-1) Classification générale	14
I-2-1-1) Types de miel au Maroc	15
I-2-1-1) Processus de fabrication par l'abeille	16
I-2-1-2) Composition chimique	17
I-2-1-3) Normes de qualité	18
I-2-2) Propolis	22
I-2-2-1) Historique	22
I-2-2-2) Définition	22
I-2-2-3) Intérêt de la propolis pour l'abeille	22
I-2-2-4) Origines botaniques	23
I-2-2-5) Récolte	25
I-2-2-5) Caractérisation physicochimique	25
I-2-2-6) Composition chimique	26

I-2-2-7) Normes de qualité	28
I-2-3) Pollen d'abeilles	29
I-2-3-1) Définition	30
I-2-3-2) Genèse	30
I-2-3-3) Structure	30
I-2-3-4) Récolte	30
I-2-3-5) Sources de pollen	30
I-2-3-6) Composition chimique	30
I-2-3-7) Normes de qualité	33

CHAPITRE II : LES PRODUITS DE LA RUCHE EN APITHERAPIE, INTERETS THERAPEUTIQUES ET MECANISMES D'EFFETS PHARMACOLOGIQUES

II-1) Apithérapie	35
II-2) Intérêts thérapeutiques et mécanismes d'effets pharmacologiques des PR	37
II-2-1) Effet antioxydant et pathologies associées	37
II-2-1-1) stress oxydatif	37
II-2-1-2) Historique	38
II-2-1-3) Définition	38
II-2-1-4) Origines des Radicaux libres	39
II-2-1-5) Les principales espèces réactives de l'oxygène	40
II-2-1-6) Conséquences biologiques du stress oxydatif	41
II-2-1-7) Mécanismes d'effet antioxydant des produits de la ruche	42
II-3) Propriété anticancéreuse des produits de la ruche	44
II-4) Effet antimicrobien des produits de la ruche	45
II-4-1) Maladies infectieuses	45
II-4-2) Définition	45
II-4-3) Bactérie et pouvoir pathogène	45
II-4-4) Antibiorésistance	46
II-4-5) Mécanismes d'effet antibactérien des produits de la ruche	47
II-5) Propriété antiparasitaire des produits de la ruche	48
II-6) Effet antidiabétique des produits de la ruche	50
II-6-1) Le diabète	50
II-6-3) Mécanisme d'effet antidiabétique des produits de la ruche	52
II-7) Propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices des produits de la ruche	54
II-8) Propriété cardioprotectrice	54
II-9) Propriété cicatrisante	55

CHAPITRE III : POLYPHENOLS DES PRODUITS DE LA RUCHE : CARCTERISATION, EXTRACTION SEPARATION ET IDENTIFICATION

III-1) Les polyphénols	56
III-1-1) Définition	56
III-1-2) Biosynthèse	57
III-1-3) Classification	84
III-1-4) Méthodes d'extraction des polyphénols issus des produits de la ruche	59
III-1-4-1) Les méthodes conventionnelles	59
III-1-4-2) Les méthodes modernes	60
III-1-5) Séparation et identification des composés phénoliques des produits de la ruche	64
III-1-6) Caractérisation des composés phénoliques des produits de la ruche	65

CHAPITRE IV : PLANS D'EXPERIENCES : NOTIONS ET APPLICATIONS

Introduction	70
IV-1/ Historique	71
IV-2/ Définitions et notions	71
IV-2-1) Plan d'expérience	71
IV-2-2) Expérience	74
IV-2-3) Facteurs	75
IV-2-4) Domaine de variation d'un facteur	75
IV-2-5) Réponses	75
IV-2-6) Matrice d'expérience	75
IV-2-7) Domaine d'expérimental	75
IV-2-8) Effet d'un facteur	77
IV-2-9) Degrés de liberté d'un modèle	78
IV-2-10) Résidus	78
IV-2-11) Fonction de désirabilité	78
IV-2-12) Représentations graphiques	79
IV-2-13) Notion de modélisation mathématique	80
IV-3) Classification des plans d'expériences	80
IV-3-1) Plan de criblage	80
IV-3-1-1) Plan Factoriel complet	80
IV-3-1-2) Plan fractionnaire	80
IV-3-1-3) Plan de Plackett & Burman	81

IV-3-2) Plans pour surface de réponse	82
IV-3-2-1) Plan composite centré	82
IV-3-2-2) Plan de box Behnken	83
IV-3-2-3) Plans de Doehlert	83
IV-3-3) Plans de mélange	84
IV-3-3-1) Mélange binaire	84
IV-3-3-2) Mélange ternaire	85
IV-4/ Techniques d'analyse et validation des modèles mathématiques	87
IV-4-1) Analyse de la variance	88
IV-4-2) Probabilité	88
IV-4-3) Coefficient de détermination R^2	88
IV-4-4) Test de signification globale de la régression	89
IV-4-5) Manque d'ajustement	89

2^{EME} PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

I- Matériel et méthodes	90
I-1) Matériels	90
I-1-1) Produits de la ruche	91
I-1-2) Matériel végétal	92
I-1-3) Matériel biologique	92
I-1-3-1) Souches fongiques	92
I-1-3-2) Souches bactériennes	93
I-2) Méthodes	94
I-2-1) Préparation des extraits	94
I-2-1-1) Extraction éthanolique de propolis	94
I-2-1-2) Extraction du pollen d'abeille	94
I-2-1-3) Extraction de miel	95
I-2-2) Caractérisation physicochimique de la propolis	95
I-2-2-1) Rendement d'extraction assistée par ultrasons	95
I-2-2-2) Détermination du pH	95
I-2-2-3) Détermination de l'humidité	96
I-2-2-4) Détermination de la cire, de résine et le baume	96
I-2-2-5) Détermination des métabolites primaires	97
I-2-2-6) Teneur en cendres	97
I-2-2-7) La teneur minérale totale	98
I-2-2-8) Détermination des métabolites secondaires	98

I-2-2-8-1) Teneur des phénols totaux : TPC	98
I-2-2-8-2) Teneur en flavonoïdes totaux : TFC	98
I-2-2-9) Evaluation de l'activité antioxydante	99
I-2-2-9-1) Activité de piégeage des radicaux libres ABTS	99
I-2-2-9-2) Dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP	99
I-2-2-9-3) Détermination de l'inhibition du radical DPPH	99
I-2-3) Screening phénolique par HPLC-DAD	100
I-2-4) Evaluation de l'activité antimicrobienne des produits de la ruche	101
I-2-4-1) Test <i>In-vitro</i> de l'activité antifongique	101
I-2-4-2) Test <i>In-vitro</i> de l'activité antibactérienne	102
I-2-5) Evaluation de l'activité anti-diabétique <i>In-vivo</i>	103
I-2-5-1) Protocole d'induction du DT2	104
I-2-5-2) Protocole du traitement	105
I-2-6) Protocoles expérimentaux d'optimisation et de mélanges	105
I-2-6-1) Optimisation d'extraction assistée par ultrasons de la propolis : BBD	106
I-2-6-2) Plan de mélange ternaire miel -propolis- pollen d'abeille : Plan augmenté centré	107
I-2-6-3) Mélange binaire propolis et feuille d' <i>Olea Europaea</i> . : Simple de réseaux	108
I-2-7) Détermination des paramètres biochimiques et leur pourcentage de changes	109
I-2-8) Outils d'optimisation	110
I-2-9) Analyse statistique	110

ETUDE I : CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DE LA PROPOLIS MAROCAINE DE LA REGION FES-MEKNES ET EVALUATION DE SES ACTIVITES ANTIOXYDANTE ANTIFONGIQUE

Résumé	113
II- 1) Résultats et discussions	114
II-1-1) Caractérisation physico-chimique des Propolis	115
II-1-2) Dosage des Métabolites primaires et minéraux	116
II-1-3) Dosage des métabolites secondaires et évaluation de l'activité antioxydante	118
II-1-3-1) Dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux	151
II-1-3-2) Evaluation de l'activité antioxydante	118
II-1-4) Screening phénolique par HPLC-DAD	118
II-1-5) Activité antifongique	119
Conclusion	122

ETUDE II : OPTIMISATION SIMULTANEE DU RENDEMENT D'EXTRACTION, DES COMPOSES PHENOLIQUES ET DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE LA PROPOLIS MAROCAINE : APPORT DE L'ULTRASONICATION ET L'UTILISATION DE LA METHODOLOGIE DE SURFACE DE REPONSE

Résumé	124
Résumé graphique	125
II-2) Résultats du plan d'optimisation Box-Behnken	128
II-2-1) Validation statistique du modèle postulé	133
II-2-2) Estimation des paramètres du modèle et modèles ajustés	133
II-2-3) Optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons	133
II-2-4) Effets des conditions expérimentales sur les réponses étudiées	133
II-2-4-1) Effets des conditions expérimentales sur rendement d'extraction	133
II-2-4-2) Effet des conditions expérimentales sur la réponse TPC	134
II-2-4-3) Effet des conditions expérimentales sur la réponse TFC	134
II-2-4-4) Effet des conditions expérimentales sur la réponse DPPH-IC ₅₀	134
II-2-4-5) Effet des conditions de fonctionnement sur la réponse du FRAP-EC ₅₀	135
II-2-6) Optimisation simultanée des réponses	138
II-2-7) Screening phénolique de l'extrait optimisé de la propolis	139
Conclusion	140

ETUDE III : OPTIMISATION PAR PLAN DU MELANGE DU SCREENING PHENOLIQUE ET L'EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DE LA SYNERGIE MIEL, PROPOLIS ET POLLEN D'ABEILLE

Résumé	142
II-3) Résultat et discussions	143
II-3-1) Screening phénolique	143
II-3-2) Analyse des activités antioxydante et antibactérienne des produits de la ruche	144
II-3-3) Optimisation des mélanges par PEX	146
II-3-4) Validation statistique des modèles postulés	147
II-3-5) Effet des composants des mélanges et de leurs interactions sur les réponses	153
II-3-5-1) Effet sur l'activité antioxydante	153
II-3-5-2) Effets sur l'activité antimicrobienne	154
II-3-6) Analyse des graphes des Mélanges	156
II-3-6-1) Activité antioxydante	156
II-3-6-2) Activité Antibactérienne	156
II-3-7) Optimisation simultanée des réponses étudiées	156
Conclusion	159

ETUDE IV : EVALUATION *IN-VIVO* DE L'EFFET DU MELANGE BINAIRE DES EXTRAITS DE LA PROPOLIS MAROCAINE ET DES FEUILLES D'*OELEA EUROPAEA* SUR LE DIABETE DE TYPE 2 INDUIT PAR LE FRUCTOSE ET LA STREPTOZOTOCINE CHEZ LE RAT : FORMULATION PAR PLAN D'EXPERIENCE

Résumé	161
II-4) Résultat et discussions	162
II-4-1) Détermination de taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux	162
II-4-2) Screening phénolique	163
II-4-3) Validation statistique du modèle postulé	168
II-4-4) Effets des facteurs sur les modèles mathématiques	169
II-4-4-1) Effets des facteurs Taux de changement de la glycémie	169
II-4-4-2) Effets des facteurs Taux de changement d'insulinémie	170
II-4-4-3) Effets des facteurs Taux de changement d'HOMA-IR	170
II-4-4-4) Effet des facteurs Taux de changement de HbA ₁ C	170
II-4-4-5) Effet des facteurs Taux de changement de poids corporel	170
II-4-5) Optimisation du mélange pour les réponses étudiées	172
II-4-5-1) Taux de changement de la glycémie	172
II-4-5-2) Taux de changement d'insulinémie	172
II-4-5-3) Taux de changement d'HOMA-IR	172
II-4-5-4) Taux de changement de HbA ₁ C	172
II-4-5-5) Taux de changement de poids corporel	173
II-4-6) Étude de la désirabilité	174
II-4-6-1) Taux de changement de la glycémie	175
II-4-6-2) Taux de changement d'insulinémie	175
II-4-6-3) Taux de changement d'HOMA-IR	175
II-4-6-4) Taux de changement de HbA ₁ C	175
II-4-6-5) Taux de changement de poids corporel	175
II-4-6-6) Optimisation simultanée des réponses étudiées	177
II-4-7) Discussions	178
Conclusion	180
Conclusion générale	181

RESUME

La propolis, le miel et le pollen sont des produits de la ruche dotés d'un potentiel thérapeutique lié à leur teneur élevée en principes bioactifs tels que les polyphénols, aux propriétés pharmacologiques démontrées dans de nombreuses études.

Dans ce travail nous envisageons d'utiliser l'approche de modélisation mathématique, notamment des plans d'expériences, pour déterminer les conditions optimales d'extraction des molécules bioactives issues de ces produits de la ruche. Cette méthodologie nous permettra d'optimiser les paramètres clés influençant leur processus d'extraction et les combinaisons synergiques de leurs extraits, afin d'obtenir des extraits ou des mélanges de la ruche riches en polyphénols et dotés de haute valeur antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique.

La caractérisation physicochimique des propolis de la région de Fès-Meknès a démontré leur richesse en métabolites actifs avec des teneurs variant entre 117 et 194 mgAGE/g pour la TPC et entre 17,45 et 24,79 mgQE/g pour la TFC. L'analyse par HPLC-DAD a identifié 13 composés phénoliques au pouvoir antioxydant important retrouvé aux tests FRAP (72-115 µg/ml) et ABTS (100-118 µmol/g). L'effet antifongique s'est traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) variant entre 31,2 et 62,5 µg/ml. L'optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons de la propolis s'est basée sur la méthodologie de surface de réponse et notamment le plan de Box-Behnken et ses trois variables : Temps de sonication, rapport solvant/propolis et concentration du solvant. Une durée de sonication de 15 minutes, un rapport solvant/propolis de 30 ml/g et une concentration de 40% du solvant ont permis d'obtenir les valeurs maximales de 15,39%, 192 mgAGE/g, 45,15 mgQEq/g, 29,8 µg/ml et 128,3 µmol Fe²⁺/g, pour le rendement d'extraction, la TPC, la TFC, la DPPH-IC₅₀, et la FRAP-EC₅₀ respectivement. De plus, la technique de plan de mélange a permis de révéler une formulation ternaire optimale à base de la propolis (28,53%), miel (36,33%) et pollen d'abeille (35,13%) aux propriétés suivantes : TPC à 226,88 mgAGE/g, DPPH-IC₅₀ à 10,64 µg/ml et des CMI contre *S. aureus* et *E. coli* de l'ordre de 4,68 µg/ml et 6,11 µg/ml respectivement. Tandis qu'une optimisation binaire des extraits de la propolis (49%) extraits des feuilles d'*Olea europaea* (51%) a démontré une amélioration des marqueurs de l'homéostasie glucidique chez un modèle expérimental du diabète type 2 induit par la STZ : une diminution des taux de changements de la glycémie, d'indice HOMA-IR et du HbA_{1c} avec des valeurs de 68,95%, 30,36 %, 19,24 % respectivement et a abouti à une augmentation de l'insulinémie de 148,08 %.

Ces études ont montré la richesse des produits de la ruche en molécules bioactives et l'importance de la modélisation mathématique dans l'optimisation de leurs méthodes d'extraction, leur efficacité en tant qu'agents antioxydants, antibactériens ainsi que leur rôle amélioratif des marqueurs d'homéostasie glucidique. D'autres recherches ciblant des combinaisons synergiques de produits cellulaires sont nécessaires.

Mots clés : Produits de la ruche, plans d'expériences, extraction assistée par ultrason, screening phénolique, optimisation, antioxydant, antimicrobien, diabète

ABSTRACT

Propolis, honey and pollen are bee products with therapeutics potentials linked to their high content of bioactive principles such as polyphenols with well demonstrated pharmacological properties. Furthermore, optimizing the extraction of these bioactive compounds using mathematical modelling is gaining in popularity, particularly in the field of experimental design.

In this work, we plan to use a mathematical modeling approach, including experimental design, to determine the optimal conditions for extracting bioactive molecules from these hive products. This methodology will enable us to optimize the key parameters influencing their extraction process and the synergistic combinations of their extracts, in order to obtain polyphenol-rich hive extracts or mixtures with high antioxidant, antimicrobial and antidiabetic value.

Physicochemical characterization of propolis from the Fes-Meknes region revealed a high content of active metabolites, ranging from 117 to 194 mgGAE/g for polyphenols and from 17.45 to 24.79 mgQE/g for total flavonoids. HPLC-DAD analysis identified 13 phenolic compounds with significant antioxidant power, as measured by FRAP (72-115 $\mu\text{g/ml}$) and ABTS (100-118 $\mu\text{mol/g}$) tests. The antifungal effect resulted in minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 31.2 to 62.5 $\mu\text{g/ml}$. Optimization of ultrasound extraction parameters for propolis was based on response surface methodology (RSM) and in particular the Box-Behnken design (BBD) with its three variables: sonication time, solvent/propolis ratio and solvent concentration. A sonication time of 15 minutes, a solvent/propolis ratio of 30 ml/g and a solvent concentration of 40% resulted in maximum values of 15.39% 192 mgAGE/g, 45.15 mgQE/g, 29.8 $\mu\text{g/mL}$ and 128.3 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, for the extraction yield, TPC, TFC, DPPH-IC₅₀ and FRAP-EC₅₀ respectively. In addition, the mixing plan technique revealed an optimal formulation based on propolis (28,53%), honey (36.33%) and bee pollen (35.13%) with the following properties: TPC at 226.88 mgGAE/g, DPPH-IC₅₀ at 10.64 $\mu\text{g/ml}$ and MICs against *S. aureus* and *E. coli* of the order of 4.68 $\mu\text{g/ml}$ and 6.11 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Similarly, extraction optimization resulted in the optimal combination of propolis extract (49%) and *Olea europaea* leaf extract (51%). The biological properties of this formulation were demonstrated an improvement in markers of carbohydrate homeostasis in an experimental model of type 2 diabetes induced by STZ: a decrease in the rates of change of glycaemia, HOMA-IR index and HbA1C with values of 68.95%, 30.36%, 19.24% respectively and resulted in an increase in insulinemia of 148.08%.

These studies have demonstrated the richness of hive products in bioactive molecules and the importance of mathematical modeling in optimizing their extraction methods, their efficacy as antioxidant and antibacterial agents, and their role in improving markers of carbohydrate homeostasis. Further research targeting synergistic combinations of bee products is required.

Key words: bee products, experimental design, ultrasound-assisted extraction, phenolic screening, optimization, antioxidant, antimicrobial, diabetes

يعتبر العكبر والعسل وحبوب اللقاح من منتجات خلية النحل ذات الإمكانيات العلاجية بسبب محتواها العالي من المركبات الكيميائية المضادة للأكسدة النشطة بيولوجياً مثل البولي فينولات، وقد أظهرت هذه الأخيرة خصائصاً دوائية تم إثباتها في العديد من الدراسات.

هذا العمل يهدف إلى استخدام النمذجة الرياضية، وتحديدًا التصميم التجريبي، لاستنتاج الظروف المثلى لاستخراج الجزيئات النشطة بيولوجياً من منتجات خلية النحل ومضادة للميكروبات ومحسنة لمؤشرات توازن السكري في نموذج تجريبي لمرض السكري.

أولاً أظهر التوصيف الفيزيائي والكيميائي للعكبر المحلي أنه غني بالمستقلبات النشطة، بمستويات تتراوح بين 117 إلى 194 ملغم من الكمية في الغرام الواحد بالنسبة للتركيز الكلي لمتعدد الفينول ومن 45,17 إلى 79,24 ملغم لمردود الاستخلاص بالنسبة للتركيز الإجمالي من الفلافونويدات. في حين أن التحليل بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء أظهر توفرها على 13 مركباً فينولياً وذات قوة مضادة للأكسدة تراوحت بين 72 و115 ميكروغرام في الملييلتر بالنسبة لتحليل FRAP وبين 100 و118 ميكرومول في الملييلتر بالنسبة لتحليل ABTS بينما التركيزات المثبطة الدنيا المضادة للفطريات تراوحت بين 2,31 و5,62 ميكروغرام في الملييلتر الواحد من العكبر.

ثانياً ولتحسين استخلاص المركبات الكيميائية بمساعدة الموجات فوق الصوتية قمنا باستعمال منهجية سطح الاستجابة بتصميم ومتغيراته الثلاثة: مدة الموجات، ونسبة المذيب/ العكبر وتركيز المذيب. وقد توصلنا إلى كون 15 دقيقة، ونسبة 30 مل/غرام، مذيب/عكبر وتركيز المذيب 40% أعطت نسباً قصوى قدرها 39,15% لمردود الاستخلاص، و192 ملغم من متعدد الفينولات، 15,45 ملغم من الفلافونويدات. في الغرام الواحد من العكبر.

وبالإضافة إلى ذلك، كشفت تقنية تصميم الخليط عن تركيبة ثلاثية مثالية مكونة من العكبر (36,33%) والعسل 28,53% حبوب لقاح النحل (35,13%) بالخصائص التالية: 226,88 ملغم/غرام الواحد بالنسبة للتركيز الكلي لمتعدد الفينول، و10,64 ميكروغرام/مل بالنسبة DPPH-IC₅₀ في حين بلغت التركيزات الدنيا الكابحة للمكورات العنقودية الذهبية نسبة 4,68 ميكروغرام/مل ولإشريكية القولونية نسبة 6,11 ميكروغرام/مل.

وفي الأخير أظهر الخليط الثنائي لمستخلصات العكبر (49%) ومستخلصات أوراق الزيتون (51%) والذي حصلنا عليه باستخدام نموذج خليط ثنائي، تحسناً في علامات توازن السكري في نموذج تجريبي لمرض السكري من النوع الثاني المحدث تجريبياً: انخفاضاً في كل من نسب على التوالي ب نسبة السكر في الدم (68,95%)، ومؤشر مقاومة الأنسولين (30,36%) ومخزون السكر 23,00% في حين أدت إلى ارتفاع في نسبة الأنسولين (148,18%).

كل هذه الدراسات أظهرت غنى منتجات النحل من الجزيئات الفعالة وكذا أهمية النمذجة الرياضية في الرفع من فعالية طرق استخلاصها وفعاليتها كمضادات للأكسدة ومضادات للجراثيم ودورها في التحسين من مؤشرات توازن السكري المحدث تجريبياً. لهذا يلزم إجراء المزيد من الأبحاث التي تستهدف التركيبات التآزرية لهذه المنتجات.

كلمات مفتاحية: منتجات خلية النحل، التصميم التجريبي، الاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية، فحص الفينول، التحسين الأمثل، مضادات الأكسدة، مضاد الجراثيم، داء السكري.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Peinture rupestre réalisée en 6000 av. J.-C., Cueva de Arana, Espagne.....	5
Figure 2 : Verset du Quran parlant du miel.....	5
Figure 3 : Verset de la bible consacré au miel.....	5
Figure 4 : Classification systématique de l'espèce <i>Apis mellifera</i>	7
Figure 5 : Morphologie détaillée de l'abeille ouvrière	8
Figure 6 : Cycle de vie de l'abeille	9
Figure 7 : Les castes de la colonie d'abeille <i>Apis mellifera</i>	9
Figure 8: Distribution géographique des espèces du genre <i>Apis</i> au monde	10
Figure 9: Distribution géographique des espèces du genre <i>Apis</i> au Maroc.....	11
Figure 10 : Type de miel selon les régions du Maroc [46]	14
Figure 11 : Principaux composants retrouvés dans des miel multif floraux (moyenne sur 490 miels)	15
Figure 12: Grille de récolte de la propolis	20
Figure 13: Récolte de la propolis par grattage	20
Figure 14 : Composition chimique de la propolis brute	21
Figure 15: Grains de pollen sur pattes d'abeille.....	25
Figure 16: Alvéoles remplies du pollen	25
Figure 17 : Composition chimique générale du pollen d'abeille	26
Figure 18 : classification des produits de la ruche.	30
Figure 19 : Schéma représentatif de la balance Antioxydants / ERO.....	33
Figure 20 : Origines intracellulaires des ERO.....	34
Figure 21 : Mécanismes moléculaires des polyphénols comme suppléments d'antioxydants	38
Figure 22 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	41
Figure 23 : Modèle structural de la défensine 1 d' <i>Apis mellifera</i>	43
Figure 24 : Mécanismes d'effets antimicrobien du miel et ses dérivés.....	44
Figure 25 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le DT1	45
Figure 26 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le DT2	47
Figure 27 : Mécanismes d'effets antidiabétiques des produits de la ruche	48
Figure 28: structure chimique générale des polyphénols	50
Figure 29 : Classification des polyphénols	52
Figure 30 : Montage et principe de l'extraction assistée par ultrason	54
Figure 31 : Montage et principe de l'extraction assistée par microondes	55
Figure 32 : Schéma de l'extraction au CO ₂ supercritique.....	56
Figure 33 : Représentation schématique de l'extraction de composés phénoliques avec SEP.....	56
Figure 34 : Composants de l'HPLC	57
Figure 35 : Principaux acides phénoliques retrouvés dans le miel	58
Figure 36 : Principaux flavonoïdes identifiés dans le miel	59
Figure 37 : Structure chimique des molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis	60
Figure 58: Localisation géographique des produits de la ruche étudiés.	61
Figure 59: Souches fongiques utilisées (LSNAMOPEQ)	63
Figure 60 : Isolat de <i>S. aureus</i> sur milieu de culture Chapman (LSNAMOPEQ).....	64
Figure 61 : isolat d' <i>E. coli</i> sur milieu de culture CLED (LSNAMOPEQ).....	64
Figure 62 : Protocole expérimentale de Détermination simultanée de la cire, de résine et le baume.....	67
Figure 63 : Protocole de l'évaluation de l'activité antifongique.....	72
Figure 64 : Protocole de l'évaluation de l'activité antibactérienne	73
Figure 65 : Schéma du plan augmenté centré.....	77
Figure 66 : Résumé graphique de la caractérisation physicochimique de la propolis Marocaine	83
Figure 67 : Graphes paramètres physicochimiques des extraits des propolis étudiées.....	84
Figure 68 : Teneur en métabolites primaires et minéraux des propolis étudiées)	85
Figure 69 : Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits des propolis étudiée	86
Figure 70 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des propolis étudiées.	87
Figure 71 : Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits des propolis étudiées	88
Figure 72 : Microplaque de l'activité antifongique des extraits de la propolis	90
Figure 73 : Protocole expérimental de l'optimisation simultanée du rendement d'extraction par ultrasons, des composés phénoliques et de l'activité antioxydante des extraits de la propolis marocaine : apport de la méthodologie de surface de réponse.....	92
Figure 74 : Courbes des valeurs réelles par rapport aux valeurs prédites.....	96
Figure 75 : Graphes tridimensionnels pour l'extraction assistée par ultrasons de la propolis marocaine, 0.....	102

LISTE DES FIGURES

Figure 76 : Courbes de contour d'extraction assistée par ultrasons de la propolis Marocaine	102
Figure 77 : Graphes de désirabilité montrant le réglage précis pour l'optimisation des réponses	103
Figure 78 : Graphes de désirabilité d'optimisation simultanée des réponses	104
Figure 79 : Chromatogrammes HPLC-DAD de composés phénoliques d'extraits optimal	105
Figure 80 : Protocole expérimental d'optimisation par plan du mélange.....	109
Figure 81 : Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits des produits de la ruche étudiés.....	111
Figure 82 : Microplaque de détermination des CMI des mélanges des PR contre <i>E.coli</i>	115
Figure 83 : Microplaque de détermination des CMI des mélanges contre <i>S. aureus</i>	115
Figure 84 : Représentation des valeurs expérimentales et prédites des réponses étudiées	116
Figure 85 : Graphes 2D et 3D des mixtures du miel, propolis et pollen d'abeille	122
Figure 86 : Graphe 2D de désirabilité	123
Figure 87 : Schéma de l'évaluation <i>In-vitro</i> et <i>In-vivo</i> de l'activité anti-diabétique combinée	127
Figure 88 : Chromatogramme HPLC- DAD de l'extrait méthanolique de la propolis étudiée	129
Figure 89 : Chromatogramme HPLC- DAD de l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Olea Europaea</i>	129
Figure 90 : Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs prédites pour les réponses	132
Figure 91 : Graphique de mélange binaire qui montre la zone de maximisation des réponses	137
Figure 92 : Profil de désirabilité du mélange optimal pour optimiser le taux de changement de la glycémie	140
Figure 93 : Profil de désirabilité du mélange optimal pour optimiser le taux de changement de l'insulinémie	140
Figure 94 : Profil de désirabilité du mélange optimal pour optimiser le taux de changement HOMA-IR.....	140
Figure 95 : Profil de désirabilité du mélange optimal pour optimiser le taux de changement HbA1c.....	140
Figure 96 : Profil de désirabilité du mélange optimal pour optimiser le taux de changement du poids corporel	140
Figure 97 : Graphe de désirabilité simultanée des réponses	141

LISTE DES ABREVIATIONS

Tableau 1 : Races d' <i>Apis mellifera</i> au Maroc	12
Tableau 2 : Les types de propolis les plus répandus au monde.....	19
Tableau 3 : Normes de qualité de la propolis d'Europe , d'Afrique et du Brésil.....	24
Tableau 4 : Les caractéristiques physicochimiques du pollen d'abeille de qualité	29
Tableau 5 : Matériel apicole et végétal étudiés.....	62
Tableau 6 : Profil de sensibilité des souches aux antifongiques (S : sensible, I : intermédiaire, R : résistante) ..	64
Tableau 7 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées.....	65
Tableau 8 : Le système des solvants de la phase mobile – HPLC -DAD-	71
Tableau 9 : Groupes expérimentaux des rats utilisés pour le DT2	74
Tableau 10 : Conditions expérimentales des essais du plan Box-Behnken.	75
Tableau 11 : Niveaux réels et codés des variables indépendantes utilisées pour le BBD	76
Tableau 12 : Variables codées et niveaux des facteurs choisis	77
Tableau 13 : Matrice expérimentale du plan de mélange ternaire miel-propolis-pollen d'abeille	77
Tableau 14 : Composants et facteurs du plan expérimental choisi	78
Tableau 15 : Matrice expérimentale des résultats obtenus pour les réponses étudiées.....	79
Tableau 16 : Concentrations des composés phénoliques dans l'EEPOA et EEPSPF.....	89
Tableau 17 : Résultats de l'activité antifongique des extraits des propolis.....	90
Tableau 18 : Matrice de BBD et résultats pour le rendement d'extraction assistée par ultrason de la propolis...	94
Tableau 19 : Test ANOVA pour les modèles ajustés.....	95
Tableau 20: Coefficients de régression estimés du modèle cubique spécial	99
Tableau 21: Quantification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait optimal de la propolis	106
Tableau 22 : Profil phénoliques dans les produits de la ruche étudiés obtenus par HPLC -DAD).....	110
Tableau 23 : Activités antioxydante et antimicrobienne individuelles du miel, propolis et pollen d'abeille	112
Tableau 24: Plan d'expérience des mélanges des extraits des produits de la ruche étudiés.....	114
Tableau 25: Analyse de la variance pour les différents modèles ajustés aux réponses	117
Tableau 26: Coefficients estimés de régression des modèles	118
Tableau 27 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes de la propolis et des feuilles d' <i>Olea europaea</i>	128
Tableau 28: Composés phénoliques détectés par HPLC-DAD de la propolis et des feuilles d' <i>Olea europaea</i> .	130
Tableau 29 : Matrice expérimentale des résultats obtenus pour les réponses étudiées	130
Tableau 30: Analyse de la variance des réponses étudiées.	133
Tableau 31: Coefficients des modèles mathématiques postulés	136
Tableau 32: Désirabilité de l'optimisation simultanée des réponses étudiées	142

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Activité antioxydante
ABTS : Acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique.
ASB : Albumine sérique bovine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANOVA : Analyse de la variance
AGE: acide gallique Equivalent
BBD: box Behnken design
BHT: hydroxytoluène butylé
BSD : Bouillon Sabouraud dextrose
 β_{ij} : Coefficient des termes du modèle
CMF : Concentration minimale fongicide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CMB : Concentration minimale bactéricide
DT2 : diabète type 2
DPPH: Diphenyl-picrylhydrazine
Ddl : Nombre de degrés de liberté
DCM : Dichlorométhane
DPPH : 2,2-diphényl -1-picryl-hydrazyl
EAA: Equivalent d'acide ascorbique
EAU : Extraction assistée par ultrason
EEP : Extrait éthanolique
EUCAST : Le Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens
FRAP: Pouvoir de réduction ferrique
HPLC : chromatographie liquide de haute performance
Ip : intra-péritonéale
PR : Produits de la ruche
p-value : Probabilité de significativité
p38MAPKs: Phospho p38 mitogen-activated protein kinases
PEX : plans d'expériences
QE: quercétine Equivalent
RLM : Régression linéaire multiple
SCE : Sommes des carrés des écarts
SCM : somme des carrés due à la moyenne
SCRC : somme des carrés des réponses calculées
SCRCm : Somme des carrés des réponses calculées corrigée de la moyenne

LISTE DES ABREVIATIONS

SCRM : Somme des carrés des réponses mesurées

STZ : streptozotocine

SCRMm : Somme des carrés des réponses mesurées corrigée à la moyenne

TPM : Tour par minute

TPTZ: 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine

TLR: Toll-like receptors

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

$\mathbf{b}$: Vecteur de tous les coefficients du modèle

$\mathbf{b}$: Vecteur de tous les coefficients déterminés avec l'hypothèse des moindres carrés

X_i : Facteur

Y : Réponse

Le recours à des pratiques thérapeutiques naturelles suscite un regain d'intérêt de la communauté scientifique pour les propriétés des produits naturels [1]. De nombreuses études scientifiques récentes viennent confirmer, préciser et approfondir les connaissances traditionnelles à ce sujet, et notamment dans le domaine des produits de la ruche [2]. De nos jours, l'apithérapie moderne est définie comme pratique qui utilise les abeilles et leurs produits pour prévenir les maladies ou contrôler leur progression [3]. Il est extrêmement important de faire une distinction entre deux formes d'apithérapie :

- ✓ L'apithérapie traditionnelle, qui a été pratiquée depuis des millénaires dans diverses civilisations et qui continue à être considérée une partie de la médecine complémentaire et intégrative dans de nombreux pays pour traiter de nombreuses maladies [4]. Parfois, elle repose sur des convictions philosophiques ou spirituelles, s'éloignant ainsi du strict cadre scientifique [5].
- ✓ L'apithérapie "médicale", une branche de la médecine contemporaine qui s'appuie sur les références et les techniques scientifiques de "la médecine fondée sur la preuve" dans ses investigations. Elle repose sur des traitements reproductibles, contrôlés et normalisés, ciblant des pathologies spécifiques avec un objectif, à la fois préventif et/ou curatif, scientifiquement établi [6].

Le miel, la propolis et le pollen d'abeille sont des produits de l'abeille utilisés depuis des siècles pour leurs vertus thérapeutiques [7]. Ils sont largement reconnus pour leurs propriétés en raison de leur composition bioactive à base principalement de polyphénols [8],[9], [10], [11]. Leurs effets ont été démontrés dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ainsi que dans des essais cliniques [12]. La propolis est une substance résineuse employée par les abeilles pour sceller les fissures de la ruche, assurant ainsi son herméticité et garantissant l'asepsie à l'intérieur des alvéoles. Elle est exploitée dans l'industrie nutraceutique et alimentaire en tant que complément alimentaire doué d'effet antiviral, immunomodulateur et antidiabétique [13]. Le miel est une substance sucrée et nutritive obtenue à partir du nectar et du miellat. Il est très riche en vitamines, minéraux et divers composés chimiques et possède des propriétés cicatrisantes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et anti-cancéreuses [14]. Le pollen d'abeille est un cocktail naturel de nectar floral, du pollen, d'enzymes et de sécrétions salivaires abeilles riche en protéines, polysaccharides, polyphénols, lipides, minéraux et vitamines. Il constitue un aliment fonctionnel exerçant un effet protecteur contre de nombreuses maladies, notamment le diabète, le cancer, les maladies infectieuses et cardiovasculaires.

Les polyphénols apicoles sont des métabolites secondaires des plantes [15] mélangés par l'abeille au nectar et s'enrichissant au contact d'entre eux dans la ruche et dont la bioactivité

dépend de plusieurs paramètres : variétés d'abeilles, végétation, zone géographique et saisons de récolte [16]. Les principaux groupes de phénols retrouvés dans ces produits sont les acides phénoliques, les terpènes, les flavonoïdes et les dérivés azotés [17], [18]. Néanmoins, l'extraction est l'étape cruciale pour récupérer les composés bioactifs à partir des matières apicoles. De nombreux facteurs (type du solvant, température/ temps d'extraction ou autres...) peuvent influencer significativement l'efficacité de l'extraction, l'activité antioxydante et le contenu phénolique [19]. Par conséquent, il est nécessaire d'optimiser les conditions d'extraction pour obtenir des taux élevés en ces composés. Intégrer les méthodes de plan d'expériences pour concevoir, organiser et déterminer les facteurs qui ont le plus d'impact sur les résultats de l'expérience permettent de trouver la meilleure combinaison de ces facteurs pour avoir un extrait de haute qualité pharmacologique et biologique.

Les plans d'expériences (PEX) sont des outils statistiques utilisés pour optimiser les proportions de différents ingrédients dans une mixture [20]. Ils sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique pour améliorer la qualité et la rentabilité des produits [21], [22]. Dans le cas des produits de la ruche, ces outils peuvent offrir de nombreux avantages pour préserver ces produits terroirs et contribuer ainsi à préserver les espèces d'abeilles. Ils seraient aussi bénéfiques pour optimiser les proportions de ces produits afin de créer une mixture apicole (un cocktail de la ruche) de qualité supérieure avec des propriétés nutritionnelles et physicochimiques spécifiques en termes de saveur, texture et richesse en composés phénoliques aux pouvoirs antioxydants et biologiques importants.

Dans cette optique, le présent travail a pour objectifs de caractériser certains produits de la ruche d'origine Marocaine, d'en optimiser les conditions d'extraction et d'en former des mixtures entre eux ou avec d'autres produits végétaux en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. L'objectif principal étant d'élucider l'apport des outils actuels de plan d'expériences pour obtenir des extraits des produits de la ruche avec des taux importants des composés phénoliques et pour avoir des mixtures apicoles à haute valeur pharmacologique.

Ce travail de thèse est composé de trois volets :

- Le premier volet détaille, dans une synthèse bibliographique, les différentes connaissances liées à l'apithérapie et produits de la ruche, aux différentes méthodes d'extraction de leur contenu phénolique et aux notions de base sur les plans d'expérience et des outils statistiques utilisés.
- Le deuxième volet concerne la partie expérimentale qui détaille la méthodologie ainsi que les résultats obtenus en termes de :
 - ✓ Caractérisation physicochimique et biologique de certaines propolis de la région de Fès Meknès.

- ✓ Optimisation des conditions d'extraction de la propolis par ultrason en évaluant son rendement, son pouvoir antioxydant et son effet anti radicalaire DPPH : Exploitation du plan simplex centroïde augmenté design.
 - ✓ Formulation d'une mixture ternaire à base de la propolis, miel, et pollen d'abeille dotée d'un puissant pouvoir antioxydant et activité antimicrobienne par application de plan de mélange.
 - ✓ Optimisation de l'effet anti-diabétique par le plan simplex Lattice Design d'une formulation à base des extraits de la propolis et des polyphénols des feuilles d'olivier expérimentée sur modèle murin.
- Enfin ce travail va s'ouvrir sur les futures perspectives en termes de nouvelles approches technologiques en faveur de l'optimisation et l'obtention des extraits biactifs dotés de propriétés pharmacologiques ciblées.



1 Ère partie Revue bibliographique

CHAPITRE I : DE L'ABEILLE AUX PRODUITS DE LA RUCHE

I.1 Abeille

I.1.1 Historique.

L'appellation "miel" telle que nous la connaissons aujourd'hui n'est apparue qu'au X^e siècle. Ce terme trouve son origine dans le mot latin "mel", qui a également influencé d'autres langues romanes, comme le portugais où l'on dit "O mel". Cependant, l'utilisation du miel par les humains remonte à une époque bien plus lointaine et les abeilles, productrices de cette substance, existent sur notre planète depuis environ 80 millions d'années [23].

En effet, la collecte du miel par nos ancêtres remonte à la préhistoire. Les humains préhistoriques ont rapidement découvert les propriétés sucrées du miel et ont appris à le récolter directement à partir des nids d'abeilles sauvages. Cependant, cette récolte primitive était souvent destructrice pour les colonies d'abeilles, ils n'avaient pas encore développé les connaissances et les techniques nécessaires pour gérer les abeilles et les colonies de manière durable [24]. Ils utilisaient donc des méthodes rudimentaires et généralement intrusives pour obtenir le miel parmi, ces méthodes et les plus couramment utilisées étaient [25] :

- Destruction des colonies : qui consistait à détruire entièrement le nid d'abeilles et en brisant le tronc d'arbre pour extraire le miel ce qui réduisait rapidement la population d'abeilles locales et ne permettait pas aux colonies de se rétablir.
- Déloger les abeilles : impliquait de déloger les abeilles du nid sans les tuer. Cela se faisait souvent en utilisant la fumée pour calmer les abeilles, puis en déplaçant le nid pour accéder au miel. Cependant, cela pouvait encore être nuisible aux colonies, car la manipulation pouvait perturber leur organisation sociale et leurs ressources alimentaires.

L'apiculture a connu une évolution significative vers la fin du XVIII^e siècle avec l'introduction de la ruche à cadres mobiles. Cette innovation a marqué un tournant dans les pratiques apicoles, permettant aux apiculteurs de récolter le miel de manière sélective sans compromettre la survie de la colonie. [26],

Les premiers ancêtres des abeilles seraient apparus en concomitance avec des végétaux à reproduction sexuée : les angiospermes [27] . Les plus anciennes traces de pratiques apicoles domestiques remontent à l'antiquité dans tout le bassin méditerranéen où des peintures rupestres dans la grotte de l'araignée (cueva de la Araña) près de Valence en Espagne, datant de 7000 ans av. J.C, qui démontre les premières traces de l'apiculture (figure 1) [28] . D'autres traces de la cire d'abeille remontent au néolithique anatolien où deux résidus de cire d'abeille ont été identifiées sur le site de Çayönü Tepesi, en Turquie [29]. Cela suggère un usage très répandu du miel par l'Homme tout au long de son Histoire.



Figure 1: Peinture rupestre réalisée en 6000 av. J.-C., Cueva de Arana, Espagne

Le miel est également retrouvé dans le Saint Quran où tout un verset en été consacré : sourate les abeilles سورة النحل (figure 2) et la Bible (figure 3) qui le présentent comme un des symboles de la prospérité et de l'abondance et source d'immortalité [30]. Dans l'Egypte ancienne, l'abeille avait une importance particulière et était vénérée en tant que symbole national du pays et était associée à la déesse Neith où l'image de l'abeille a également été utilisée dans l'iconographie royale, symbolisant la monarchie et l'autorité du pharaon [31]. Bien que les anciens Égyptiens n'aient pas connu l'apiculture moderne avec des ruches, ils avaient des connaissances sur les abeilles et savaient récolter le miel et la cire à partir des abris qu'ils fabriquaient en poterie et en osier pour les abeilles sauvages [32]. Ce produit de la ruche était associé au bonheur où les jeunes mariés buvaient une boisson à base de miel pendant le premier mois de leur mariage dont le rituel à l'origine de la lune de miel.

la cire d'abeille était également utilisée pour diverses fins, notamment pour la momification des défunts, la construction de bateaux et la fabrication de peintures et de cosmétiques. Alors qu'en Afrique, elle a été un élément fondamental dans les pharmacopées destinées pour soigner les plaies infectées, des brûlures et des morsures des serpents [33].



Figure 2 : Verset du Quran parlant du miel



Figure 3 : Verset de la bible consacré au miel

Hippocrate prescrivait des régimes privilégiant le miel donné sous forme d'oxymel (vinaigre et miel) contre la douleur, d'hydromel (eau et miel) contre la soif, et d'un mélange de miel, d'eau

et de diverses substances médicamenteuses contre les fièvres aiguës [34], [35]. Il a également utilisé du miel pour la calvitie, la contraception, la cicatrisation, l'action laxative, la toux et les maux de gorge, les maladies oculaires, l'antisepsie topique, la prévention et le traitement des cicatrices [36] .

L'importance thérapeutique du miel est mise en évidence par la richesse de la littérature scientifique à son sujet. En effet, une analyse bibliographique approfondie révèle que plus de deux milliers de publications ont été consacrées à l'étude de cette substance naturelle et de ses propriétés médicinales. Cette abondance de recherches souligne l'intérêt considérable que porte la communauté scientifique aux vertus curatives du miel [37] .

I.1.2. Classification et morphologie

Les abeilles, appartenant à l'ordre des hyménoptères et caractérisées par leur organisation sociale, englobent une diversité impressionnante d'espèces. Parmi celles-ci, certaines sont domestiquées pour la production de miel et de cire, constituant ainsi le cœur de l'apiculture. Ces insectes fascinants représentent un vaste ensemble taxonomique, avec plus de 20 000 espèces identifiées à travers le monde. Cependant, ce nombre pourrait être sous-estimé, car des régions d'Afrique et d'Asie recèlent probablement des espèces encore inconnues, attendant d'être découvertes par les entomologistes [38]. Le genre *Apis* se compose de neuf espèces, classées en quatre groupes distincts, chacun présentant des caractéristiques uniques :

Le groupe dorsata : comprenant *Apis dorsata* et *Apis laboriosa*, se distingue par des abeilles de grande taille. Originaires d'Inde, ces espèces migratrices excellent dans la production de miel et de cire. Elles construisent des nids à rayon unique exposés en plein air. Leur tempérament agressif et leur nature sauvage les rendent inadaptées à la domestication.

Le groupe florea : représenté par *Apis florea* et *Apis andreniformis*, se caractérise par des abeilles de petite taille. Ces espèces asiatiques construisent également des nids à rayon unique en plein air. Leur utilisation en apiculture reste exceptionnelle.

Le groupe cerana : englobe *Apis cerana*, *Apis koschevnikov*, *Apis nigrocincta* et *Apis nuluensis*. Ces abeilles asiatiques, légèrement plus petites que l'abeille commune, se reconnaissent à leurs bandes abdominales proéminentes. Bien qu'elles puissent être domestiquées, leur présence se limite à l'Asie du Sud-Est.

Le groupe mellifera : représenté uniquement par *Apis mellifera*, l'abeille européenne, est le plus répandu mondialement. Cette espèce se distingue par sa grande adaptabilité aux diverses conditions climatiques et aux pratiques apicoles. Ses différents écotypes présentent des variations morphologiques et géographiques, reflétant leur adaptation à des écosystèmes et des flores mellifères spécifiques.

Cette diversité au sein du genre *Apis* illustre la remarquable capacité d'adaptation des abeilles à différents environnements et leur importance dans divers écosystèmes à travers le monde[39] .

I.1.3. Systématique

Les abeilles, appartenant au phylum des arthropodes, sont classifiées dans l'ordre des hyménoptères, dont le nom provient de « hymen » signifiant membrane et « pteron » signifiant aile, tout comme les guêpes et les fourmis. Ces insectes sont des invertébrés dotés d'un exosquelette composé d'une cuticule chitineuse, présentant un corps segmenté et des appendices formés d'articulations [40]. L'abeille domestique marocaine dominante appartenant à la lignée Africaine représentée par *Apis mellifera intermissa* suit la systématique suivante (figure 4) [41] .

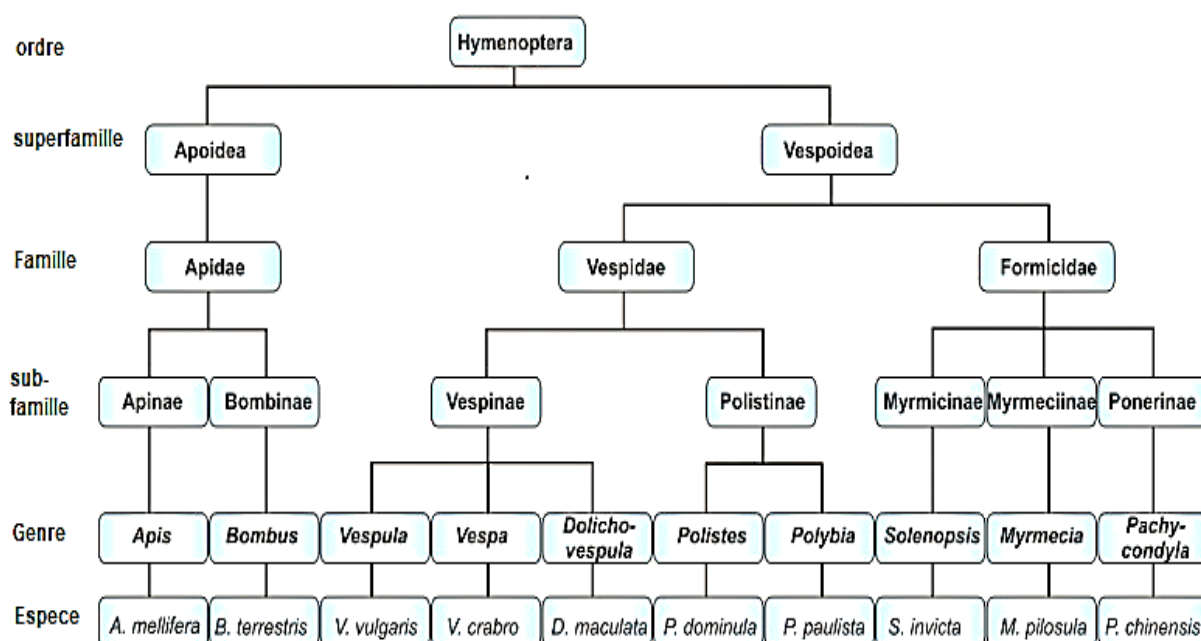


Figure 4 : Classification systématique de l'espèce *Apis mellifera* [41].

I.1.4 Morphologie générale

L'abeille appartient à la classe des hexapodes, caractérisée par la présence de six pattes. Sa morphologie comprend également deux paires d'ailes membraneuses, interconnectées par de minuscules crochets nommés hamuli. L'ensemble de son organisme est protégé par une enveloppe externe rigide, la cuticule, constituée de chitine et parsemée de poils. Cette structure forme un exosquelette qui se divise en trois segments principaux : céphalique, thoracique et abdominal, conformément à l'anatomie typique des insectes.

Au sein de cette armure externe, le système musculaire s'articule directement avec les jonctions entre ces segments ou provoque des déformations de l'exosquelette lui-même. La jonction entre la tête et le thorax est assurée par le cou, une structure composée d'une membrane souple et de muscles ancrés dans le thorax, offrant une grande liberté de mouvement à la partie céphalique. La liaison entre le thorax et l'abdomen est réalisée par une structure particulière appelée pétiole.

Celui-ci se situe entre le premier segment abdominal, qui a fusionné avec le thorax au cours de l'évolution, et le second segment abdominal.

Cette organisation anatomique complexe permet à l'abeille d'accomplir ses diverses fonctions vitales et comportementales avec une remarquable efficacité [42].

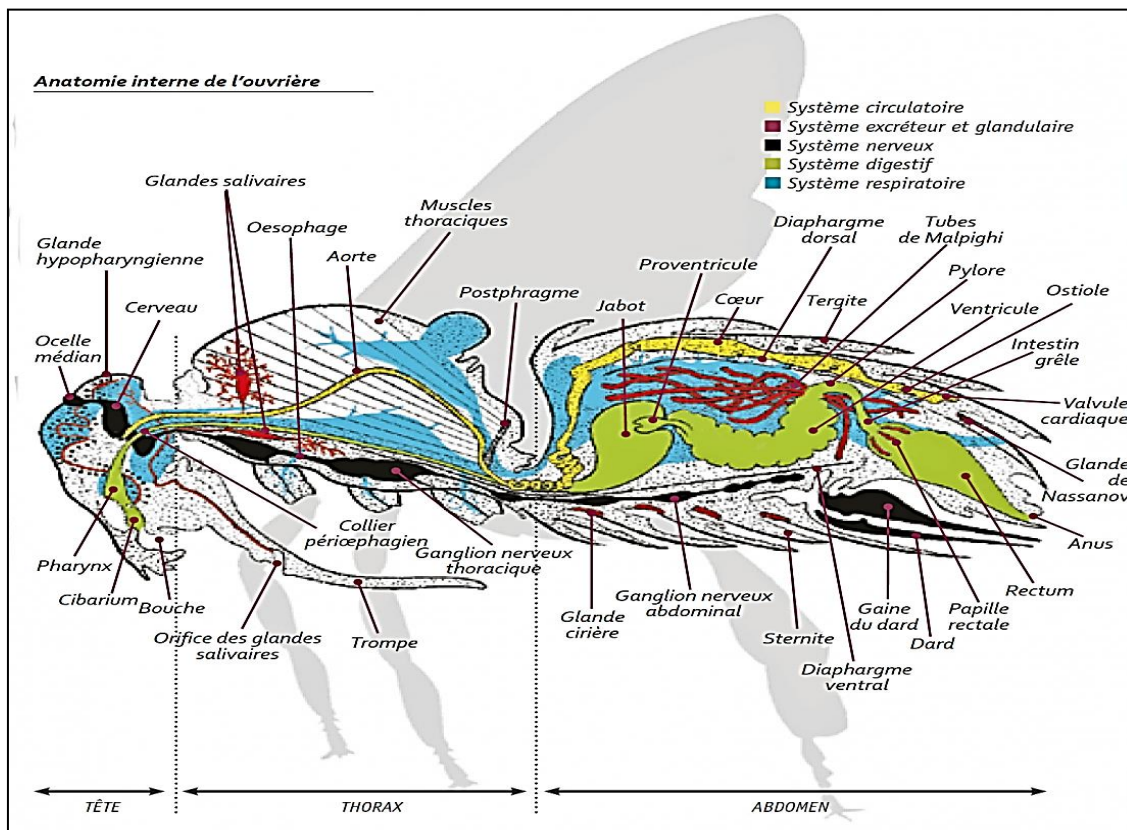


Figure 5 : Morphologie détaillée de l'abeille ouvrière [42]

I.1.5 Cycle de reproduction

Le cycle biologique des abeilles se caractérise par une métamorphose complète, typique des insectes holométaboles [43]. Leur développement se décompose en quatre phases distinctes : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte. Suite à la fécondation aérienne lors du vol nuptial, la reine regagne la colonie pour entamer sa ponte. Elle dépose méthodiquement ses œufs dans les alvéoles, progressant du centre vers l'extérieur du rayon. Ces œufs, de forme ovoïde et d'aspect blanc translucide, adhèrent à la paroi cellulaire par leur extrémité la plus effilée. L'embryogenèse s'opère sur une période de 72 heures, aboutissant à l'éclosion d'une minuscule larve. Celle-ci présente initialement une silhouette arquée qui évoluera au cours de sa croissance.

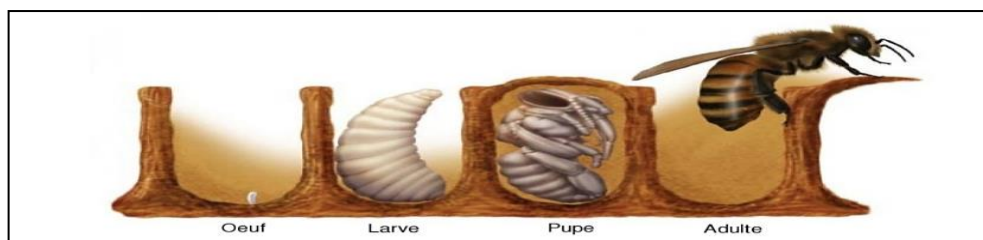


Figure 6 : Cycle de vie de l'abeille [43]

Pendant les trois premiers jours, les larves reçoivent la gelée royale des ouvrières nourrices. Les larves royales continuent à être alimentées avec de la bouillie royale pendant les trois à quatre jours restants de leur stade larvaire, tandis que les autres larves sont nourries avec du miel ou du pollen. Autour du sixième ou septième jour, les larves atteignent leur maturité et cessent de se nourrir.

À l'intérieur de la cellule operculée, la larve construit un cocon très fin en entourant son corps de filaments séreux, subissant plusieurs mues avant de se transformer en nymphe. Ce stade nymphal représente une phase intermédiaire entre le stade larvaire et le stade adulte. La durée de ce processus de développement varie chez l'ouvrière, la reine et le faux bourdon.

I.1.6 Organisation sociale des abeilles.

Les abeilles, en tant qu'insectes eusociaux, forment des communautés hautement structurées où chaque membre assume des responsabilités spécifiques tout au long de son existence au sein de la colonie. La population d'une ruche se compose de plusieurs catégories d'individus : la reine, les ouvrières, les faux-bourdon et le couvain en développement.

L'effectif d'une colonie fluctue considérablement selon les saisons, oscillant entre 20 000 et 80 000 individus. Les ouvrières constituent la majeure partie de cette population, suivies par un contingent de 1 000 à 4 000 mâles. La présence d'une unique reine est la norme, bien que des situations transitoires lors des périodes d'essaimage puissent occasionner la coexistence temporaire de plusieurs reines.

Ces différentes castes se distinguent par des caractéristiques morphologiques spécifiques, adaptées à leurs rôles respectifs au sein de la colonie. Ces individus sont morphologiquement différents (figure 7) [39] .

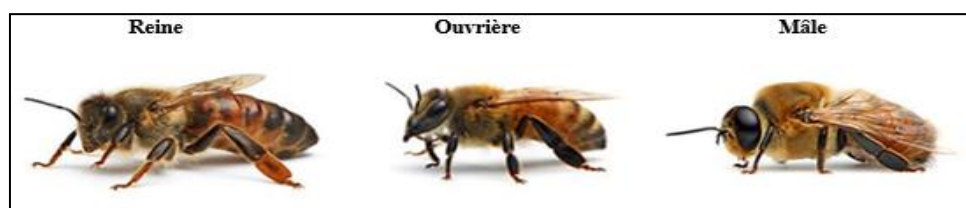


Figure 7 : Les castes de la colonie d'abeille *Apis mellifera* [39]

Au cœur de la colonie, une reine unique assume le rôle primordial de reproduction et de régulation. Sa fonction principale est la ponte des œufs, tandis que ses sécrétions phéromonales,

issues de glandes spécialisées, orchestrent les activités de la communauté. Tandis que le couvain, composé d'œufs, de larves et de nymphes, occupe généralement la partie centrale des rayons et de la ruche. Ce sont les ouvrières qui prennent en charge les soins et l'alimentation de cette progéniture en développement. Par ailleurs les ouvrières accomplissent une variété de tâches essentielles au bon fonctionnement de la colonie et les faux-bourçons, ces individus mâles ont une fonction spécifique : assurer la fécondation des reines lors des vols nuptiaux, contribuant ainsi à la diversité génétique et à la perpétuation de l'espèce.

I.1.7 Répartition géographique

La distribution géographique actuelle des espèces d'abeilles reflète leur histoire évolutive. *Apis florea*, *Apis dorsata* et *Apis cerana* sont largement répandues sur le continent sud-asiatique, tandis qu'*Apis mellifera* était originellement présente en Europe et en Afrique. Cette répartition témoigne de la remarquable capacité d'adaptation des abeilles à des environnements variés. (Figure 8) [44].

En effet, ces espèces ont su coloniser des habitats aux conditions climatiques extrêmement diverses, allant des régions aux hivers longs et rigoureux aux zones tropicales caractérisées par l'absence d'hiver et des températures estivales élevées [45] .

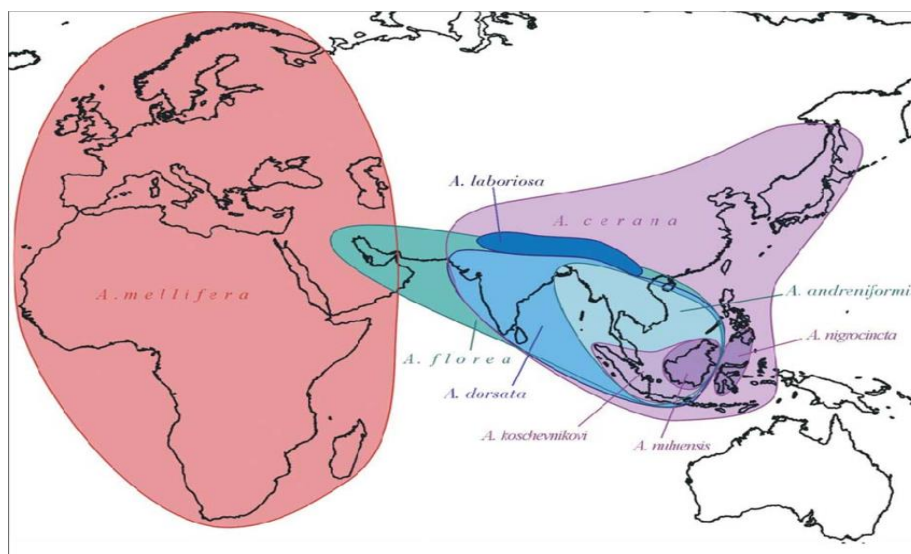


Figure 8: Distribution géographique des espèces du genre *Apis* au monde [52]

✓ Au Maroc

La distribution spatiale de ces races d'abeilles sur le territoire marocain est illustrée dans la Figure 9. Ces trois races constituent collectivement plus des deux tiers de la population apicole du pays. Parmi elles, la race tellienne occupe une position dominante, se distinguant par trois caractéristiques principales : une forte propension à l'essaimage, un comportement naturellement défensif, et un rendement en miel relativement modeste (tableau 1).

En contraste, la race à la robe jaune d'or, principalement observée dans les zones subsahariennes et plus particulièrement dans les écosystèmes oasiens, présente un profil comportemental et adaptatif distinct. Elle se démarque par sa docilité remarquable et son exceptionnelle capacité d'adaptation aux conditions environnementales extrêmes qui caractérisent ces régions arides. Cette race démontre une résilience particulière face aux températures élevées et à l'aridité prononcée de son habitat. [46].

Les recherches ont mis en évidence la présence prédominante de trois races d'abeilles distinctes sur le territoire marocain appartiennent au groupe des abeilles noires : *Apis mellifera intermissa*, communément appelée "telliennne" et *Apis mellifera major*. La troisième race, *Apis mellifera sahariensis*, se distingue par sa couleur jaune d'or caractéristique [47] .

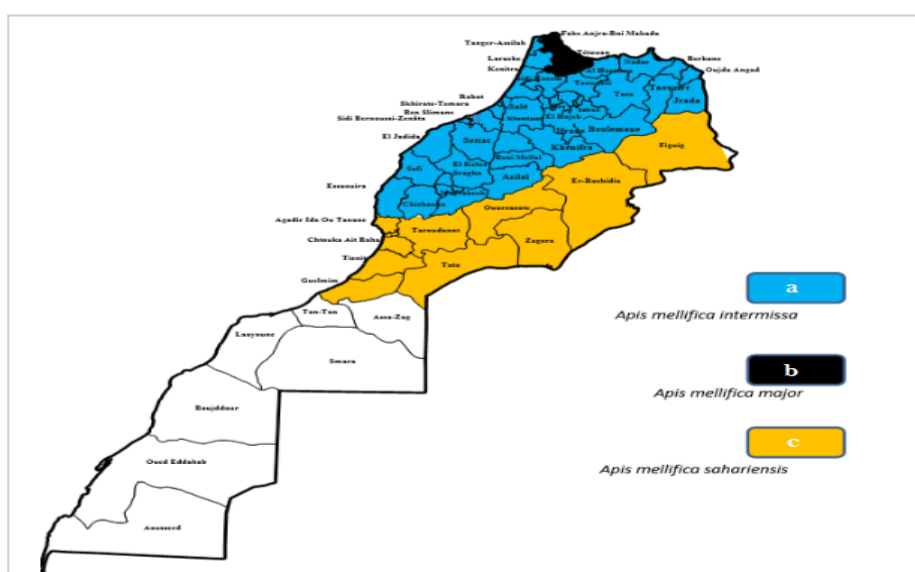


Figure 9: Distribution géographique des espèces du genre *Apis* au Maroc [52]

Tableau 1: Races d'*Apis mellifera* au Maroc [48] .

Race d'Abeille au Maroc	Distribution géographique	Principales caractéristiques anatomiques	Proboscis (mm)	Image	Tempérament
					Agressivité
					Essaimage
<i>Apis mellifera intermissa</i> (Abeille Telliennne)	Nord Afrique (Du Maroc à la Libye) Nord du Maroc	Corps long, pigment foncé poils clairsemés	6,4	 <i>Apis mellifera intermissa</i>	Fort
					Forte
					Reproduction avérée
					Fuite potentiel
<i>Apis mellifera major</i>	Depuis les montagnes du Rif au nord-ouest du Maroc	Corps long, large et sombre avec des marques jaunes	7,0	 <i>Apis mellifera major</i>	Moyen
					--
					--
					Biologie peu connue. Cette abeille peut être une variété en marron de l' <i>Apis mellifera intermissa</i> avec des différences anatomiques
<i>Apis mellifera sahariensis</i>	Dans les oasis du Maroc, près de l'extrémité nord du Sahara	Les abeilles sont de taille moyenne, corps mince et jaune.	6,3	 <i>Apis mellifera sahariensis</i>	Fort
					--
					--
					Bien adapté aux conditions de son environnement

I.2. Les produits de la ruche

Les abeilles sont de véritables ouvrières de la nature, produisant une variété de produits précieux en plus du miel. Chacun de ces produits a des caractéristiques uniques et offre des bienfaits particuliers pour la santé et d'autres applications et dont la composition peut varier en fonction de l'origine botanique, de l'environnement, de la saison et d'autres facteurs [49]. Leur diversité reflète la richesse et la complexité du travail des abeilles et des ressources naturelles qu'elles collectent et transforment avec une précision remarquable.

I.2.1 Miel

I.2.1.1 Définition

Le miel est un produit naturel, sucré et aromatique, fabriqué par les abeilles *Apis mellifera*. Les abeilles récoltent le nectar de plantes, les sécrétions des parties vivantes des plantes, ou les excréments d'insectes butineurs. Elles transforment et déshydratent ces substances, puis les stockent et les laissent mûrir dans les rayons de la ruche. Cette définition est tirée du décret marocain relatif à la qualité et la sécurité du miel, qui s'appuie sur les normes du Codex Alimentarius international. En résumé, le miel est un produit naturel élaboré par les abeilles à partir de matières premières végétales ou animales, qu'elles récoltent, transforment et conservent dans la ruche., cette définition est extraite du Décret n°2-17-463 du 25 Safar 1439 (14 novembre 2017) relatif à la qualité et la sécurité sanitaire du miel et des autres produits de la ruche commercialisés au Maroc [50], celle-ci est prise en référence du Codex Alimentarius international [51].

I.2.1.2 Classification

Selon leur origine botanique, les miels sont classés en catégories distinctes [52] :

✓ Les miels monofloraux.

Les miels monofloraux sont caractérisés par la présence d'une espèce florale dominante dans leur composition. En effet, le miel est un mélange de plusieurs nectars aux origines florales parfois diverses. Pour les identifier, il est nécessaire de faire analyser le miel par un laboratoire. L'origine botanique du miel sera identifiée grâce à l'analyse pollinique qui consiste à regarder la structure des grains de pollen contenus dans le miel afin d'en déterminer son espèce végétale. Ces miels sont communément identifiés par l'espèce majoritaire qu'ils contiennent, par exemple « miel d'acacia » ou « miel de Manuka ».

✓ Les miels polyfloraux.

Les miels polyfloraux résultent du mélange de nectars provenant de différentes fleurs spontanées de plusieurs espèces végétales. Cette variété de miel est la plus représentée au

monde et leur dénomination se réfère alors à l'espace géographique, ou la région dont ils sont issus [48] .

✓ Le miellat

Le miellat est une solution visqueuse issue des déjections des insectes piqueurs-suceurs tels que les pucerons et cochenilles. Les abeilles prélèvent le miellat lorsque le nectar est peu présent. Les pucerons se nourrissent de la sève d'arbre résineux, une fois celle-ci digérée, elle est excrétée et ils déposent des gouttelettes de miellat sur les branches et feuilles de l'arbre. De couleur plus sombre, au goût plus prononcé mais toujours sucré, il est plus riche en minéraux (jusqu'à deux fois plus), en acides aminés et en sucres que le miel de fleur. Il correspond dans le commerce aux appellations « miel de forêt » et « miel de sapin ». Les miellats sont plus riches en antioxydants que les miels et sont indiqués dans les états d'asthénie et d'anémie [53].

I.2.1.3 Types du miel au Maroc

Les miels les plus prisés sur le marché Marocain sont indiqués dans la Figure 10 [48].

Les plus appréciés se distinguent par leurs caractéristiques sensorielles uniques :

- Le miel de thym, de couleur ambrée à orangée, devient plus pâle en cristallisant. Il a un goût subtil de la plante avec une odeur intense.
- Le miel d'euphorbe, de couleur jaune dorée à jaune clair, a un goût fort et prononcé, avec une saveur âcre.
- Le miel d'eucalyptus présente une couleur orange à ocre ambrée. Sa saveur est typique, avec des notes boisées, une certaine âcreté et un arrière-goût légèrement amer. Le miel de lavande est délicatement parfumé, de couleur jaune clair à doré, avec une texture douce et fine.

On trouve également le miel de romarin, d'oranger et de caroubier, chacun avec ses propres caractéristiques organoleptiques.

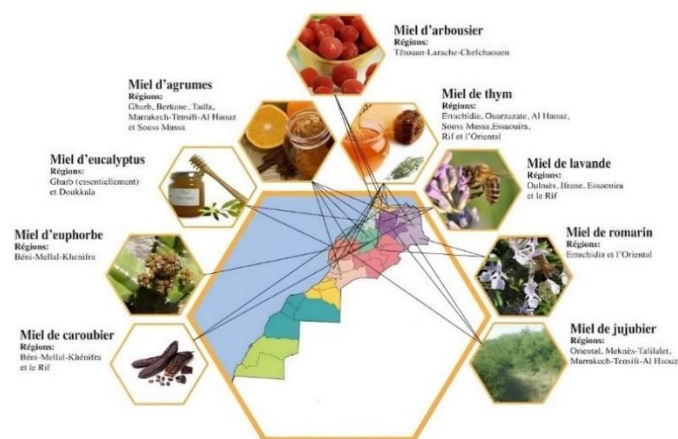


Figure 10 : Type de miel selon les régions du Maroc [46] .

I.2.1.4 Processus de fabrication du miel par l'abeille

Les abeilles butineuses sucent le nectar des fleurs et le miellat et le stockent dans leurs jabots. À leur retour à la ruche, le saccharose du nectar est hydrolysé en glucose et en fructose sous l'action de l'enzyme invertase de l'abeille, ensuite ce nectar est mélangé avec de la salive et des sucs digestifs pour compléter le processus de digestion des sucres et en même temps, pour synthétiser d'autres sucres qui n'étaient pas présents initialement, ensuite le miel est stocké dans des alvéoles où il est déshumidifié par agitation avec les pièces buccales et aération avec ventilation assurée par les ouvrières ventilateurs qui assurent un flux d'air pour que l'eau s'évapore. Cette évaporation est améliorée en dispersant le liquide en une fine couche dans des cellules formées de cire. Enfin Le miel est stocké dans d'autres alvéoles, qui se referment après remplissage (opercule), il est donc stocké comme réserve alimentaire [54].

I.2.1.5 Composition chimique

Le miel présente des compositions qui sont complexes et variées, issues d'un processus aux multiples facteurs et sa composition qualitative et quantitative des constituants varie selon la flore environnante, des conditions climatiques, de la localisation de la ruche, de la race d'abeille et d'autres facteurs [55]. Il est Majoritairement composé de sucres (tri saccharides, maltose, saccharose, glucose et fructose). Il est possible d'établir une composition moyenne des miels dont les principaux composés représentés par la figure 11 comme suit [56], [57], [58] :

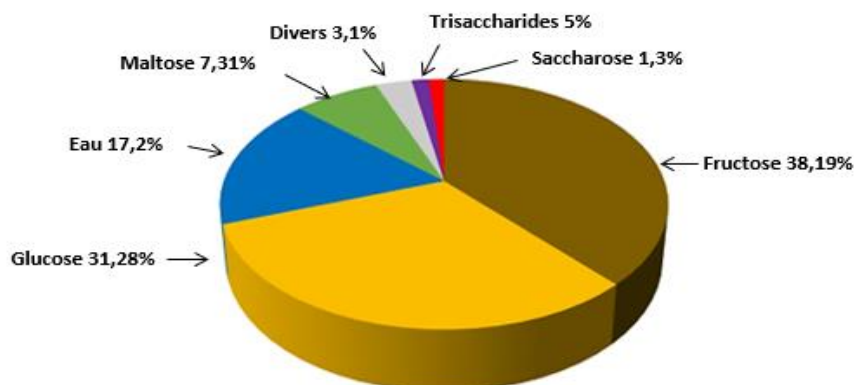


Figure 11 : Principaux composants retrouvés dans des miel multifloraux (moyenne sur 490 miels) [42].

Glucides : Le miel contient principalement du glucose et du fructose, représentant en moyenne 75-80% de sa composition.

Eau : La teneur en eau du miel est un indicateur important de sa qualité. Elle varie généralement entre 15 à 20% selon la réglementation, et un miel de haute qualité aura une teneur en eau inférieure à 18%.

Enzymes : Le miel est un produit vivant qui évolue avec le temps. Il contient environ 0,5% de protéines, principalement sous forme d'enzymes comme l'amylase, l'invertase et la glucose oxydase. Ces enzymes permettent la décomposition des sucres complexes en sucres simples, et produisent également de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène, conférant au miel son pH acide.

Acides : Le miel contient divers acides organiques, dont l'acide gluconique qui en est le principal. On y retrouve aussi l'acide acétique, lactique, succinique, etc. Certains proviennent directement du nectar, d'autres sont issus de réactions enzymatiques et de fermentations.

Vitamines : Bien que présentes en faibles quantités, le miel contient des vitamines du groupe B ainsi que les vitamines A, C, E et K, provenant principalement des résidus de pollen.

Éléments minéraux : La teneur en minéraux du miel est un bon indicateur de son origine géographique et de la qualité de l'environnement de l'abeille.

Aldéhydes : Certains miels, comme le miel de Manuka, contiennent du méthylglyoxal, un composé aldéhydique aux propriétés antibactériennes et anti-biofilm.

Substances aromatiques et composés phénoliques : Le miel contient de nombreux composés aromatiques (esters, aldéhydes, cétones) ainsi que des composés phénoliques aux propriétés antioxydantes. Ces derniers varient en fonction de l'origine florale du miel et peuvent contribuer à son arôme.

I.2.1.6 Normes de qualité du miel : caractérisation physico-chimique

L'évaluation de la qualité du miel est essentielle, à la fois pour les apiculteurs qui doivent produire un miel conforme aux normes légales, et pour les consommateurs qui doivent être bien informés.

Les techniques d'analyse du miel sont en constante évolution dans le but de réduire le temps et le coût des analyses, tout en augmentant la précision. Les exigences de qualité sont définies par la réglementation européenne et marocaine, qui fixent des normes précises.

Voici un aperçu des principales normes de qualité pour le miel telles qu'elles sont définies dans la réglementation européenne et marocaine :

Au niveau européen, la directive 2001/110/CE du Conseil du 20 décembre 2001 établit les exigences de qualité pour le miel commercialisé dans l'Union Européenne. Cette directive spécifie notamment :

Les paramètres physico-chimiques que le miel doit respecter, comme la teneur en eau (max 20%), la teneur en sucres (fructose + glucose min 60%), l'acidité libre (max 50 milliéquivalents/kg), etc.

Les critères d'origine botanique et géographique que le miel doit satisfaire pour porter certaines appellations (miel de fleurs, miel de forêt, etc.)

Les substances interdites dans le miel, comme les antibiotiques, les pesticides, les métaux lourds, etc.

Au Maroc, le Décret n°2-17-463 du 25 Safar 1439 (14 novembre 2017) définit des normes similaires sur la qualité et la sécurité sanitaire du miel commercialisé. Ce décret marocain reprend pour l'essentiel les exigences de la réglementation européenne.

Ces normes de qualité visent à garantir l'authenticité, la pureté et la sécurité du miel pour les consommateurs. Elles encadrent également les pratiques apicoles afin de promouvoir une production de miel de haute qualité.

I.2.2 Propolis

I.2.2.1 Historique

Il y a 60 millions d'années, l'abeille domestique a commencé à produire de la propolis à partir de résine, de cire d'abeille, de pollen et d'autres substances, comme matériau de construction pour son nid et comme défense contre les infections. Son usage par l'homme remonte aux premières civilisations [59]. Dans l'Égypte ancienne, les prêtres se consacraient à l'apiculture à cause du miel et utilisent de la propolis pour les embaumants des momies grâce à sa propriétés antimicrobienne en enduisant avec la propolis les bandelettes des momies, pour leur assurer une meilleure conservation. Tandis que, les anciens Grecs ont découvert que les abeilles utilisent le mélange pour protéger leurs ruches qui aurait été nommé ainsi par le philosophe d'Aristote Alexandre, la propolis signifie « défenseur de la Ville » car elle protège la ruche et ses abeilles des bactéries et des insectes, comme elle protège la ruche contre les flux d'air incontrôlés et l'humidité extérieure [60], [61]. Hippocrate, le père de la médecine, recommandait la propolis pour traiter les plaies et les ulcères à la fois externes et internes [62], Tandis qu'Aristote a détaillé dans son histoire animale comment les abeilles utilisaient la propolis dans leurs ruches et Pline l'Ancien a écrit dans son Histoire naturelle que la propolis guérit les blessures et soulage la douleur [63].

I.2.2.2 Définition

Le mot propolis a une origine grecque, "pro" signifiant devant et "polis" la cité car la propolis sert de barrière protectrice devant l'entrée de la ruche [64], qui se définit comme une « substance résineuse, gommeuse ou balsamique, de consistance visqueuse, recueillie par les abeilles sur certaines parties des végétaux (bourgeons, écorce) » [65]. Ce produit de la ruche est obtenu en mélangeant la résine des bourgeons à de la cire et à des enzymes sécrétées par le système glandulaire de l'abeille. Cette dernière l'utilise directement après sa récolte qui varie en fonction des conditions géobotaniques, des conditions climatiques, des saisons et des besoins de la colonie [66].

I.2.2.3 Intérêt de la propolis pour l'abeille

Les abeilles utilisent la résine pour la construction de nids et comme moyen de lutte contre les ravageurs et les agents pathogènes [67], [68]. Cette dernière est souvent mélangée à la cire, ce qui donne un aspect dur et collant à la propolis [69]. Afin de l'utiliser pour couvrir tout l'intérieur de la ruche. La propolis réduisait la croissance des agents pathogènes des abeilles à savoir *Paenibacillus larvae* et *Ascophaera apis*, un parasite fongique qui cause des dommages dans la colonie [70], [71] et elle renforce le système immunitaire des abeilles individuelles [110,111] .

Il existe plusieurs types de propolis qui varient en fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents dans son entourage, de la disponibilité des végétaux pendant la saison, de l'espèce de l'abeille et aussi bien les conditions climatiques, ce qui explique que l'on retrouve des propolis de couleur jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés vertes ou de rouges ce qui influence fortement leurs compositions chimiques [74].

I.2.2.4 Origines botaniques de la propolis

La propolis est principalement végétale, elle est constituée d'exsudat de bourgeons de feuilles des plantes [75]. Sa couleur dépend des plantes dont elle est originaire qui deviennent plus sombres en vieillissant. Sa composition chimique est complexe, variable et elle est spécifique à la flore locale du site de collecte.

L'hypothèse de l'origine externe de

. Les cinq grands types de propolis sont répertoriés ci-dessous (tableau 2) en fonction de leur composition chimique et localisation géographique [76]

Tableau 2 : Les types de propolis les plus répandus au monde

Propolis	Origine géographique	Origine botanique	Références
Brune	Europe, Amérique du Nord, Afrique du nord, régions non tropicales de l'Asie, Nouvelle-Zélande	 <i>Populus nigra</i>	[77], [78], [79]
Verte	Zone tropicale du Brésil	 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	[80]
Jaune	Géorgie Nord de la Russie, Brésil	 <i>Betula verrucosa</i>	[81], [82], [83]
Propolis rouge	Cuba, Brésil, Mexique, la Grèce	 <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	[83], [84], [85]
Marron noire	Algérie Grèce, Turquie, Maroc	 <i>Cupressus sempervirens</i>	[86], [87], [88]
Pacifique Vert	Zone pacifique (Taïwan, Okinawa, Indonésie)	 <i>Macaranga tanarius</i>	[89]

I.2.2.5 La récolte de la propolis

✓ Par les abeilles

La collecte de la propolis par les abeilles ouvrières se déroule pendant les heures les plus chaudes de la journée par les ouvrières plus âgées, puis de nouveaux composants spécifiques sont ajoutés par les sécrétions hypopharyngiennes, ensuite des transformations ont lieu, notamment l'hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycones [90]. En moyenne une colonie d'abeilles produit 100 g à 300 g par an [91].

✓ Par l'apiculteur

La récolte de la propolis s'effectue de deux manières :

- ✓ Par des grilles moulées en plastique ou en acier inoxydable dont les abeilles bouchent les orifices avec la propolis qui est de meilleure qualité (figure 12).
- ✓ Par raclage et grattage des cadres ou les parois de la ruche. La récolte de propolis a lieu en période froide où la propolis est dure et friable, facilitant son détachement. Mais ce procédé ne permettait pas de récolter une propolis de bonne qualité (figure 13).



Figure 12: Grille de récolte de la propolis [92]



Figure 13: Récolte de la propolis par grattage [92]

I.2.2.6 Caractéristiques physico-chimiques de la propolis

La caractérisation physico-chimique de la propolis est très importante pour l'obtention d'un produit de qualité standardisé, tel que le réclame le marché. Ce produit de la ruche est récolté sur une grande variété d'arbres et d'arbustes. Chaque région et chaque colonie, semble avoir ses propres sources de résine préférées. La propolis est souvent décrite comme un produit hétérogène, c'est-à-dire qu'elle présente une grande variété de caractéristiques physiques. Sa couleur peut varier du brun clair au brun foncé et au noir, en fonction de l'origine botanique de la résine collectée par les abeilles et de la méthode de récolte utilisée. Certaines propolis peuvent également avoir des teintes rouges ou vertes. Sa saveur est souvent amère et son odeur est âcre et résineuse. Sa consistance varie également en fonction de la température : elle est dure et friable à 15°C, mais devient coulante et gluante à 30°C et 60°C. Sur le plan de la solubilité, la

propolis est partiellement soluble dans les solvants organiques, permettant de dissoudre la quasi-totalité de ses composants. Enfin, la densité moyenne de la propolis est d'environ 1,2 g/cm³.

En résumé, la propolis se caractérise par une grande diversité de propriétés physiques, liées notamment à sa composition chimique complexe et variable selon son origine [93].

I.2.2.7 Composition chimique

I.2.2.7.1 La propolis brute

La composition spécifique de la propolis est principalement déterminée par son origine botanique. En effet, les abeilles collectent différentes résines et baumes végétaux qui constituent la base de la propolis. De plus, les sécrétions hypopharyngiennes des abeilles apportent d'autres éléments spécifiques et réalisent certaines transformations, comme l'hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycones. De manière générale, la propolis est composée de (Figure 14). :

- 50 à 55% de résines et baumes
- 30% de cires et acides gras
- 7% d'huiles essentielles
- 3% de pollen
- 5% de substances organiques et minérales

Ainsi, la composition complexe de la propolis résulte à la fois de son origine végétale et des modifications apportées par les abeilles lors de la récolte et de la transformation de cette matière première.[94] .

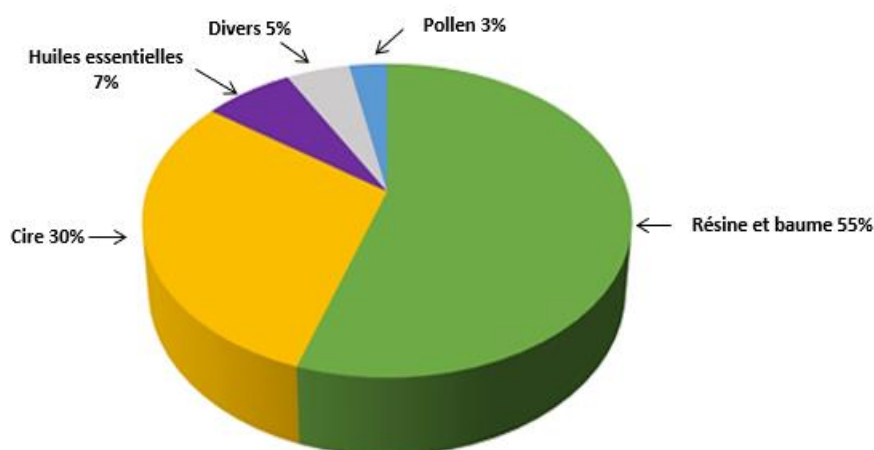


Figure 14 : Composition chimique de la propolis brute [66].

I.2.2.7.2 La propolis purifiée

Grâce au développement de techniques de séparation et de purification telles que la chromatographie liquide de haute performance (HPLC), ainsi que des techniques d'identification telles que la spectroscopie de masse (SM) et la Chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) [95], [96], [97], [98], plusieurs composés bioactifs ont été identifiés dans la propolis; y compris les flavonoïdes, les terpènes, les acides phénoliques et leurs esters, les hydrocarbures et les éléments minéraux [99].

✓ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les principaux composés de la propolis responsables de ses effets pharmacologiques. On retrouve notamment différentes sous-classes de flavonoïdes dans la propolis :

- Les flavones, comme la lutéoline
- Flavonols, tels que la quercétine et ses dérivés
- Les flavanones, comme la pinocembrine et la naringénine
- Les flavanonols
- Les chalcones et dihydrochalcones
- Les isoflavones
- Les isoflavanes
- les néoflavonoïdes

Cette diversité de flavonoïdes contribue aux propriétés biologiques et thérapeutiques variées de la propolis. Leur présence en fait un ingrédient clé pour les applications médicales et nutraceutiques de ce produit naturel [100]. (Plus de détails au chapitre III).

✓ Terpénoïdes

Bien que les volatiles ne représentent que 10 % des constituants de la propolis, ils sont responsables de l'odeur résineuse caractéristique et contribuent aux effets pharmacologiques de la propolis [101]. Les monoterpènes isolés comprennent les monoterpènes acycliques, monocycliques et dicycliques et leurs dérivés en plus des sesquiterpènes [102].

✓ Les polyphénols

L'acide cinnamique, l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et leurs dérivés qui s'avèrent être une caractéristique chimique marquante de la propolis [103]. (Plus de détails au chapitre III)

✓ Les glucides :

La propolis contient généralement une faible quantité de glucides provenant principalement du miel et du pollen qui sont considérés comme les sources majeures de glucose, fructose et

saccharose. D'autres auteurs suggèrent que les sucres de la propolis proviennent des flavonoïdes glycosylés dans la propolis [104].

✓ **Éléments minéraux**

La propolis contient une quinzaine de minéraux principalement issus du pollen qui la compose, chacun en petite quantité. On peut citer notamment le sodium, le magnésium, le cuivre, le calcium, le zinc, le fer, le potassium mais aussi l'aluminium, l'argent, le baryum, le cadmium, le chrome, le cobalt, l'étain, le manganèse, le molybdène, le nickel, le plomb, le silicium, le strontium, le titane et le vanadium [105].

✓ **Les protides :**

Bien que les protides soient peu nombreux dans la propolis, ils proviennent principalement du pollen collecté par les abeilles. On y trouve une vingtaine d'acides aminés, dont :

- 8 acides aminés essentiels : isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine
- 2 acides aminés semi-essentiels : arginine et histidine

D'autres acides aminés sont également présents, tels que l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la cystéine, la glycine, la proline, la sérine et la tyrosine.

Bien que les protides ne soient pas les composants majoritaires de la propolis, cette présence d'acides aminés variés, y compris essentiels, contribue à la richesse nutritionnelle de ce produit naturel complexe.

✓ **Les lipides :**

Les lipides proviennent principalement de la cire ou des essences terpéniques. Elles sont représentées par des acides gras tels que l'acide arachidonique, l'acide laurique, l'acide linoléique, l'acide linolénique [106].

✓ **Les enzymes :**

Les enzymes présentes proviennent essentiellement des sécrétions salivaires des ouvrières, telles que la glucose-6-phosphatase, la phosphatase acide et la succinate déshydrogénase.

I.2.2.8 Normes de qualité

La réglementation et les normes d'évaluation de la qualité de la propolis varient considérablement selon les pays. Dans certaines régions européennes comme l'Allemagne et la Suisse, la propolis est classée et réglementée en tant que médicament. Tandis que dans de nombreux autres pays, comme l'Autriche, la France, l'Espagne, les États-Unis, le Japon ou le Brésil, elle est plutôt considérée comme un complément alimentaire.

Cette hétérogénéité s'explique par la diversité chimique de la propolis, qui dépend fortement de son origine géographique et botanique. En effet, la composition de la propolis peut varier grandement selon les plantes et les espèces végétales présentes dans les différentes régions du monde.

Par conséquent, une standardisation universelle de la propolis s'avère difficile à mettre en place. Cependant, certains auteurs proposent une approche de normalisation par type de propolis, en se focalisant notamment sur la propolis de type peuplier (type européen), dont les principales caractéristiques sensorielles, physiques et chimiques sont les suivantes :

✓ Propriétés physico-chimiques

✓ Densité : 1,11-1,14.

✓ Point de fusion : 80-105 °C

✓ Solubilité : légèrement soluble dans l'eau ; les composants de faible poids moléculaire sont solubles dans l'éthanol, les cires sont insolubles.

Des normes ont été proposées pour la propolis du peuplier et verte du Brésil est comme suit :

Tableau 3 : Normes de qualité de la propolis d'Europe , d'Afrique et du Brésil [90], [107], [108]

Contenu	Propolis issue d l'Europe et d'Afrique (mg /100g)	Propolis Brésil (mg /100g)
Baume	45	35
Taux des polyphénols totaux	21	7
Taux de flavonols et flavones	5	-
Flavanones dihydroflavanols	4	-
Flavonoïdes Totaux	9	1
Cire	< 25	< 25
Matière insoluble	< 5	< 5
Minéraux	Non spécifié	< 5

I.3 Pollen d'abeilles

I.3.1 Définition

Le pollen est la principale source alimentaire des abeilles, récoltés par les ouvrières sur les étamines des fleurs et qui sera mélangé avec de la salive et le transportent jusqu'à la ruche sous forme de petites pelotes. En effet la colonie en consomme entre 35 et 40 kg par an afin d'assurer le bon développement du couvain. Ce sont des grains microscopiques sphériques à ovoïdes, qui correspondent aux cellules reproductrices mâles de la fleur. En effet, chaque étamine d'une

fleur produit plusieurs milliers de grains de pollen afin d'assurer une bonne reproduction. La morphologie des grains de pollen est liée à l'espèce végétale et leur taille varie de 5 à 250 μm . Certains sont lisses et d'autres visqueux, et leur couleur va du jaune plus ou moins foncé jusqu'à une teinte noire dans de rares cas. Ces grains sont portés dans les sacs polliniques des anthères, qui sont les parties mâles des organes reproducteurs des fleurs, et sont transportés par le vent ou jusqu'aux parties femelles des fleurs, comme le pistil, où ils peuvent féconder les ovules et permettre la reproduction des plantes [109] .

I.3.4.1 Récolte par l'abeille

Les grains de pollen, qui sont les organes de reproduction mâles des plantes sont récoltés par les ouvrières butineuses. Avec leurs pattes, elles brossent et rassemblent les grains, y ajoutent un peu de nectar pour former des pelotes et les ramènent à la ruche sur leur troisième paire de pattes (figure 15). C'est ainsi que les abeilles produisent le pain au pollen, également appelé pain d'abeille (figure 16) .



Figure 15: Grains de pollen sur pattes d'abeille



Figure 16: Alvéoles remplies de pollen

I.3.4.2 Récolte par l'apiculteur

Le pollen est collecté par les apiculteurs pendant la "saison de croissance". C'est-à-dire le moment où les plantes sont riches en pollen. La récolte se fait au détriment du développement de la colonie, il faut donc tenir compte des besoins de la ruche. Les apiculteurs ingèrent généralement 10 % du pollen. Cela stimule les colonies. Cependant, il veille à ne pas trop en priver les abeilles car il est indispensable pour se nourrir et nourrir les larves. Pour cela, la récolte doit se faire à l'aide de grilles à pollen et espacée de plusieurs jours entre colonies productives alternées.

I.3.4.3 Sources de pollen : les plantes mellifères

Les abeilles dépendent exclusivement du règne végétal pour leur alimentation. Les trois composants essentiels de leur régime alimentaire sont le nectar, le miellat et le pollen.

Le nectar, produit par les fleurs, et le miellat, déjection sucrée d'origine animale (pucerons, cochenilles, etc.), constituent les sources principales de nourriture pour la colonie d'abeilles. En

contrepartie, les abeilles assurent la pollinisation des plantes à fleurs, permettant ainsi la fécondation des ovules et la formation des graines et des fruits.

Les plantes mellifères sont celles qui produisent du nectar, que les abeilles utilisent pour fabriquer le miel. De manière plus générale, on considère comme mellifères toutes les plantes à fleurs qui présentent un intérêt pour les abeilles, qu'elles leur fournissent du nectar, du pollen, de la propolis ou du miellat.

Ainsi, les abeilles et le monde végétal entretiennent une relation de dépendance mutuelle, les plantes bénéficiant de la pollinisation assurée par les abeilles, tandis que ces dernières tirent leur alimentation essentielle des ressources végétales [110] .

I.3.4.4 Composition chimique

Le pollen est constitué d'un mélange complexe de molécules organiques et inorganiques, telles que des protéines, des lipides, des glucides, des vitamines, des minéraux, des pigments et des antioxydants. Sa composition peut varier considérablement en fonction de l'espèce de plante, de la région géographique, des conditions météorologiques et des pratiques agricoles [111] .

Il contient des minéraux tels que le calcium, le potassium, le magnésium, le fer et le zinc, des pigments tels que la chlorophylle, la xanthophylle et le caroténoïde, ainsi que des antioxydants tels que les flavonoïdes et les phénols [112], [113] . Les différents pollens d'abeille ont une composition globalement similaire en éléments nutritifs dont la composition générale est représentée dans la figure 17 :

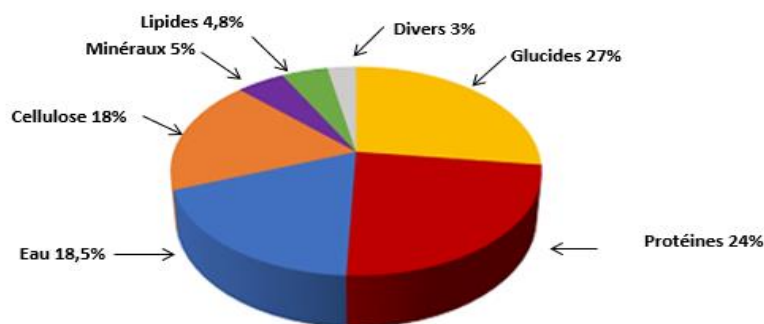


Figure 17 : Composition chimique générale du pollen d'abeille .

✓ **L'Eau** : pour le pollen frais, sa teneur varie entre 10 à 40% et de l'ordre de 4% pour le pollen séché. Un taux de 5% représente en général la limite supérieure à ne pas dépasser pour assurer une bonne conservation à température ordinaire [114] .

✓ **Protéines** : elles sont surtout importantes pour la croissance des larves et le développement des jeunes abeilles, leur teneur est la caractéristique la plus cruciale et est principalement utilisée pour classer la qualité du pollen d'abeille comme suit [114]:

- ≥ 25 % : très riche en protéines
- ≥ 20 % : riche en protéines
- 15 % - < 20 % : teneur moyenne en protéines
- < 15 % = pauvre en protéines

Elles varient très fortement selon l'origine florale, des conditions climatiques, des caractéristiques du sol où poussent les plantes et de la saison à savoir la teneur peut varier entre 10 et 40 % avec une moyenne de 21, 30 % ce qui constituent près d'un quart de la masse du pollen, fournissent une quantité significative d'acides aminés

✓ Acides aminés

Le pollen d'abeille contient des acides aminés "essentiels" [115] avec une teneur qui semble être très similaire dans différentes espèces végétales avec des taux qui varient entre 1 et 4,5%, leur concentration jugent la qualité du pollen d'abeille [116].

✓ Sucres

Le pollen d'abeille contient 15 à 50% des hydrocarbures, le fructose, le glucose et le saccharose sont les plus abondants et forment environ 90% de la totalité des sucres [117]. Ces teneurs peuvent être affectées par l'origine botanique et géographique, les méthodes de récolte et les processus de conditionnement tels que la température élevée lors du séchage du pollen d'abeille frais [118].

✓ Les lipides

Le pollen d'abeille contient entre 1 et 20% de lipides en poids sec. Ces lipides se trouvent dans le manteau pollinique et le cytoplasme des cellules végétatives. Les lipides, qu'ils soient d'origine végétale ou animale, sont des triglycérides composés de glycérol estérifié avec des acides gras acycliques à longue chaîne linéaire. Ces acides gras jouent un rôle important pour la reproduction, le développement et la nutrition des abeilles. Les acides gras les plus abondants dans le pollen sont, par ordre décroissant, l'acide α -linoléique, l'acide palmitique, l'acide linoléique, l'acide myristique et l'acide dodécanoïque.

✓ Les minéraux

La teneur totale en minéraux du pollen d'abeille est généralement comprise entre 2 et 4% représenté par le potassium (environ 60% de la totalité des minéraux), suivi par le magnésium (environ 20%), le sodium et le calcium (environ 10%) Cette teneur est fortement influencée par plusieurs facteurs, principalement le sol, le climat, l'origine géographique et l'espèce botanique [119]. Le profil minéral peut être utilisé comme biomarqueur de l'origine botanique et géographique pour lutter contre la fraude dans l'industrie apicole [120]. En outre, la surveillance de la présence des éléments minéraux mineurs comme les métaux lourds (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn,

Ni, Pb et Zn) est importante pour évaluer la pollution de l'environnement ainsi que la qualité et la sécurité de ce produit [121].

✓ Les vitamines

Le pollen est riche en vitamines hydrosolubles et pauvre en vitamines liposolubles. Il contient différentes vitamines telles que la vitamine B1, B2, B3, C, H, acide folique et tocophérol [122].

✓ Autres composants

Le pollen d'abeille contient une grande variété de métabolites primaires tels que les acides aminés, les sucres, les lipides, les vitamines et les minéraux et secondaires, qui peuvent présenter un large éventail de propriétés biologique [123] et une quantité importante de métabolites secondaires qui sont des composés organiques non-essentiels pour la croissance et la survie des abeilles, mais ayant des fonctions biologiques importantes, telles que la défense contre les prédateurs et les pathogènes, ainsi que l'attraction des pollinisateurs [124]. Leurs variétés seront détaillées au chapitre III.

I.1 Normes de qualité

Certains pays comme le Brésil, la Bulgarie, la Pologne et la Suisse ont des normes nationales [125] telles que :

✓ Examen microscopique

Le pollen ne doit pas contenir d'impuretés telles que des parties d'abeilles, de la cire, des particules végétales ou d'autres matières étrangères.

L'analyse du pollen peut être utilisée pour déterminer l'origine botanique. La même méthodologie que celle utilisée pour l'analyse du pollen du miel peut être utilisée pour explorer l'origine botanique.

✓ Examen microbiologique

Est le principal critère de qualité du pollen d'abeille permettant de contrôler sa qualité microbiologique, en particulier l'absence de germes pathogènes et de champignons. La destruction des bactéries par l'irradiation, les traitements à l'ozone n'est pas nécessaire et conduit à des résidus toxiques.

Pour une utilisation spécifique, il convient d'évaluer la composition des composants biologiques actifs, par exemple les flavonoïdes ou la teneur en vitamines.

✓ Caractérisation chimique

L'humidité est un paramètre clé pour évaluer la conservation du pollen. Une teneur en humidité maximale de 8% est recommandée pour les pollens séchés, et de 25% pour les pollens frais ou

congelés Une teneur en cendres trop élevée indique la présence d'impuretés minérales, due à un mauvais nettoyage du pollen récolté. Un taux de cendres maximal de 6% est préconisé.

La teneur en lipides du pollen est également un paramètre important. Elle est très variable selon l'origine botanique, généralement entre 5 et 10% pour un pollen sec. Un minimum de 1,5% de lipides est recommandé.

Ces différents critères de qualité permettent d'évaluer l'aptitude du pollen à la conservation à long terme [126], [127].

Les caractéristiques physicochimiques du pollen d'abeille de qualité est rapporté comme suit :

Tableau 4 : Les caractéristiques physicochimiques du pollen d'abeille de qualité

Contenu	g /100g
Humidité	8
Teneurs en sucres	> 40
Protéines	>15
Lipides	> 1,5
Fibres	< 5
Flavonoïdes	< 25
Vitamines	0,02 – 0,1
Minéraux	0,5 – 3

CHAPITRE II : LES PRODUITS DE LA RUCHE EN APITHERAPIE, INTERETS THERAPEUTIQUES ET MECANISMES D'EFFETS PHARMACOLOGIQUES

Les abeilles pollinisent 80% des plantes à fleurs du monde, contribuant ainsi à la survie de nombreuses espèces végétales et jouent un rôle crucial en étant responsables d'un tiers de la production alimentaire mondiale [128]. Selon la FAO, les abeilles permettent d'améliorer nos régimes alimentaires en nous fournissant des aliments riches en micronutriments. Tels que le miel, ainsi que des aliments fonctionnels et des superaliments comme la gelée royale, la propolis, le pollen d'abeille, le pain d'abeille, ainsi que d'autres substances telles que la cire d'abeille et le venin d'abeille. Ces produits apicoles présentent une variété de propriétés nutraceutiques et trouvent des applications médicales importantes.

La classification générale de ces produits apicoles peut être établie en fonction de la manière dont ils sont collectés : certains sont récoltés en externe, tandis que d'autres sont générés en interne puis sécrétés [129]., comme le montre la figure 18 :

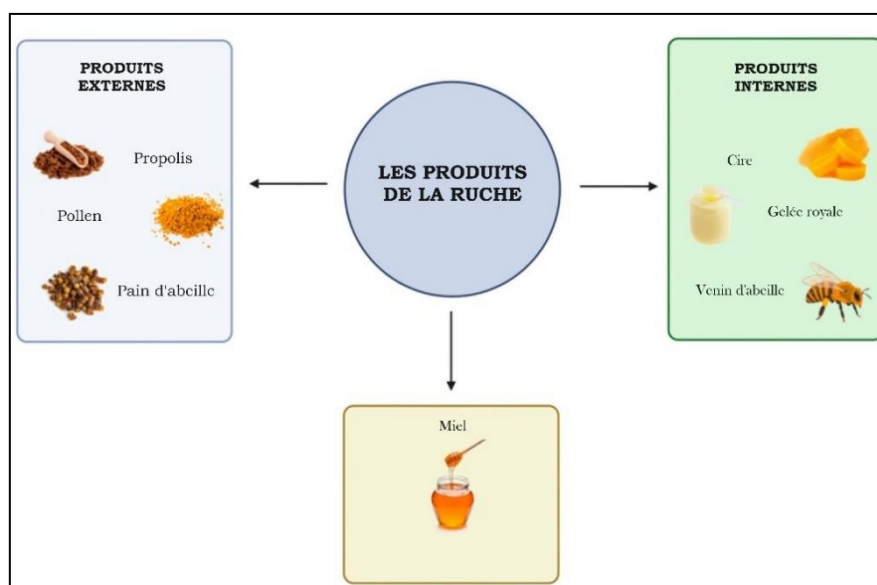


Figure 18 : classification des produits de la ruche [129].

L'élevage de colonies d'abeilles est « L'apiculture », cette branche de l'agriculture, qui est pratiquée sur tous les continents, cette activité diffère selon les variétés d'abeilles, le climat et le niveau de développement économiques est où les apiculteurs élèvent des abeilles dans des ruches artificielles pour récolter les produits de la ruche. On va se focaliser sur les produits de la ruche objet de notre étude qui sont le miel, la propolis et le pollen d'abeille.

II.1 Apithérapie :

II.1.1 Définition

L'apithérapie est un type de médecine complémentaire dans laquelle des produits dérivés des abeilles tels que le miel, le pollen, la propolis, la gelée royale et le venin d'abeille sont utilisés pour traiter les maladies, leurs symptômes et la douleur causée par des blessures aiguës et chroniques. Il existe différentes extensions de l'apithérapie en fonction du produit apicole particulier utilisé et de l'état clinique en question. Elle n'est pas encore définie dans la langue française, mais certains scientifiques ont établi leur propre définition :

a. Docteur Yves DONADIEU [130] :

"L'apithérapie est le traitement des maladies par les produits récoltés, transformés ou sécrétés par l'abeille, et tout particulièrement pour l'heure : le pollen, la propolis, le miel, la gelée royale et le venin. »

b. Le Docteur Albert BECKER (médecin et apiculteur) [131].

En 2007, il a posé la définition plus conforme aux réalités scientifiques du XXI^e siècle :

« L'apithérapie est le traitement préventif ou curatif des maladies humaines ou vétérinaires par les produits biologiques issus ou extraits du corps même de l'abeille, sécrétés par elle ou récoltés et transformés par elle. »

L'utilisation du terme « apithérapie » varie d'un continent à l'autre. Ainsi en Europe, l'apithérapie peut faire référence à la cicatrisation par le miel. Aux Etats-Unis « apitherapy » signifie thérapie par le venin, alors qu'au Japon, cela concerne les traitements à base de propolis. L'apithérapie peut être définie comme suit : une pratique médicale alternative qui utilise les produits de la ruche, à des fins thérapeutiques. Cette pratique est basée sur l'idée que ces produits naturels ont des propriétés médicinales et peuvent aider à traiter diverses affections.

L'apithérapie est utilisée pour traiter un large éventail de maladies et leurs symptômes ainsi que les douleurs liées aux blessures aiguës et chroniques., notamment les allergies, l'asthme, les troubles digestifs, les infections respiratoires, les douleurs articulaires et musculaires, et même le cancer. Cependant, il est important de noter que cette pratique n'est pas reconnue par la médecine conventionnelle et que les preuves scientifiques sur son efficacité sont limitées.

En outre, il existe des risques associés à l'utilisation de produits de la ruche, tels que les réactions allergiques et les effets secondaires indésirables [132] .

II.1.2 Intérêts thérapeutiques et mécanismes d'effets pharmacologiques

I.4.2.2 Effet antioxydant et pathologies associées

Les produits de la ruche représentent une source potentielle d'antioxydants naturels, notamment d'acides phénoliques, des flavonoïdes et des terpénoïdes, ainsi que de nombreux autres produits phytochimiques, capables de lutter contre les effets du stress oxydatif à l'origine de la pathogenèse de nombreuses maladies [133]. L'action principale des antioxydants repose sur leur capacité à inhiber les processus d'oxydation réduisant ainsi la production de radicaux libres qui déclenchent une réaction en chaîne susceptible de provoquer des effets nocifs pour la santé induisant diverses maladies dégénératives, telles que l'athérosclérose, le cancer, les troubles neurologiques, le diabète et les maladies cardiovasculaires [134].

II.4.2.2 Le stress oxydatif

La capacité antioxydante des polyphénols est la propriété la mieux décrite par les chercheurs ; Les flavonoïdes semblent être les plus puissants pour protéger les cellules contre les agressions permanentes des espèces réactives oxygénées (ERO) produites lors du métabolisme normal de l'organisme ou induites par des dommages exogènes [135], [136], [137]. Ces ERO modifient le potentiel de la membranaire et la pression osmotique de la cellule, entraînant éventuellement la mort cellulaire[138]. Cependant le système de défense humain utilise différents mécanismes et enzymes pour les combattre, mais l'augmentation de leur production entraîne la consommation et l'épuisement de l'arsenal antioxydant endogène [139].

II.4.2.3 Historique

La théorie de la toxicité des radicaux libres est née avec les travaux de Gershan en 1954, qui a démontré que le taux de la survie des souris hébergées dans un environnement saturé en oxygène diminuait lorsqu'elles étaient exposées aux rayons X, et il a suggéré que cela était en partie dû à la toxicité de l'oxygène [140]. Deux ans plus tard, l'intérêt a commencé à croître pour savoir les mécanismes de la production et d'action des radicaux libres dans les systèmes biologiques. En 1956, Dunham Harman suggère que le vieillissement et les maladies dégénératives principalement sont dues aux effets délétères des radicaux libres sur l'ADN, protéines, lipides [141].

II.4.2.4 Définition

Le stress oxydatif a été défini comme un processus biologique de déséquilibre cellulaire entre les pro-oxydants et les antioxydants, ce dernier est dû à une surproduction d'espèce pro-oxydantes ou un déficit en antioxydants ou les deux à la fois [142], causé par différents facteurs environnementaux exogènes tel que le tabac, l'irradiation par rayons X, UV, polluants et

xénobiotiques ainsi que des facteurs endogènes tels que le déficit immunitaire ,infections ou autres [143], [144], [145], ce qui conduit à l'accumulation dans l'organisme des produits intermédiaires, des molécules instables et réactives qui sont considérés comme nuisibles qui endommagent les cellules en oxydant les lipides, les protéines et l'ADN [146], [147] . En outre une biodisponibilité accrue des ERO, aboutissant à une perturbation de la signalisation d'oxydo-réduction et du contrôle et / ou des dommages moléculaires [148].

Il semble donc évident que la quantité de radicaux libres doit être contrôlée (physiologiquement ou à l'aide de médicaments) afin de ne pas avoir de déséquilibre entre ERO et antioxydants, au risque d'être face à une situation de stress oxydatif (figure 19).

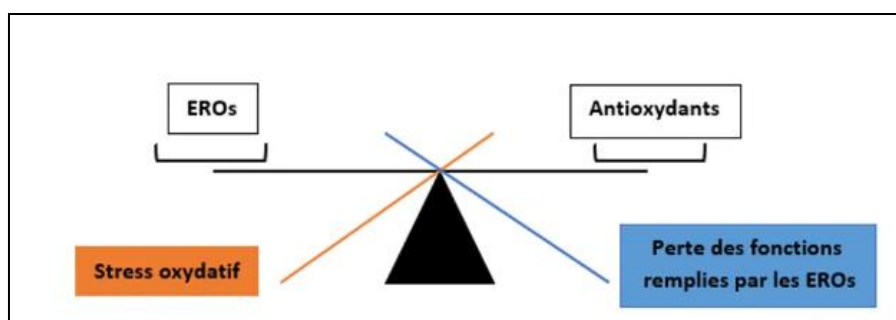


Figure 19 : Schéma représentatif de la balance Antioxydants / ERO

II.4.2.5 Origines des radicaux libres

Les ERO sont des espèces moléculaires fabriquées naturellement par le corps en tant que sous-produit du métabolisme normal ou après une exposition aux toxines présentes dans l'environnement , ils ont une durée de vie d'une fraction de seconde seulement, mais pendant ce temps, ils peuvent endommager l'ADN , provoquant parfois des mutations qui peuvent engendrer des pathologies variables.

II.4.2.5.1 Origines intracellulaires

Dans les organismes vivants, les ERO sont générées dans plusieurs systèmes cellulaires localisés dans la membrane plasmique, le cytosol, les peroxysomes, la membrane des mitochondries et du réticulum endoplasmique [149]. Dans les cellules des mammifères, la production des ERO est essentiellement d'origine mitochondriale [150] et elles sont produites par une variété d'enzymes telles que les NADPH oxydases, la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique synthase et les constituants peroxysomaux [151] . Elles sont également produites par les rayonnements ionisants et UV [152].

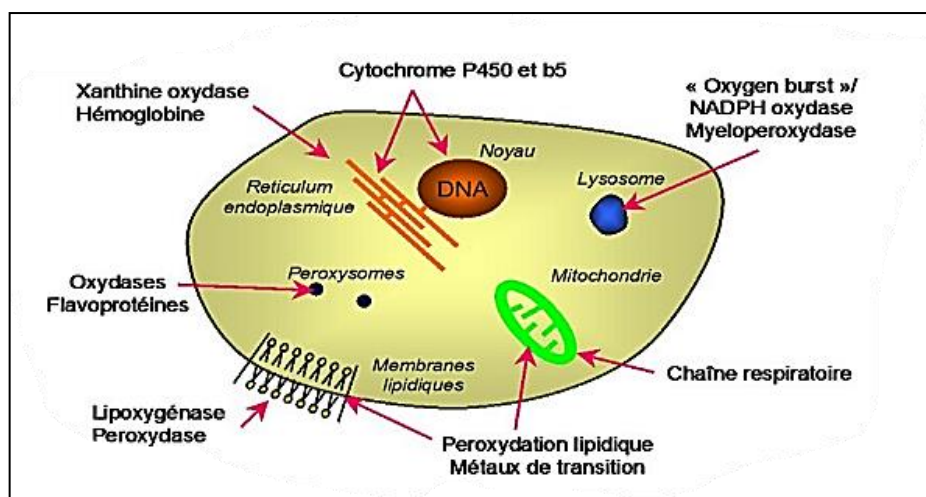


Figure 20 : Origines intracellulaires des ERO

IL existe de nombreuses sources des ROS parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase

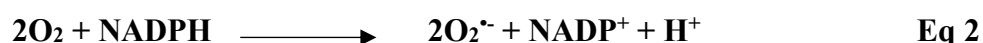
✓ La xanthine oxydase

la xanthine oxydase joue un rôle clé dans le catabolisme des purines, en catalysant les étapes finales de la dégradation de ces composés pour produire de l'acide urique comme produit final. Cette réaction génère également des espèces réactives de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde, qui peuvent avoir des implications au niveau cellulaire et physiologique



✓ Les NADPH oxydases

C'est un complexe enzymatique lié à la membrane qui fait face à l'espace extracellulaire qui est retrouvé dans la membrane plasmique ainsi que dans les membranes des phagosomes utilisés par les globules blancs neutrophiles pour englober les micro-organismes. Il génère l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en utilisant NADH ou NADPH comme substrat selon la réaction suivante :



✓ Mitochondrie

La mitochondrie est un organe issu de la voie endosymbiotique, et elle est considérée la principale source des ERO dans la cellule, en effet, 90% des ERO cellulaires sont produites, principalement à travers le processus de phosphorylation oxydative qui se déroule dans la chaîne respiratoire. Cette dernière est la résultante de l'association d'une cinquantaine de polypeptides et permet la production d'énergie sous forme d'ATP en utilisant le dioxygène. Elle est composée de cinq complexes protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries lors de la production d'ATP, des électrons peuvent s'échapper de la chaîne respiratoire et

interagir avec l'oxygène pour former des radicaux libres tels que le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [153].

II.4.2.5.2 Origines extracellulaires

Les ERO peuvent être générés par l'exposition à des facteurs externes tels que les rayonnements ionisants et UV, les polluants qui induisent des dommages mitochondriaux, une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes, une activation du NF- κ B et d'enzymes pro-oxydantes et une concentration accrue de métaux rédox-actifs tels que le fer (Fe^{2+}) [154].

II.4.2.6 Les principales espèces réactives de l'oxygène

Les principales molécules instables générées par le stress oxydatif sont :

✓ L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) :

Lors du métabolisme cellulaire, la chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne (complexes I à V) a pour but ultime de réduire la molécule d'oxygène (O_2) pour produire de l'eau (H_2O). Cependant, dans certains cas (2 à 5% des cas), la réduction de l'oxygène n'est pas complète. Dans ces situations, l'oxygène est réduit par un seul électron, ce qui entraîne la formation d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

L'anion superoxyde est une espèce très réactive qui a une demi-vie courte. Bien qu'il soit un radical précurseur, l'anion superoxyde peut exercer ses effets en formant des espèces radicalaires encore plus réactives [155] ,

✓ Le peroxyde d'hydrogène

Les principaux sites producteurs de peroxyde d'hydrogène sont les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Il est généré par la réduction enzymatique du radical anion superoxyde par des enzymes telles que certaines oxydases et peroxydases, H_2O_2 joue un rôle important dans la carcinogénèse car il est capable de diffuser dans la mitochondrie et au travers des membranes cellulaires ce qui lui permet de génère plusieurs types de dégâts cellulaires [156].

✓ Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\text{HO}^{\bullet}$) est l'espèce oxydante la plus dangereuse car il est doué d'une très haute réactivité vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto oxydation lipidique et la destruction du matériel génétique [157].

II.4.2.7 Les conséquences biologiques du stress oxydatif.

✓ Peroxydation lipidique

C'est un processus d'auto-oxydation initié par l'attaque des radicaux libres (sur les phospholipides des membranes des composants cellulaires, entraînant la formation des

peroxydes lipidiques qui sont très réactifs avec les autres composants cellulaires et la matrice extracellulaire [158], ce qui induit une diminution de la fluidité des lipides, une altération de la perméabilité et des enzymes membranaires et une génération de métabolites cytotoxiques des lipides tels que, l'isoprostane, le malondialdéhyde, l'acide thiobarbiturique ce qui pourrait à l'origine de nombreuses pathologies ; neurodégénératives, dermatologiques, insuffisance rénale, diabète, cancers ou autres [159], [160], [161].

✓ **Dénaturation de l'ADN**

Les dommages à l'ADN sont toute modification de la structure de l'ADN qui altère ses propriétés de codage et/ou interfère avec le métabolisme cellulaire, comme la réplication ou la transcription des protéines synthétisées [162]. Toutefois les ERO n'affectent pas l'ADN de la même manière ; le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène à des niveaux physiologiquement pertinents ne réagissent pas facilement avec l'ADN [163].

Il a été rapporté que les ERO provoquent diverses lésions de l'ADN (telles que des altérations de la base et / ou du sucre, la cyclisation de la base du sucre, des liaisons croisées ADN-protéine et des liaisons croisées intra- et inter-brins) [163], [164], [165].

✓ **L'oxydation des protéines**

Les ERO peuvent provoquer une fragmentation des chaînes polypeptidiques par oxydation du squelette carboné. La cystéine et la méthionine sont les plus sensibles aux changements oxydatifs en raison de la forte sensibilité de réaction du groupe soufre dans ces acides aminés ce qui aboutit à une diminution de l'activité enzymatique des protéines, une stabilité plus faible face à la chaleur et une susceptibilité plus forte à la dégradation protéolytique [166], [167].

II.4.2.8 Mécanismes d'effet antioxydant des produits de la ruche.

Les polyphénols des produits de la ruche peuvent interférer de 3 mécanismes antioxydants différents [168].

II.4.2.8.1 Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes peuvent avoir un effet additif sur les antioxydants endogènes, de même ils sont rapidement oxydés par ERO, donnant un radical plus stable et moins réactif. Comme ils peuvent stabiliser les radicaux libres en réagissant avec leur site actif grâce à la réactivité élevée de leur groupe hydroxyle.

II.4.2.8.2 Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont des composés capables de moduler les fonctions clés des enzymes cellulaires. Cette capacité à inhiber ces enzymes spécifiques en fait des molécules d'intérêt pour leurs propriétés pharmacologiques potentielles. En modulant l'activité de ces enzymes

impliquées dans divers processus cellulaires, les flavonoïdes peuvent influencer des fonctions clés au niveau de la cellule .

✓ Oxyde nitrique synthase NOS

La NOS est une enzyme qui catalyse la production d'oxyde nitrique (NO), une molécule de signalisation importante impliquée dans de nombreux processus physiologiques. L'oxyde nitrique agit comme un vasodilatateur, favorisant la relaxation des vaisseaux sanguins et améliorant ainsi la circulation sanguine [169]. De ce fait Certains flavonoïdes qui sont retrouvés en quantités considérables dans les produits de la ruche, tels que la quercétine, le kaempférol et la myricétine peuvent stimuler l'activité de l'oxyde nitrique en augmentant l'activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale [170] .

✓ Xanthine oxydase

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber l'enzyme xanthine oxydase impliquée dans les lésions oxydatives des tissus, libérant ainsi des radicaux libres, des superoxydes. Il a également été démontré que, la quercétine et la stilbène, la lutéoline sont les inhibiteurs les plus puissants de cette enzyme [171], [172], [173].

II.4.2.8.3 Chélation des ions métalliques

Les métaux lourds sont essentiels aux processus biologiques, notamment la croissance et la reproduction des cellules, la synthèse de biomolécules, de nombreuses réactions enzymatiques et l'immunité de l'organisme, mais leur apport excessif est nocif., ils provoquent un stress oxydatif et génèrent des ERO dans l'organisme [174]. Par conséquent l'accumulation ces métaux peut causer de graves dommages aux organes, notamment les systèmes respiratoire, nerveux, reproducteur et digestif [175]. Cependant la chélation des ions métalliques est un processus chimique dans lequel les flavonoïdes « ligand », se lient aux ions métalliques pour former un complexe stable [175], grâce à la formation de liaisons covalentes, le ligand et les ions métalliques tel que le fer, le cuivre ou le zinc qui sont considérés comme cofacteurs des enzymes antioxydantes dans l'organisme [176] .

II.4.2.8.4 Régulation moléculaire

Lorsque les niveaux des ERO augmentent dans la cellule, ils peuvent induire la production de métabolites électrophiles, des composés chimiques qui ont une affinité pour les électrons et qui peuvent modifier les résidus de cystéine présents dans la protéine Keap1, ce qui provoque un changement de conformation de cette protéine et libère Nrf2, un facteur de transcription qui aide la cellule à se protéger contre les dommages causés par les ERO et à restaurer l'équilibre oxydatif. Les polyphénols des produits de la ruche peuvent renforcer l'activité antioxydante cellulaire via la régulation de la voie médiée par les protéines de la voie de signalisation de la

Nrf2 (figure 21). A cet effet l'acide chlorogénique a également démontré l'activation de la voie de signalisation Nrf2 [177]. Ainsi que l'acide caféique et l'acide ellagique de la propolis ont prouvé un effet protecteur des cellules hépatiques HepG2 par l'induction de HO-1, qui est régulée par l'activation de Nrf2 indépendante de Keap1 reposant sur la phosphorylation post-traductionnelle de ERK [178]. Par ailleurs, l'acide coumarique pourrait également réguler positivement Nrf2 pour exercer des fonctions antioxydantes et neuroprotectrices et l'acide rosmarinique protège contre les accidents vasculaires cérébraux ischémiques via l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et la régulation positive de Nrf2 et HO-1 [178], [179].

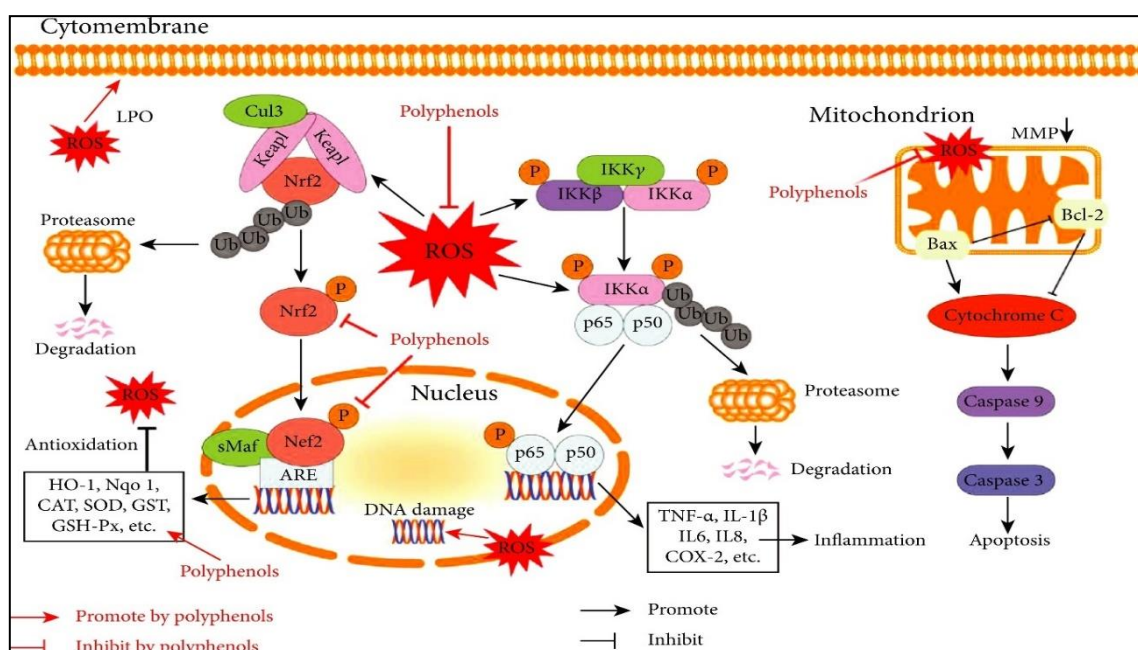


Figure 21 : Mécanismes moléculaires des polyphénols comme suppléments d'antioxydants [177]

II.4.2.9 Propriétés anticancéreuses

Le miel est sans aucun doute le produit de la ruche le plus important grâce à ses valeurs nutritionnelles et ses propriétés médicinales. En effet il a démontré son activité anticancéreuse via la diminution de la viabilité des cultures cellulaires du cancer colorectal humain [180]. Ainsi que ses biomolécules principalement les composés phénoliques tels que l'acide rosmarinique, l'acide tannique, l'acide caféique, l'acide coumarique, l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide syringique, la catéchine ont également prouvés cet effet *In-vivo* dans des modèles de cellules du cancer du sein, de l'endomètre, de la prostate, du rein et du col de l'utérus [181], [182], [183], [184], [185], [186]. Les principaux mécanismes suggérés pour cette activité sont les effets antioxydants, apoptotiques, inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale, antiprolifératifs, immunomodulateurs, anti-inflammatoires [187].

L'effet antiprolifératif de la propolis a été largement étudié. Ce produit de la ruche est plutôt extrait dans des solvants organiques avant que les activités pharmacologiques ne soient évaluées en raison de sa consistance résineuse. En revanche des essais de cytotoxicité contre plusieurs lignées cellulaires ont été effectués indiquant une inhibition de la croissance des cellules tumorales dans des modèles de cancer du poumon humain, de leucémie lymphocytaire, de carcinome hépatique humain (HEP-62) et du carcinome épidermoïde (SW-756) [188], [189], [190]. Les composés polyphénols, tels que l'acide caféique, la chrysine, l'acide *p*-coumarique, la galangine, l'acide férulique et la pinocembrine sont parmi les molécules qui jouaient un rôle important dans la suppression de la croissance des cellules cancéreuses via le renforcement du système immunitaire et régulation de la production d'interleukine-10, du TNF- α et de l'interleukine -6 suggérant leur activité immunomodulatrice [191]. D'autres mécanismes ont été liés à la capacité de ces biomolécules à interagir avec les microtubules et à l'induction de la dépolymérisation de la tubuline, l'activation de l'apoptose via les caspases et la réduction de proline dans les cellules cancéreuses via l'activité proline déshydrogénase/proline oxydase [192], [193], [194].

Compte tenu du pollen d'abeille, il semble exprimé un pouvoir anticancéreux relativement plus faible [195]. Par ailleurs, ce pouvoir a été démontré par ses protéines clivées par voie enzymatique, également connues sous le nom d'hydrolysats peptidiques qui ont été capables d'inhiber les cellules ChaGo-K1 dans un modèle du carcinome broncho-pulmonaire humain avec une CI_{50} de 1,37 $\mu\text{g/ml}$ [196]. Le mécanisme d'action anticancéreuse suggéré était via l'inhibition de la tyrosinase intracellulaire et l'interférence avec l'expression de l'ARNm correspondant au TYR et aux récepteurs de la tyrosinase [197].

II.4.2.10 Effet antimicrobien des produits de la ruche

Depuis des années la communauté scientifique a accumulé des preuves de l'efficacité des produits de la ruche contre les agents pathogènes et leurs recherches modernes ont permis de démontrer de manière convaincante les propriétés antibactériennes du miel, de la propolis et du pollen d'abeille [198], [199], [200], [201]. Ces produits contiennent une gamme complexe de composés actifs, dont certains ont des effets inhibiteurs sur diverses bactéries et champignons responsables d'infections. Ce qui fait de ces produits une source précieuse de substances naturelles aux propriétés antibactériennes bien établies, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour le développement de nouveaux traitements contre les infections microbiennes.

II.4.2.10.1 Maladies infectieuses

En médecine, une maladie infectieuse est un processus provoqué par un agent, souvent un micro-organisme qui nuit à la santé humaine ou animale. Dans de nombreux cas, les maladies infectieuses peuvent se propager d'une personne à l'autre, soit directement (par exemple, par contact cutané) ou indirectement (par exemple, par l'intermédiaire d'aliments ou d'eau contaminée) [202]. Elle englobe un large spectre de conditions causées par des agents infectieux tels que les bactéries, les virus, les parasites, les prions pathogènes ou les champignons. Ces maladies peuvent varier en gravité : certaines sont relativement bénignes et d'autres peuvent être extrêmement graves et entraînent des conséquences dévastatrices pour la santé publique, notamment la tuberculose, les hépatites virales etc. Ces affections peuvent se propager d'une personne à une autre et leurs modes de transmission varient, pouvant inclure des contacts directs, des gouttelettes respiratoires, des vecteurs (comme les insectes porteurs de maladies) etc.

II.4.2.10.2 Bactérie et pouvoir pathogène

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires, qui se reproduisent de manière asexuée, par fission binaire, lors de ce processus le chromosome se copie, formant deux copies génétiquement identiques. Ensuite, la cellule s'agrandit et se divise en deux nouvelles cellules filles. Chaque cellule fille reçoit une copie du chromosome répliqué [203].

Le pouvoir pathogène des bactéries est intimement lié à :

- Leur pouvoir adhésif (étape obligatoire d'adhésion au niveau de la peau ou des muqueuses)
- Leur pouvoir invasif (capacité à se multiplier dans les tissus et à y développer un foyer infectieux) ;
- Leur pouvoir toxigène (capacité à produire des toxines dont les effets vont s'exercer à distance de la porte d'entrée)
- Leur mode de multiplication (intra ou extracellulaire, entraînant des relations différentes avec le système immunitaire).

Certaines bactéries peuvent agir en tant que pathogènes stricts, ce qui signifie qu'elles ont la capacité d'infecter un hôte capable de monter une réponse immunitaire normale. C'est le cas, par exemple, de *Salmonella typhi*, responsable de la fièvre typhoïde, et de *Neisseria meningitidis*, qui peut causer la méningite à méningocoques. En revanche, d'autres bactéries, telles que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, sont qualifiées de pathogènes opportunistes qui peuvent infecter un hôte lorsque ses défenses immunitaires sont altérées. Ces altérations peuvent résulter, par exemple, d'une brèche dans la barrière mécanique et

immunitaire de la peau ou d'une maladie chronique qui affaiblit le système immunitaire comme c'est le cas du cancer ou du diabète [203] .

II.4.2.10.3 L'antibiorésistance

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème de portée mondiale qui ne cesse de s'aggraver. C'est un enjeu majeur de santé publique, car cette résistance peut mener à des échecs de traitement et à une augmentation de la morbidité et de la mortalité. En effet, à mesure que les bactéries développent des mécanismes de résistance aux différents antibiotiques, il devient de plus en plus difficile de les traiter efficacement. Cela peut avoir de graves conséquences, notamment lorsque des infections bactériennes courantes deviennent résistantes aux traitements standard [204] .

Les mécanismes de résistance aux antimicrobiens se répartissent en quatre catégories principales (figure 22) : (1) limitation de l'adoption d'un médicament ; (2) modifier une cible médicamenteuse ; (3) inactiver un médicament ; (4) efflux actif de médicament. En raison des différences de structure, etc., il existe des variations dans les types de mécanismes utilisés par les bactéries. Celles à Gram négatif utilisent les quatre mécanismes principaux, tandis que les bactéries à Gram positif utilisent moins couramment la limitation de l'absorption d'un médicament et n'ont pas la capacité de certains types de mécanismes d'efflux de médicament [205] .

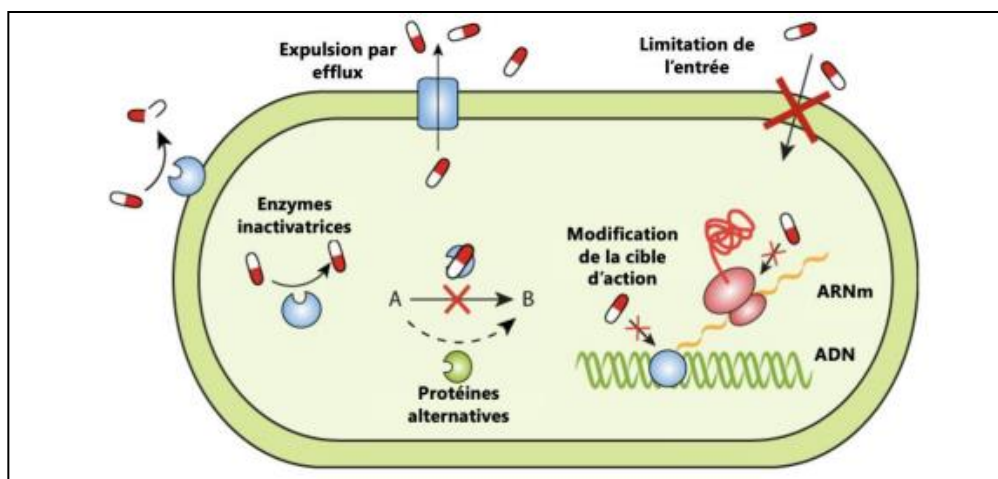


Figure 22 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques [204]

II.4.2.10.4 Mécanismes d'effet antibactérien des produits de la ruche

Le miel, la propolis et le pollen d'abeille exercent une activité antimicrobienne à large spectre contre différents types de bactéries et de levures pathogènes, de virus et des parasites [206],

[207], [208], [209], [210]. En effet le miel a démontré son effet antibactérien grâce aux nombreuses propriétés physiques et chimiques qu'il possède telles que sa teneur élevée en sucre qui assure une osmolalité élevée de ce produit, un pH acide, le peroxyde d'hydrogène, les bactériocines, la défensine, le méthylglyoxal et l'acide phénylacétique [211]. De même, le miel en mélange avec d'autres produits de la ruche a démontré un effet antiviral *In-vitro* contre les virus varicelle-zona, la rubéole, la grippe et l'herpès simplex [212], [213], [214]. Pourtant la propolis exerce son potentiel antibactérien selon deux mécanismes distincts : soit en favorisant l'activation des réponses immunitaires de l'hôte (action indirecte), soit via l'interaction directe de son ou ses composants (artépilline C) avec la bactérie, par exemple par perturbation de la synthèse de la paroi cellulaire et altération de la membrane [215], [216]. En effet, elle a présenté une puissante activité antivirale, notamment contre les virus de l'herpès humain, la grippe, le poliovirus etc [213], [216], [217]. Ainsi que certains flavonoïdes contenus dans les produits de la ruche tels que la rutine, la naringine et la quercétine ont été suggérés comme traitement adjuvant contre le SRAS-CoV-2 [218].

Le pollen d'abeille a prouvé de vastes activités antimicrobiennes *In-vitro* contre plusieurs bactéries Gram-positifs et Gram-négatif [219], [220] et de même la richesse du pollen d'abeille en flavonoïdes lui confère un important pouvoir antimicrobien et antiviral. Ainsi, la lutéoline s'est avérée être l'un des inhibiteurs les plus puissants de la neuraminidase du virus de la grippe [221], [222].

Les effets antimicrobiens des produits de la ruche sont médiés par deux mécanismes essentiels [223] :

✓ Voie du peroxyde :

Le H_2O_2 est formé par le glucose oxydase ajoutée au nectar par les abeilles, il est considéré comme la principale inhibine dans le miel. C'est un antiseptique à large spectre est responsable de l'activité antimicrobienne du miel. L'enzyme oxydase a besoin des teneurs élevées en eau pour fonctionner efficacement, c'est pourquoi son activité est plus intense dans le miel dilué que le pur. Les niveaux de peroxyde d'hydrogène dans différents miels peuvent différer considérablement d'un miel à l'autre

Voie non-peroxyde :

• pH et effet osmotique

les propriétés physico-chimiques telles que le pH acide, la teneur glucidique et sa faible humidité confèrent au miel une viscosité et une pression osmotique élevées, ainsi que sa richesse en protéines, enzymes, acides organiques (acide gluconique, acide acétique), acides aminés, lipides, vitamines, des minéraux et bien d'autres lui permet d'inhiber une large gamme

de bactéries englobant à la fois les bactéries Gram-négative et Gram-positive qui subissent des changements physiologiques dans l'intégrité et la polarisation de leur membrane ce qui provoque une perturbation métabolique majeure et une déshydratation des cellules bactériennes

- **Les peptides et protéines**

L'activité antibactérienne peut également être attribuée à des peptides dont le plus connu est la « défensine-1 » [224] (figure 23).

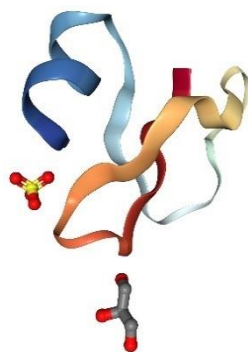


Figure 23 : Modèle structural de la défensine 1 d'*Apis mellifera* [224]

Elle est constituée de 51 acides aminés pour un poids moléculaire de 5,52 kD et qui est active contre les bactéries et la formation des biofilms bactériens [225], on trouve encore le lysozyme, dont l'action hydrolytique détruit les liaisons glycosidiques du peptidoglycane bactérien [226]

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes hydrophobes peuvent pénétrer dans noyau non polaire de la membrane cellulaire des bactéries. Une autre interaction possible est associée à la formation de liaisons hydrogène entre les flavonoïdes hydrophiles et les groupes de tête polaires des lipides [227], la Naringine possède activité antibactérienne contre *le staphylococcus* et *les streptocoques* par réduction de la fluidité des couches externes et internes des membranes bactériennes [228] et les catéchines ont démontré un effet inhibiteur des bactéries à Gram-positive et Gram-négative par perturbation de la membrane cellulaire et provoque sa fusion, un processus qui entraîne une fuite de matériaux intramembranaires [229].

Certains flavonoïdes peuvent inhiber spécifiquement les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN ou de l'ARN, ce qui perturbe leur capacité à se reproduire et à se propager [229]. Ils peuvent interférer avec les voies de communication cellulaire des micro-organismes, telles que la quorum sensing, qui est un mécanisme utilisé par les bactéries pour réguler la virulence et la formation de biofilms [230]. Ce qui réduit leur virulence et leur résistance [231].

Certains flavonoïdes peuvent stimuler le système immunitaire de l'hôte, renforçant ainsi la réponse de l'organisme contre les infections microbiennes. Ils peuvent améliorer l'activité des cellules

immunitaires, telles que les macrophages et les lymphocytes, favorisant ainsi l'élimination des micro-organismes [232].

- **Le méthylglyoxal (MGO)**

C'est le composé bioactif impliqué dans l'activité antibactérienne non-peroxyde retrouvé dans certains types de miel plusieurs qui a prouvé son effet inhibiteur des bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et anti formation du biofilm du *pseudomonas aéroènes* [233], [234] .

Le schéma suivant (figure 24) résume les différents mécanismes d'effets antimicrobien du miel et ses dérivés : Les facteurs inhibiteurs directs affectent les mécanismes cellulaires (en bleu), les facteurs inhibiteurs indirects ont un effet plus large sur la cellule bactérienne (en vert) [235].

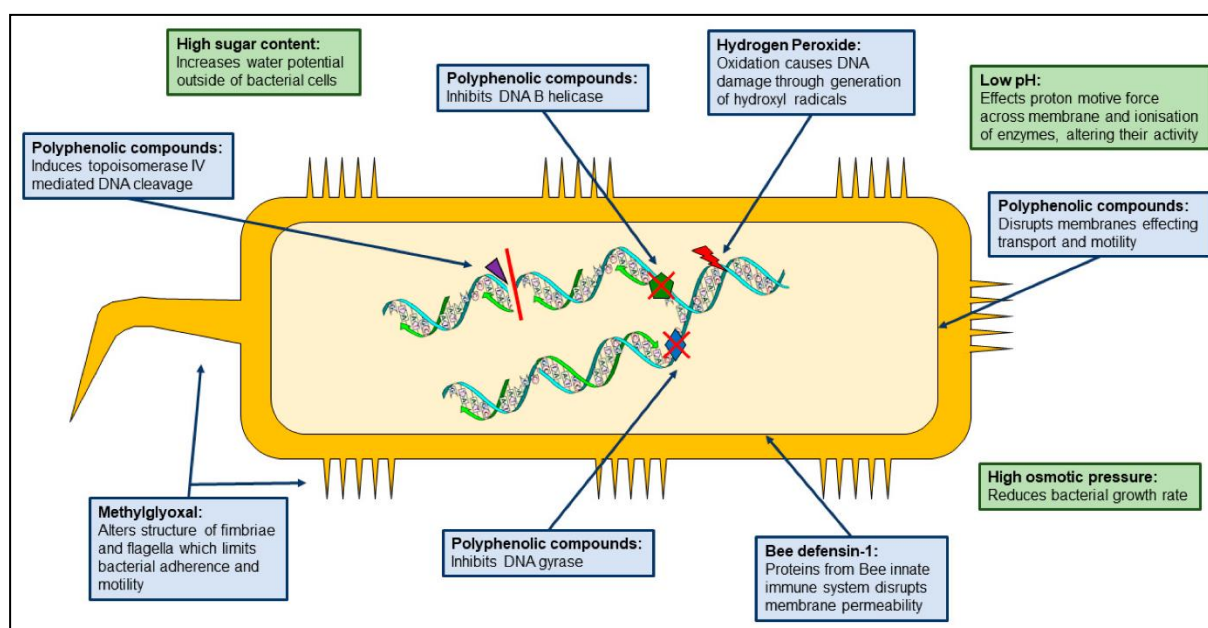


Figure 24 : Mécanismes d'effets antimicrobien du miel et ses dérivés [235].

II.4.2.11 Propriété antiparasitaire des produits de la ruche

Au cours des dernières décennies, il y a eu un vif intérêt pour le dépistage des caractéristiques pharmacologiques et chimiques des produits de la ruche, une source prometteuse des substances bioactives naturelles, comme thérapie antiparasitaire alternative [236].

Le miel, la propolis et le pollen d'abeille ont démontré un large effet antiparasitaire contre les protozoaires, les vers et parasites responsables de la schistosomiase, la trypanosomose, la leishmaniose, le paludisme, la toxoplasmose, amibiase, giardiasse [237], [238], [239], [240] . Les mécanismes pharmacologiques suggérés de cette activité antiparasitaire sont dus à leurs composition en flavonoïdes et polyphénols permettant de renforcer l'immunité et recrutement des macrophages et stimulation des effets immunomodulateurs, en influençant la production

d'interféron- γ , de facteur de nécrose tumorale α , d'IL-1, d'IL-4 et d'IL-17 et aussi ils peuvent perturber la membrane des parasites et induire leur apoptose [241] .

II.4.2.12 Effet antidiabétique des produits de la ruche

II.4.2.12.1 Le diabète

Le diabète est une maladie chronique causée soit par un manque de production d'insuline par le pancréas, soit par une incapacité à utiliser l'insuline produite. Cela conduit à une concentration plus élevée de glucose dans le sang. Son dépistage passe par une prise de sang à jeun. On parle de diabète lorsque la concentration de glucose dans l'espace veineux du sang est supérieure à 1,26 g/l. Il existe plusieurs variétés de diabète, notamment le diabète gestationnel, le diabète de type 1 et le diabète de type 2 [242]. .

✓ Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, connu par le diabète insulino-dépendant est caractérisé par une absence ou une trop faible production d'insuline par les cellules du pancréas [243] (Figure 25). C'est l'une des maladies chroniques qui se développent en raison d'une inflammation sévère et se manifeste par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et une chimiotaxie médiée par les lymphocytes B et T, tels que l'IL-1 β et le TNF- α , conduisant à une résistance à l'insuline [244], [245] , une hyperglycémie, une glycosurie et une dyslipidémie induisant ainsi la propagation d'espèces réactives de l'oxygène, qui entraînent un dysfonctionnement cellulaire et des lésions oxydatives, en particulier au niveau des tissus cardiaques, rénaux et hépatiques [246].

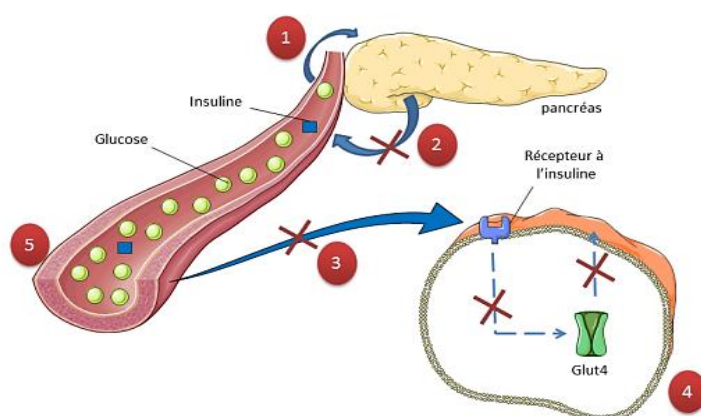


Figure 25 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le DT1 [243]

✓ Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique complexe qui résulte d'une combinaison de plusieurs facteurs :

- **Insulinorésistance :**

Il s'agit d'une condition où les tissus cibles de l'insuline, tels que le foie et les muscles squelettiques, deviennent moins sensibles à l'action de l'insuline. L'insuline est une hormone qui joue un rôle clé dans le métabolisme du glucose en facilitant l'entrée du glucose dans les cellules. Lorsque les tissus deviennent résistants à l'insuline, le glucose circulant dans le sang ne peut pas être utilisé de manière efficace par les cellules, conduisant à une hyperglycémie.

- **Diminution de la sécrétion de l'insuline**

Les cellules β du pancréas, responsables de la production d'insuline, peuvent progressivement perdre leur capacité à sécréter une quantité suffisante d'insuline. De plus, la qualité de l'insuline produite peut être altérée. Ces déficiences dans la sécrétion d'insuline contribuent à l'incapacité du corps à maintenir des niveaux de glucose normaux.

- **Augmentation de la sécrétion de glucagon :**

Le glucagon est une hormone qui agit en sens inverse de l'insuline, favorisant la libération de glucose dans la circulation sanguine. Dans le diabète de type 2, il y a souvent une augmentation de la sécrétion de glucagon, ce qui aggrave la production hépatique de glucose et contribue à l'hyperglycémie.

- **Dysfonctionnement du tissu adipeux :**

La voie de signalisation de l'insuline est altérée en raison du dysfonctionnement du tissu adipeux, ce qui contribue à l'insulinorésistance.

Il est également intéressant de noter que le diabète de type 2 passe généralement par une phase prédiabétique, où les compensations du pancréas maintiennent la glycémie à des niveaux relativement normaux malgré l'insulinorésistance. Cependant, avec le temps, cette capacité de compensation peut diminuer, conduisant finalement au développement du diabète de type 2.

La prise en charge du diabète de type 2 vise souvent à améliorer la sensibilité à l'insuline, à soutenir la sécrétion d'insuline, et à réguler la production de glucose par le foie, souvent par le biais de modifications du mode de vie, de médicaments et d'autres approches thérapeutiques.

Il existe en effet plusieurs facteurs de risque responsables de l'apparition du diabète de type 2 : l'obésité, l'inactivité physique, une alimentation mal équilibrée mais aussi des antécédents familiaux [247].

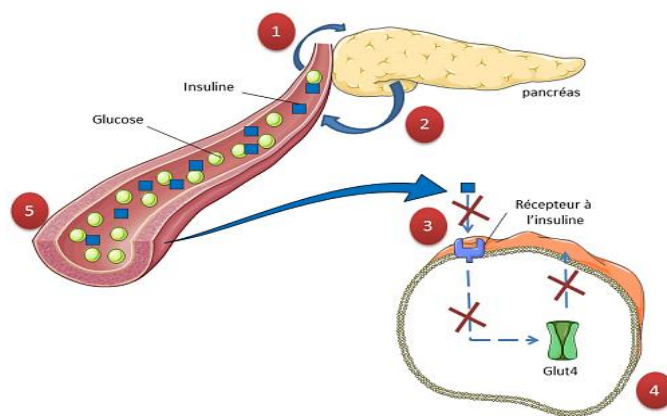


Figure 26 : Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le DT2 [243]

II.4.2.12.2 Mécanisme d'effet antidiabétique des produits de la ruche

Les produits de la ruche, tels que le miel, la gelée royale, la propolis et le pollen d'abeille, ont été étudiés pour leur effet anti-diabétique [248]. Bien qu'il n'existe pas de remède approprié pour le diabète, ces produits peuvent offrir certains avantages dans la gestion de la maladie et ses complications. Voici quelques modes d'action possibles des produits de la ruche :

✓ *Régulation de la glycémie*

Certains produits de la ruche ont été associés à une amélioration de la régulation de la glycémie. Le miel, par exemple, a un indice glycémique plus bas que le sucre ordinaire, ce qui signifie qu'il provoque une augmentation plus lente et plus modérée de la glycémie [249]. De plus, des études suggèrent que certains composés principalement les flavonoïdes régulent de la production de glucose par inhibition des enzymes impliquées dans la production de glucose dans le foie, ce qui contribue à réduire les niveaux de glucose sanguin. Ils peuvent également favoriser le stockage du glucose dans les tissus musculaires et adipeux, aidant ainsi à maintenir un équilibre glycémique optimal.

✓ *Effet antioxydant*

Les produits de la ruche, en particulier la propolis, contiennent des antioxydants naturels, tels que les flavonoïdes, qui peuvent aider à réduire le stress oxydatif associé au diabète [250].

✓ *Effet anti-inflammatoire*

L'inflammation chronique est associée au développement du diabète de type 2 [251]. Certains flavonoïdes ont montré des propriétés anti-inflammatoires en inhibant les médiateurs inflammatoires et en régulant les voies de signalisation inflammatoires. Cela peut aider à réduire l'inflammation systémique et à améliorer la sensibilité à l'insuline [252].

✓ *Effet protecteur sur les cellules du pancréas*

Des études ont suggéré que certains produits de la ruche, notamment la gelée royale, pourraient avoir un effet protecteur sur les cellules bêta du pancréas, qui sont responsables de la production d'insuline. Ces produits pourraient contribuer à la régénération et à la préservation des cellules pancréatiques, ce qui pourrait avoir un impact positif sur la sécrétion d'insuline et ils peuvent aider à améliorer la santé métabolique chez les personnes atteintes de diabète via la protection des cellules pancréatiques par les flavonoïdes, ce qui contribue à maintenir une production adéquate d'insuline et à prévenir la progression du diabète [253], [254].

✓ *Amélioration de la sensibilité à l'insuline :*

Les flavonoïdes peuvent améliorer la sensibilité à l'insuline, ce qui signifie que les cellules deviennent plus réceptives à l'action de l'insuline. Cela favorise une meilleure utilisation du glucose par les cellules et peut aider à maintenir des niveaux de glucose sanguin équilibrés [255], [256].

✓ *Réduction de la résistance à l'insuline :*

Les flavonoïdes peuvent aider à la réduction de la résistance à l'insuline en régulant les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme du glucose, à l'inhibition des enzymes de dégradation de l'insuline et à améliorer sa signalisation dans les cellules cibles [257].

Le schéma suivant résume les différents mécanismes d'effets antidiabétiques des produits de la ruche :

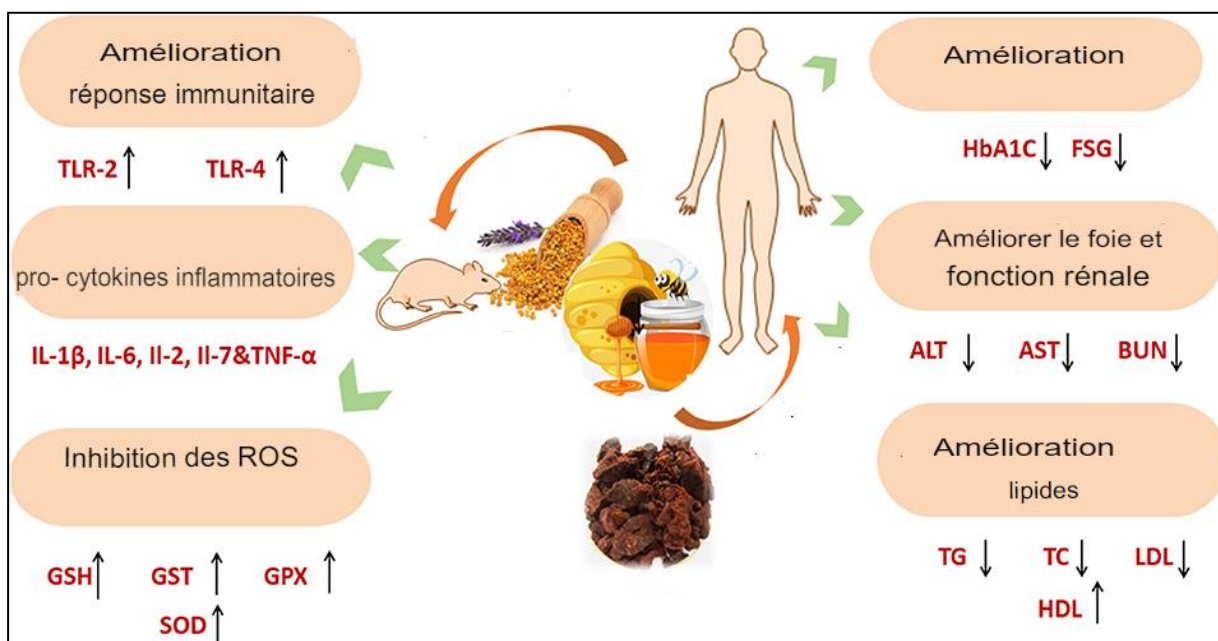


Figure 27 : Mécanismes d'effets antidiabétiques des produits de la ruche [258]

II.4.2.13 Propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices

La réponse biologique du système immunitaire, appelée inflammation, peut être déclenchée par différents éléments, tels que des agents pathogènes, des cellules endommagées et des substances toxiques. Les éléments mentionnés peuvent provoquer des réactions inflammatoires aiguës et/ou chroniques au niveau du cœur, du pancréas, du foie, des reins, des poumons, du cerveau, du tractus intestinal et du système reproducteur, pouvant causer des dommages aux tissus ou des lésions [259]. Ce processus déclenche les voies de signalisation inflammatoire tels que les cytokines d'IL-6 et du TNF- α [260]. Les études *In-vitro* et *In-vivo* ont démontré que les flavonoïdes tel que la quercétine et la myricétine identifiées dans le miel [261] inhibaient l'activation des voies NF- κ B et MAPK [262]. Quant à la propolis, son effet anti-inflammatoire et immunomodulateur est lié à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α , ainsi que la régulation des voies de signalisation et la modulation de la fonction des lymphocytes B et T. Tandis que le pollen d'abeille a démontré *In-vivo* qu'il agit sur le système nerveux aux niveaux local et systémique et que l'activité anti-inflammatoire est due à la réduction des prostanoïdes grâce à sa composition en flavonoïdes tel que la quercétine, l'acide ellagique, le kaempférol et l'apigénine qui présentent une affinité avec la COX-2 [263].

II.4.2.15 Propriété cardioprotectrice

Les maladies cardiovasculaires étant l'un des troubles les plus courants, la modification des facteurs de risque est une priorité urgente en matière de santé. Il est intéressant de noter qu'un nombre croissant des études suggèrent que les produits de la ruche ont des effets positifs sur les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires de ce fait ils ont démontré une cardioprotection via l'amélioration du métabolisme lipidique, l'activité antioxydante, la modulation de la pression artérielle, la restauration du rythme cardiaque et la réduction de la zone d'infarctus du myocarde [264], [265]

Le mécanisme élucidé de l'effet cardioprotecteur de la propolis est dû aux propriétés antioxydantes des polyphénols qu'il possède permettant l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peroxynitrite et la réduction des ROS, augmentation des niveaux de synthèse de NO et à l'amélioration de la fonction endothéliale [266].

II.1 Propriété cicatrisante

Les propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antibactériennes du miel et la propolis pourraient avoir contribué à leur efficacité dans la cicatrisation des plaies [267], [268].

La propolis réduit la concentration de protéines pro-inflammatoires, telles que la COX-1 et la COX-2, la protéinase et les prostaglandines en raison de la présence de composés flavonoïdes et phénoliques, tels que l'acide caféique.

CHAPITRE III : POLYPHENOLS DES PRODUITS DE LA RUCHE : CARACTERISATION, EXTRACTION, SEPARATION ET IDENTIFICATION

Les produits de la ruche, tels que le miel, la propolis et la gelée royale, sont considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels. Ces antioxydants sont capables de limiter les effets du stress oxydatif, qui est un facteur sous-jacent dans la pathogenèse de nombreuses maladies. De plus, ces produits ont démontré des propriétés antibactériennes et antifongiques. Les composés phénoliques sont responsables de des effets pharmacologiques de ces produits naturels, Ils comprennent deux groupes principaux de composés, les flavonoïdes et les acides phénoliques [269].

II.1 Les polyphénols

III.1.1 Définition

Les polyphénols sont des molécules spécifiques du métabolisme secondaire des végétaux [270] . Ils jouent un rôle principal pour les protéger dans des conditions défavorables, ainsi que certains terpènes tels que les gibbérellines, les stérols les caroténoïdes, et l'acide acétique qui sont responsables de la croissance et le développement des plantes, contribuant ainsi à leur survie dans son écosystème [271] .

Le terme « phénol » englobe plus de 10000 composés naturels identifiés, il a été introduit en 1980, en remplacement au terme ancien de tanin végétal [272]. L'analyse des composés phénoliques a également été considérée comme une voie très prometteuse pour étudier les origines florales et géographiques des miels et ses dérivés [273], [274] Par exemple, l'héspéridine a été utilisée comme marqueur pour le miel d'agrumes et le kaempférol pour le miel de romarin ainsi que la quercétine pour le miel de tournesol [275] .

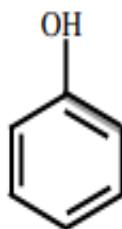


Figure 28: structure chimique générale des polyphénols

III.1.2 Biosynthèse

La formation des groupes phénoliques dans les plantes peut se produire par deux voies biosynthétiques distinctes. La voie la plus courante est celle de l'acide shikimique, qui est

également responsable de la synthèse des acides aminés. Cette voie conduit à la production d'une variété de composés phénoliques tels que les acides benzoïques, les acétophénones, les lignanes, les lignines et les coumarines [276]. Tandis que la deuxième voie implique les acétogénines, qui utilisent l'acide acétique activé sous forme d'acétyl-S-coenzyme A comme précurseur. Au cours de cette voie, le couplage des unités acétates conduit à la formation de poly-3-cétoesters. Après cyclisation, ces composés peuvent donner naissance à une gamme de composés mono ou polycycliques [277] dont les xanthones et les flavonoïdes [278].

III.1.3 Classification

Les composés phénoliques peuvent être classés selon la complexité, le degré et les liaisons possibles du squelette de base avec d'autres molécules [279].

Il n'existe pas de consensus sur la classification des composés phénoliques. La plupart des classifications des composés phénoliques sont basées sur leur structure chimique (figure 29). En ce sens, les composés phénoliques peuvent être classés de quatre manières différentes, de la plus générale à la plus spécifique :

- Flavonoïdes et non-flavonoïdes
- Nombre de cycles aromatiques
- Le squelette carboné, qui décrit de manière très élémentaire comment les atomes de carbone de la molécule sont organisés par exemple, C6, C6-C1, C6-C3-C6, etc.
- La structure chimique de base, qui est une description ou une image spécifiant les atomes communes le groupe fonctionnel [280] .

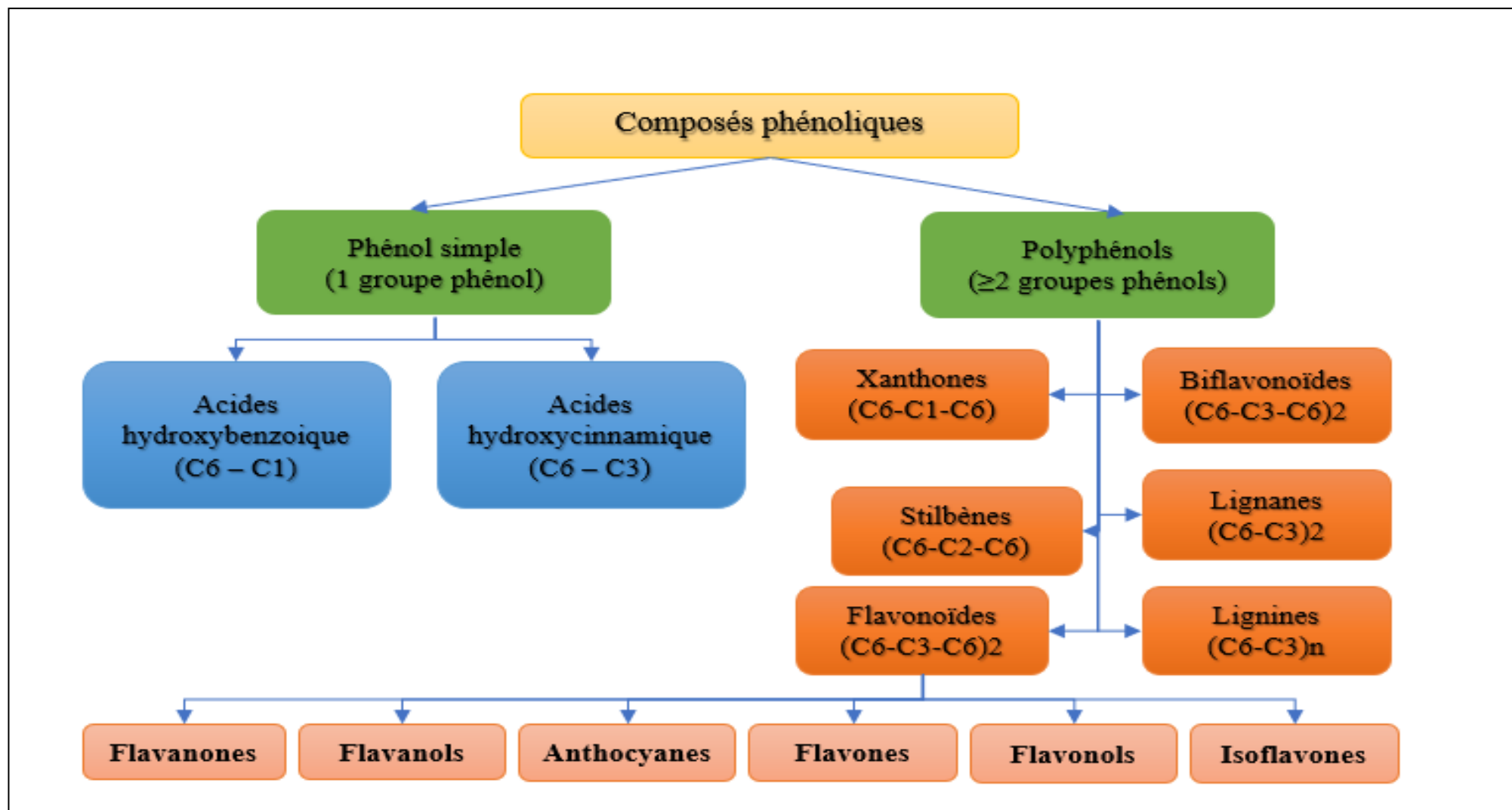


Figure 29 : Classification des polyphénols [281]

III.1.4 Méthodes d'extraction des polyphénols issus des produits de la ruche

L'extraction des polyphénols à partir des produits de la ruche est en effet une étape cruciale dans la recherche, visant à isoler et identifier les bioactifs provenant de ces sources naturelles. Les chercheurs ont développé diverses méthodes d'extraction afin d'améliorer l'efficacité du processus et d'optimiser les rendements ainsi que les concentrations des biomolécules extraites. Ces méthodes peuvent varier en fonction du produit de la ruche étudié et des propriétés spécifiques des polyphénols recherchés [282].

Certaines des méthodes couramment utilisées pour l'extraction des polyphénols comprennent l'extraction par solvant, l'extraction par fluides supercritiques, et l'extraction par ultrasons. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients, et leur choix dépend souvent des propriétés spécifiques des polyphénols ciblés, des objectifs de l'étude, et des conditions préférentielles [283].

L'examen de différentes conditions d'extraction, telles que la température, la pression, la durée et le choix du solvant, permet aux chercheurs d'optimiser le processus pour obtenir les meilleurs rendements et concentrations possibles. Cela contribue également à minimiser les effets indésirables et à préserver l'intégrité des composés bioactifs extraits.

En résumé, l'extraction des polyphénols à partir des produits de la ruche représente un domaine de recherche prometteur, et les avancées dans les méthodes d'extraction contribuent à mieux comprendre et exploiter les bénéfices potentiels de ces composés pour la santé humaine.

III.1.4.1 Les méthodes conventionnelles

Pour extraire des molécules actives à partir des matrices végétales, les méthodes traditionnelles reposent sur le choix du solvant associé à la température et/ou à l'agitation. Les méthodes traditionnelles utilisées pour extraire ces principes actifs comprennent : la macération, l'hydrodistillation et l'extraction par Soxhlet. Cette technique, qui a été utilisée depuis longtemps, est considérée comme standard et est utilisée comme référence pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide.

✓ Macération

L'extraction conventionnelle par solvant ou bien l'extraction directe est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques. Elle consiste à laisser macérer à froid un solide dans un solvant et on laisse reposer à la température ambiante sous agitation pendant une période pour extraire les constituants solubles dans un solvant. La séparation des molécules bioactives présentes dans un milieu solide se fait par diffusion au sein du solide solvant d'extraction ; l'extraction se présente ainsi comme une interaction solide-liquide [284].

✓ Extraction par le Soxhlet

Dans un système traditionnel de Soxhlet, on dépose la matière à extraire dans une cartouche, puis on la recouvre d'un solvant frais condensé provenant d'un ballon à distiller. Lorsque le liquide déborde, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge à nouveau dans le ballon à distiller, entraînant ainsi l'évacuation des corps dissous collectés dans le liquide en bloc. Dans le ballon, la distillation permet de séparer le corps dissous (soluté) du solvant. Le liquide soluble demeure dans le flacon tandis que le solvant frais est à nouveau placé dans le lit solide. On répète cette opération jusqu'à ce que l'extraction complète soit effectuée [285].

III.1.4.2 Les méthodes alternatives

✓ Extraction assistée par ultrason

L'ultrasonication a été considérée comme une technique innovante et prometteuse du 21^{ème} siècle, elle est fréquemment utilisée pour extraire efficacement les composés phénoliques et l'amélioration des taux global d'extraction et possibilité d'utilisation des solvants alternatifs et l'amélioration de l'extraction de composés sensibles à la chaleur et la reproductibilité [286]. Cette technique est basée sur le processus de cavitation induit par des cycles de compression et d'expansion associés au passage d'ultrasons (fréquence 20 kHz-100 MHz) à travers l'échantillon qui entraînent, entre autres, une perturbation des particules et une diffusion accrue des composés extractibles dans le solvant [287]. Les ultrasons sont appliqués utilisant les plus souvent deux systèmes : un bain à ultrasons ou une aiguille à ultrasons (Figure 30)

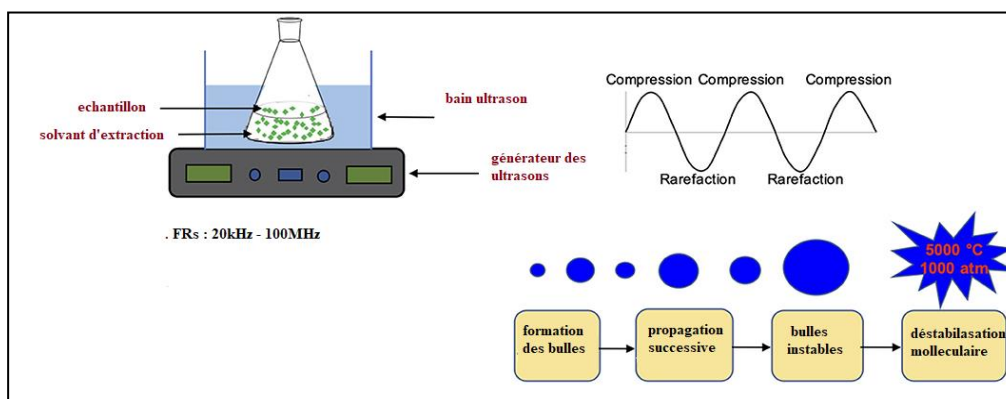


Figure 30 : Montage et principe de l'extraction assistée par ultrason [288]

✓ Extraction assistée par micro-ondes

C'est une méthode d'extraction verte car elle raccourcit le temps d'extraction et réduit la consommation de solvant [289]. Elle se base sur une soumission du mélange solvant/matrice à un champ électromagnétique de 2,45 GHz. Sous l'influence du courant alternatif, les molécules possédant un moment dipolaire vont changer d'orientation $4,9 \cdot 10^9$ fois par seconde (figure 31).

Le transfert d'énergie au mélange se fait grâce à la rotation des dipôles et à la conduction ionique [290]. Ce procédé passe en plusieurs étapes distinctes en raison des gradients de chaleur et de masse générés dans la matrice : (1) pénétration du solvant dans la matrice ; (2) solubilisation et/ou décomposition des composants ; (3) le transport des composés solubilisés de la matrice insoluble vers la solution globale ; (4) séparation de la phase liquide et solide résiduelle. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour optimiser le procédé EAM, à savoir le solvant, le rapport solide/solvant, la puissance des micro-ondes ainsi que la température et la durée d'extraction. [291].

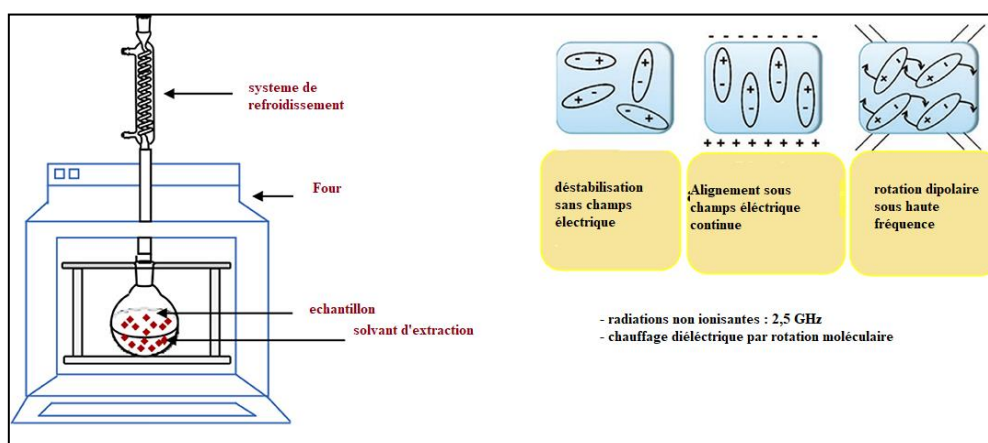


Figure 31 : Montage et principe de l'extraction assistée par microondes [288]

✓ Extraction par fluide supercritique (SFE)

C'est une technique d'extraction qui consiste à faire passer du CO_2 à l'état supercritique à travers une cartouche contenant la matière végétale (Figure 32) [292]. À l'état supercritique, le CO_2 a une densité qui peut varier de celle des gaz jusqu'à celle des liquides, suivant les conditions de pression et de température, une viscosité plus proche des gaz et une diffusion intermédiaire. Cependant, l'addition au CO_2 de co-solvants permet de modifier la polarité du mélange et rend possible l'extraction de métabolites secondaires polaires, comme c'est le cas pour la majorité des polyphénols [293], [294]. Généralement, ce sont les alcools qui sont utilisés comme co-solvants, l'éthanol présentant de plus l'avantage d'une très faible toxicité [295]. D'autres paramètres, comme la température, la pression ou le débit du fluide, peuvent également être modifiés pour accroître les rendements d'extraction ou la sélectivité [296].

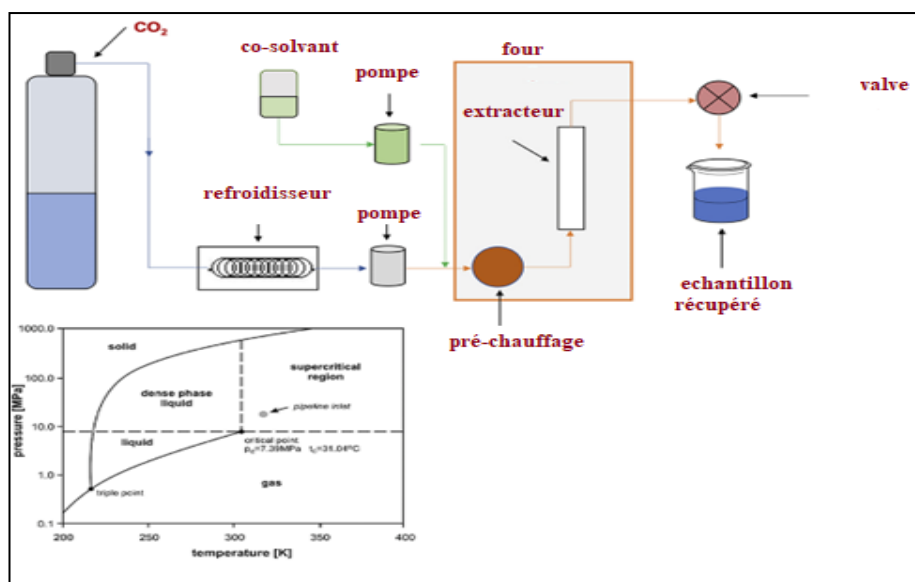


Figure 32 : Schéma de l'extraction au CO₂ supercritique

✓ Extraction par solvant eutectique profond (SEP)

L'extraction solide-liquide est l'une des procédures les plus couramment utilisées pour extraire les composés phénoliques, récemment, un nouveau type de solvants écologiques et verts appelé mélange de solvants eutectiques profonds (SEP) a été développé et appliqué à l'extraction de composés phénoliques à partir des produits de la ruche [297], [298], [299]. Ces mélanges sont généralement composés au minimum de deux espèces capables de s'associer entre elles par des liaisons intermoléculaires non-covalentes ce qui entraîne une diminution énergétique caractérisée par une réduction de la température de fusion du mélange à des points très inférieurs à celui des constituants pris individuellement [300]. Ainsi, le terme « eutectique » est utilisé pour définir le point de fusion le plus bas du mélange. Dans la plupart des cas, ces solvants peuvent être utilisés liquides à température ambiante ou à une température inférieure à 70°C (figure 33).

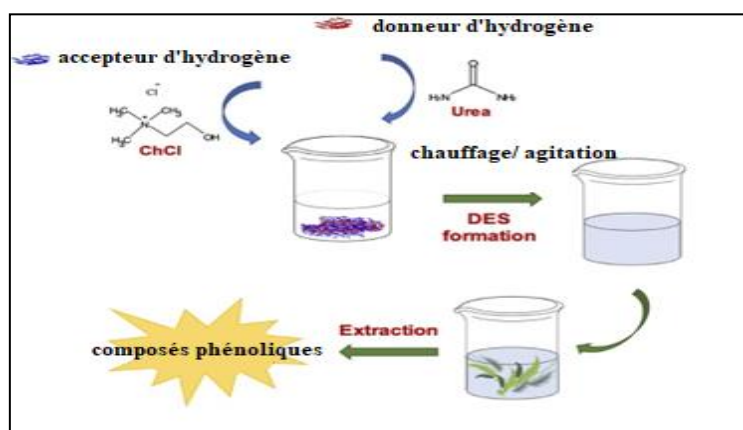


Figure 33 . Représentation schématique de l'extraction de composés phénoliques avec SEP [300]

III.1.6 Séparation et identification des composés phénoliques des produits de la ruche

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la méthode la plus largement utilisée pour la séparation et l'identification des composés organiques et inorganiques dans les produits de la ruche. Cette technique de séparation qui implique : L'injection d'un petit volume d'échantillon liquide dans une colonne remplie de microparticules (3 à 5 μm) de diamètre appelée phase stationnaire) où les composants individuels de l'échantillon sont déplacés dans la colonne avec un liquide de la phase mobile sous une haute pression générée par une pompe. Ces composants sont séparés les uns des autres par le garnissage de la colonne qui implique diverses interactions chimiques et/ou physiques entre leurs molécules et les particules de garnissage. Ces composants séparés sont détectés à la sortie par un dispositif à circulation (détecteur) qui mesure leur quantité [301].

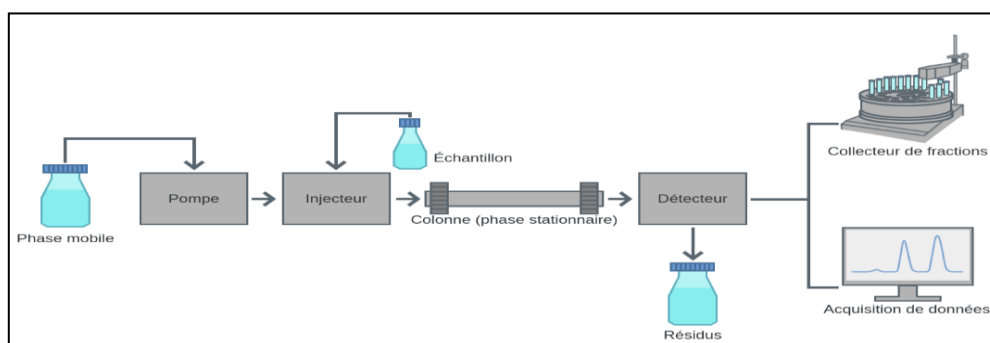


Figure 34 : Composants de l'HPLC [301].

Il existe deux principaux types de phases stationnaires : la chromatographie en phase normale et la chromatographie en phase inverse. Cette dernière est la méthode la plus couramment utilisée, les substances plus polaires ont tendance à rester plus longtemps dans la colonne, tandis que les substances moins polaires ont tendance à quitter la colonne plus rapidement. En chromatographie, des caractéristiques telles qu'une sensibilité élevée, un faible niveau de bruit, une sélectivité élevée et un large spectre d'analyse des échantillons sont recherchées dans le détecteur idéal. Les détecteurs les plus utilisés dans le système HPLC sont le détecteur UV et le détecteur à réseau de photodiodes (PDA) [302]. Les molécules organiques dotées de divers groupes fonctionnels absorbent l'énergie électromagnétique à une longueur d'onde de 190 à 800 nm dans le détecteur UV. En effet l'analyse qualitative et quantitative du composé analysé se fait à partir du rapport inverse entre la diminution de la densité du faisceau et la concentration de la substance [303].

III.1.7 Caractérisation des composés phénoliques des produits de la ruche :

III.1.7.1 Miel

Les composés phénoliques du miel sont responsables de la majeure partie de l'activité antioxydante et ses effets pharmacologiques thérapeutiques [304]. Ils dépendent principalement de son origine florale précisément des métabolites secondaires présents dans les plantes butinées [305]. Les teneurs des polyphénols des miels marocains s'étendent entre 75,14 et 124,60 AGEq/g et les flavonoïdes sont compris entre 43,24 et 19,64 mg EQ/g [306]. Le profil phénolique du miel comporte une quantité importante de polyphénols tels que les acides hydroxybenzoïques dont l'acide gallique étant l'antioxydant le plus puissant de cette classe [307].

Les acides férulique, chlorogénique, ellagique, caféique, coumarique, phénylacétique, protocatéchique, syringique et vanilique (figure 35). Ainsi que des flavonoïdes hespérétine, chrysine, galangine, apigénine, kaempférol, lutéoline, quercétine et myricétine (figure 36). En fait, ces biomolécules peuvent être utilisés comme outil de classification et d'authentification du miel, notamment dans le cas des variétés monoflorales [308]

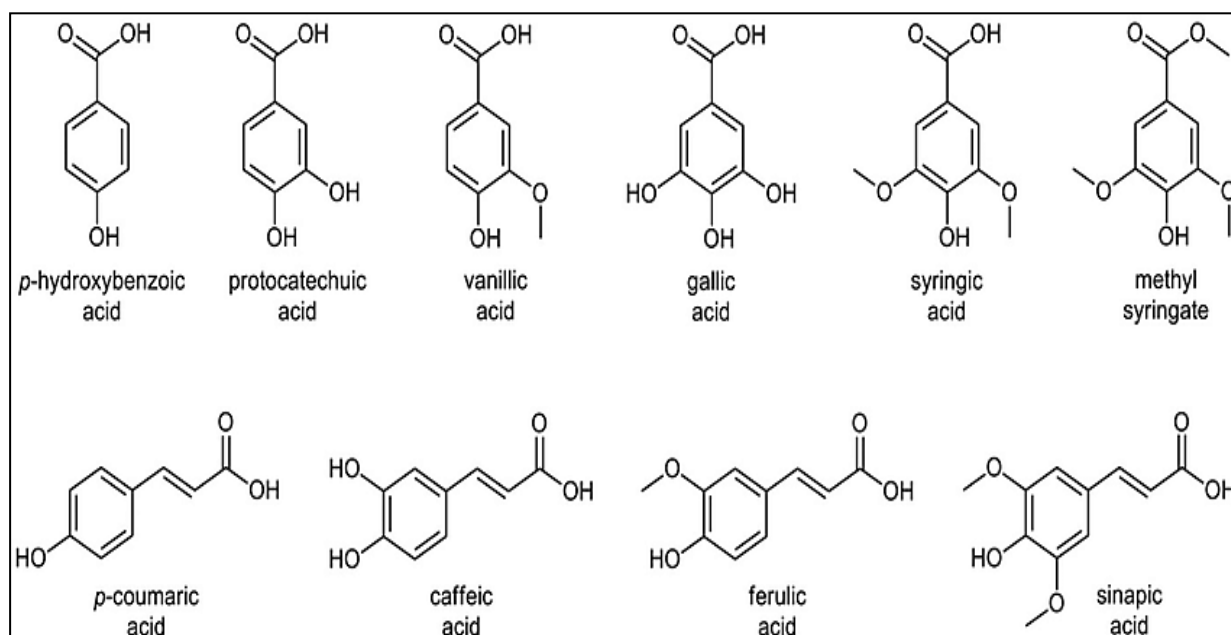


Figure 35 : Principaux acides phénoliques retrouvés dans le miel [309]

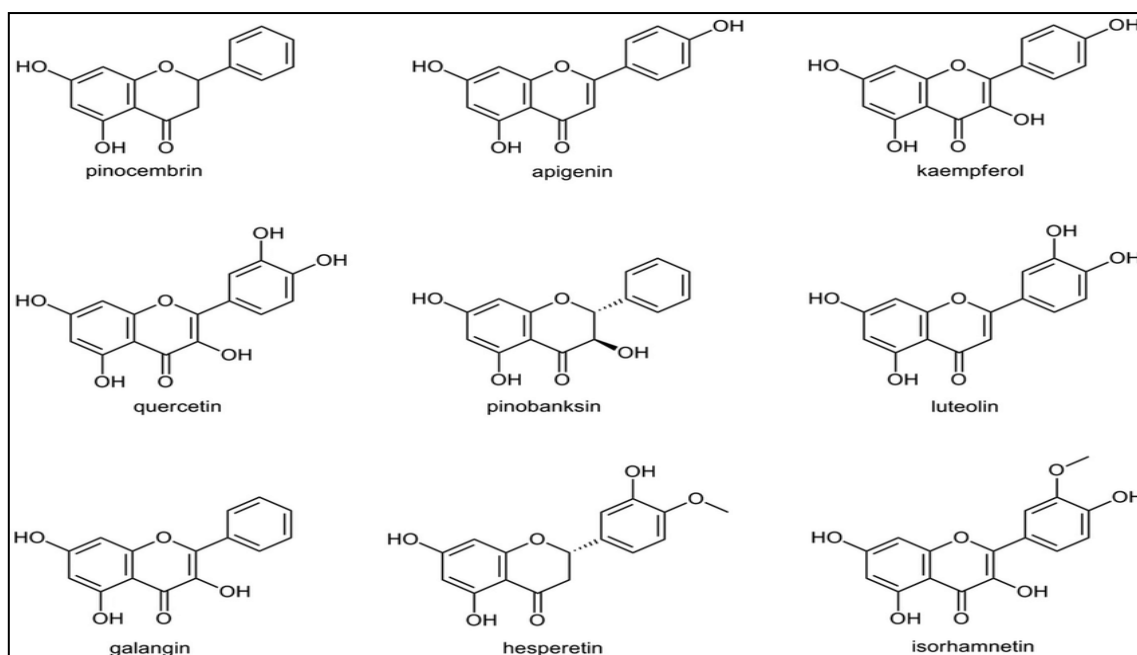


Figure 36 : Principaux flavonoïdes identifiés dans le miel [309]

III.1.7.2 Propolis

Les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes et les coumarines sont les composés qui constituent le profil phénolique de la propolis. Ce profil est fortement influencé par la zone géographique et les conditions climatiques où poussent les plantes ; par exemple, en Europe, en Amérique du Nord et en Asie (zone tempérée), les modèles phénoliques sont caractérisés par des niveaux élevés de flavonoïdes (principalement des flavones et des flavanones) et de faibles concentrations d'acides phénoliques, tandis que dans les zones tropicales, la propolis a une composition plus complexe, avec les flavonoïdes, les acides *p*-coumariques et les lignanes, entre autres [310].

La teneur totale en phénols varie généralement de 74 à 148 mg de GAE/g, tandis que la concentration totale en flavonoïdes varie entre 26 et 98 mg EQ/ [311]. Ces derniers contribuent grandement aux activités pharmacologiques de la propolis et représentent un critère pour évaluer sa qualité. Selon leur structure chimique, ils sont classés en flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, chalcones, dihydrochalcones, isoflavones, isodihydroflavones, flavanes, isoflavanes et néoflavonoïdes [310].

Généralement, ces composés se présentent sous forme d'aglycone, car la β -glucosidase sécrétée par les abeilles élimine habituellement les résidus de sucre de la plupart des flavonoïdes présents dans les plantes. Les flavonoïdes les plus représentatifs trouvés dans la propolis sont illustrés dans la figure 37.

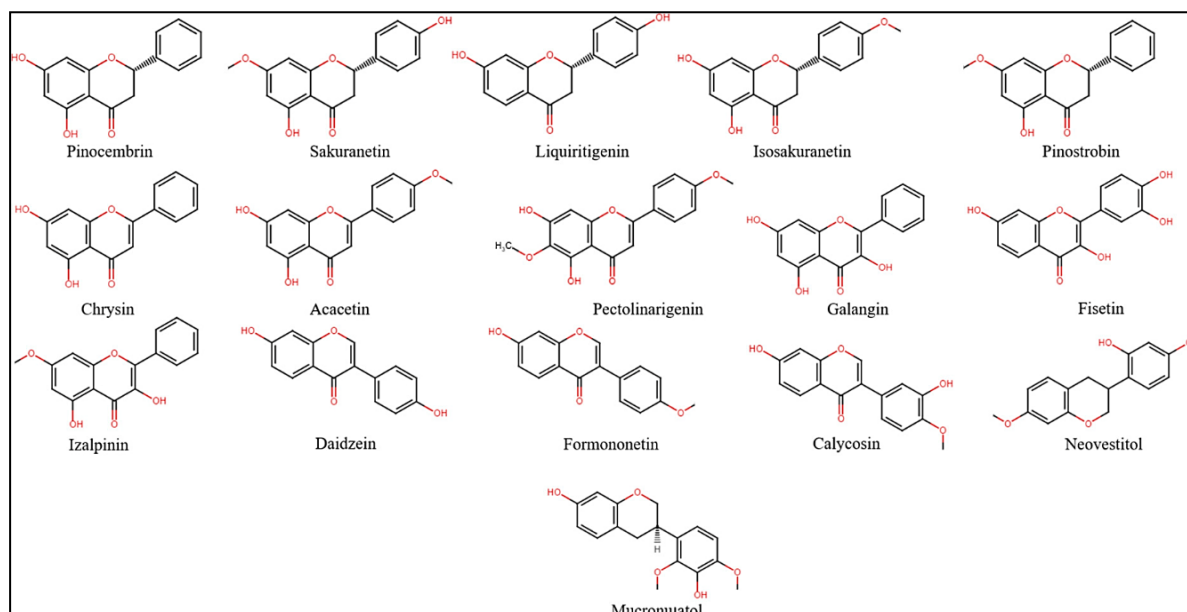


Figure 37 : Structure chimique des molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis

2^{-ème} partie

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

I.1 Matériels :

I.1.1 Produits de la ruche

Trois échantillons de la propolis brute, un miel multifloral et échantillon du pollen d'abeilles séchés issue de la région Fès Meknès précisément d'Oued Amlil 34°12'0"N4°18'48"W (1), Séfrou 33°49'48"N4°54'58"W (2) et de Sidi Hrazem (33°57'49.134" N ; 4°47'29.758" O) (3) (figure 58).

Les propolis ont été collectées en décembre 2019 par grattage des cadres des ruches modernes et saines, après l'enlèvement des débris de bois et des abeilles mortes ; ils ont été protégés de la lumière et immédiatement transférés au laboratoire dans un sac alimentaire en plastique puis stockés à – 20°C. La cire a été éliminée par extractions multiples successives au cyclohexane et au dichlorométhane selon la méthode utilisée par Boissard et al.[312].

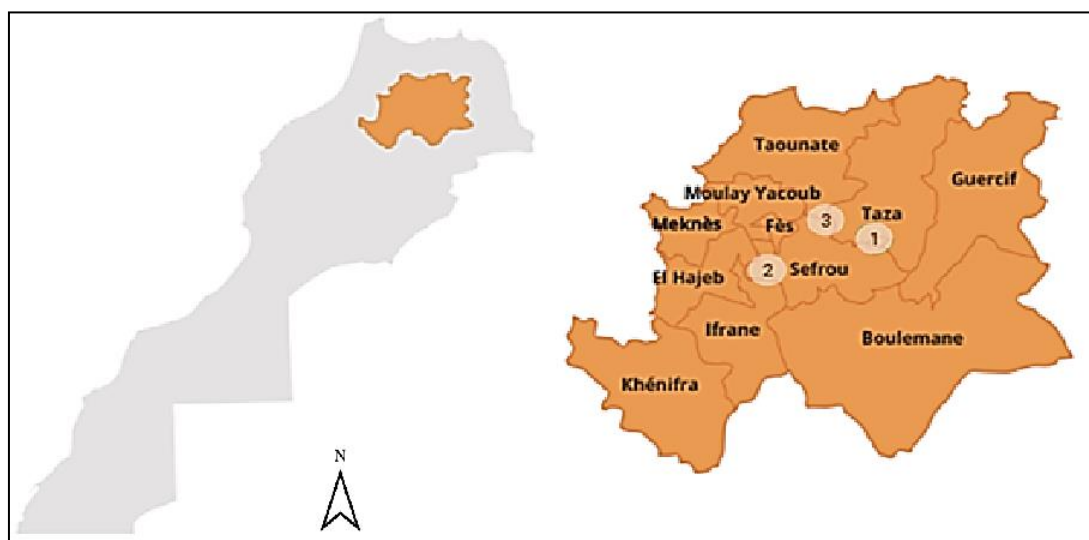


Figure 38: Localisation géographique des produits de la ruche étudiés.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 5 : Matériel apicole et végétal étudiés

:

Echantillon		Image	Région	Origine botanique	Date de récolte	Couleur
Propolis	1		Oued Amlil	<i>Olea, Eucalyptus, , Silybum. Populus</i>	Décembre 2019	Brune
	2		Séfrou	<i>Olea, Pinus, Juniperus, Rosmarinus, Cistus, Lavandula et Pistacia [313]</i>	Décembre 2019	Brune légèrement foncée
	3		Sidi Hrazem	<i>Pinus, sylvestris, Ceratonia siliqua, Rosmarinus officinalis , Thymus vulgaris, Bupleurum spinosum, Globularia. alypum et Cistus landanferus Populus, Prunus, et Quercus .</i>	Décembre 2021	Brune foncée
Miel Multifloral			Séfrou	<i>Olea, Pinus, Juniperus, Rosmarinus, Cistus, Lavandula et Pistacia [313]</i>	Décembre 2021	Brune foncée
Pollens d'abeilles séché			Séfrou	<i>Olea, Pinus, Juniperus, Rosmarinus, Cistus, Lavandula et Pistacia [313]</i>	Décembre 2021	Variée
Feuilles d' <i>Olea Europaea</i>			Séfrou	<i>Olea Europaea</i> subsp. <i>Maroccana</i> [314]	Décembre 2020	Verte

I.1.2 Matériel végétal

Feuille d'Olivier : feuilles de l'espèce *Olea europaea* issue des oliviers de la région de Séfrou récoltées durant le mois de décembre 2021, à partir de diverses parties des arbres, ont été transportées au laboratoire. Après avoir été soigneusement lavées à l'eau distillée, elles ont été séchées dans une étuve à 40°C pendant 48 heures. Ensuite elles ont été broyées et tamisées et leur poudre est conservée dans un récipient en verre et stockée à l'abri de la lumière et d'humidité jusqu'à extraction.

I.1.3 Matériel biologique :

I.1.3.1 Souches fongiques

Les souches des levures d'intérêt médical utilisées dans cette étude ont été isolées des candidoses vulvo-vaginales (Figure 59), Après identifiées selon les protocoles standardisés et des tests mycologiques classiques d'identification des espèces, telle que la formation de tubes germinatifs sur du sérum humain frais à 35 °C, la morphologie microscopique et la croissance à 35 °C pendant 24 à 48 heures et un antifongigramme ont permis ainsi de caractériser quatre espèces :

- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*,
- *Candida parapsilosis*,
- *Candida krusei*.

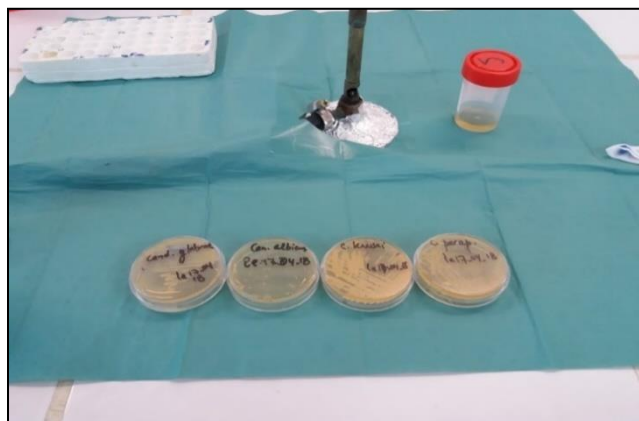


Figure 39: Souches fongiques utilisées (LSNAMOPEQ)

Les souches ont été repiquées sur un milieu de culture SDA à 35°C pendant 24 heures pour garantir la pureté et la viabilité des inoculas. Les souches étudiées ont subi une évaluation de leur sensibilité aux antifongiques (Tableau 7) selon la méthode de référence EUCAST [315]

Tableau 6 : Profil de sensibilité des souches aux antifongiques (S : sensible, I : intermédiaire, R : résistante)

	<i>C.albicans</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.krusei</i>	<i>C.parapsilosis</i>
Fluconazole	S	S	S	S
Voriconazole	S	S	S	S
Caspofungine	R	R	S	S
Micafungine	R	R	S	R
Amphotéricine	S	R	I	S
Flucytosine	S	S	I	S

I.1.3.2 Souches bactériennes

Les souches bactériennes examinées dans cette étude ont été obtenues à partir d'échantillons d'urine prélevés lors d'infections urinaires chez des adultes. Il s'agit d'une espèce appartenant au groupe des bacilles à Gram négatif (*Escherichia coli*), comme illustré dans la figure 60, et une autre appartenant aux Cocci à Gram positif : *Staphylococcus aureus* figure 61. Leurs profils de sensibilité aux antibiotiques sont représentés dans le tableau 8.

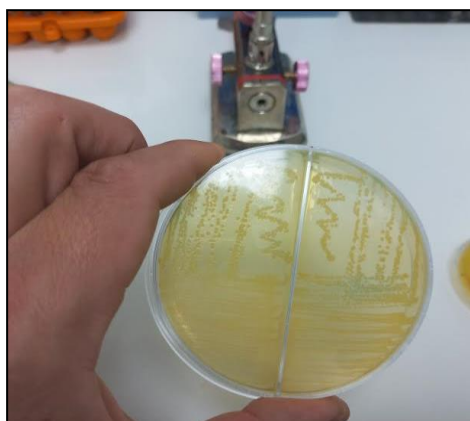


Figure 41 : isolat d'*E. coli* sur milieu de culture CLED (LSNAMOPEQ)



Figure 40 : Isolat de *S. aureus* sur milieu de culture Chapman (LSNAMOPEQ)

Tableau 7 : Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches étudiées

Antibiotiques	Souches bactériennes	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Amoxicilline		R	R
Amoxicilline+acide clavulanique		R	R
Ceftriaxone		R	S
Ceftazidime		R	S
Cefalotine		R	S
Imipenème		S	S
Ciprofloxacine		S	R
Norfloxacine		S	R
Gentamicine		S	S
Amikacine		S	S
Triméthoprim+sulfamides		R	-
Colistine		-	S
Erythromycine		S	S
Acide fusidique		S	-

I.2 Méthodes :

I.2.1 Préparation des extraits

I.2.1.1 Extraction éthanolique de propolis

L'échantillon de propolis brute a été congelé à -20°C, broyé, puis extrait selon la méthode décrite par Pobiega et al. avec quelques modifications [316]. Ainsi 10 g de la propolis brute ont été extraites avec 100 ml de solution aqueuse d'éthanol 70% (v/v) puis secouée à 200 TPM à 28°C pendant 1 jour et homogénéisé au sonicateur (Ultrasons JP., Selecta, Barcelone, Espagne) pendant 30 min et filtré sous pression réduite sur papier Whatman N°1 puis l'extrait a été condensé sous pression réduite à 40°C au rota-évaporateur (R-205 équipé d'un bain d'eau, modèle B-490 ; Büchi, Flawil, Suisse) et enfin conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

I.2.1.2 Extraction du pollen d'abeille

L'extrait éthanolique de pollen d'abeille a été préparé selon une méthode légèrement modifiée adaptée par Rzepecka et al. [410]. Pour cela 10 g du pollen d'abeille ont été extraits 3 fois avec 100 ml de solution aqueuse d'éthanol à 50% (v/v), agités pendant 60 minutes à température ambiante, traités par ultrasons pendant 30 min et puis filtrés sous pression réduite sur du papier Whatman N°1. Le filtrat obtenu a été centrifugé à 200 TPM pendant 10 min et le surnageant a été évaporé sous pression réduite au rota-évaporateur sous vide à 40°C, puis les extraits séchés ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

I.2.1.3 Extraction de miel

10 g de l'échantillon du miel multifloral ont été placés dans un bécher et 25 ml de solution aqueuse d'éthanol à 70 % (v/v) ont été ajoutés et homogénéisé, puis centrifugés à 3000 tpm

pendant 10 minutes, le surnageant obtenu a été évaporé à 40°C avec l'évaporateur rotatif à, puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation [318].

I.2.1.4 Extraction des feuilles d'olivier

Les extraits des feuilles ont été préparé selon les méthodes décrite par Sahin et Al. Avec quelques modifications [319]. Pour ce faire, 25 g de cette poudre a été ajouté à 500 ml du méthanol à 47%. Les composants hydrosolubles des feuilles d'*Olea Europaea* ont été extraits en utilisant un bain à ultrasons (40 kHz) pendant 60 minutes à température ambiante (35 °C). La solution obtenue a été filtrée à travers du papier Whatman N°1, puis concentrée avec l'évaporateur rotatif à 38°C avant d'être conservé à -20°C.

I.2.2 Caractérisation physicochimique de la propolis

I.2.2.1 Rendement d'extraction assistée par ultrasons

Les extractions ont été réalisées dans un bain-marie à ultrasons en utilisant une méthode de sonication directe avec quelques modifications [320]. La fréquence de sonication était de 50 kHz, la puissance était de 120 W et la température a été fixée à 35°C. 5g de la propolis ont été traités selon les conditions proposées par chaque expérience du plan d'expérience Box-Behnken design. Ensuite, chaque mélange a été filtré sur papier Whatman N°1 et séché au rota-évaporateur à 40°C pour éliminer le solvant.

Le rendement (%) de l'extraction assistée par ultrasons a été évalué en comparant le poids sec de l'extrait avec le poids initial de propolis en utilisant la formule décrite par Oroian et al [321] :

$$\text{Rendement} = (M_{pe} / M_{pi}) \times 100$$

Où M_{pe} est le poids de l'extrait de propolis (g) et M_{pi} est le poids de l'échantillon séché initial.

I.2.2.2 Détermination du pH

Pour déterminer le pH des échantillons de propolis, un pH-mètre numérique (modèle 2005, JP Selecta, Espagne) a été utilisé. L'électrode ionique sélective et l'électrode de référence ont été placées sur le support avec 5 ml de l'extrait. Les valeurs de pH ont été enregistrées après étalonnage du pH-mètre à l'aide de trois solutions tampons : pH 4,0, pH 6,86 et pH 9,18.

I.2.2.3 Détermination de l'humidité

Le taux de l'humidité de la propolis a été déterminé selon la méthode où 3g de l'échantillon a été mis à l'étuve pendant 1h à 105°C ; le poids a été pris trois fois après sa stabilisation dans le dessiccateur. L'humidité a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = (M_1 - M_2) / M_1 \times 100$$

Où : M_1 = poids de l'échantillon ; M_2 = Poids de l'échantillon après séchage

I.1.2.2.4 Détermination de la cire, de résine et le baume

Les taux de la cire et de la résine et le baume dans les échantillons de propolis ont été déterminés selon la méthode décrite par Papotti et al. [415]. (Figure 62). En bref, 1 g de propolis a été ajouté à 40 ml d'éther de pétrole et chauffé à 40-60°C sous agitation magnétique pendant 48 h. Ensuite, 40 ml d'éthanol à 70 % ont été ajoutés au mélange chauffé à reflux jusqu'à l'obtention d'une solution claire, puis le mélange a été refroidi pendant 1 h pour favoriser la séparation de la cire. Les résultats ont été exprimés en pourcentage représentant le taux de cire dans l'échantillon de propolis.

Le filtrat éthanolique obtenu lors de l'extraction de la cire a été concentré au rota-évaporateur sous pression réduite à 60°C, puis le résidu aqueux a été transféré dans une ampoule à décanter puis additionné de 50 ml de dichlorométhane. Après agitation, la phase organique a été recueillie et séchée sur 30 g de Na_2SO_4 anhydre, les résultats sont exprimés en % m/m. représentant le taux de la résine.

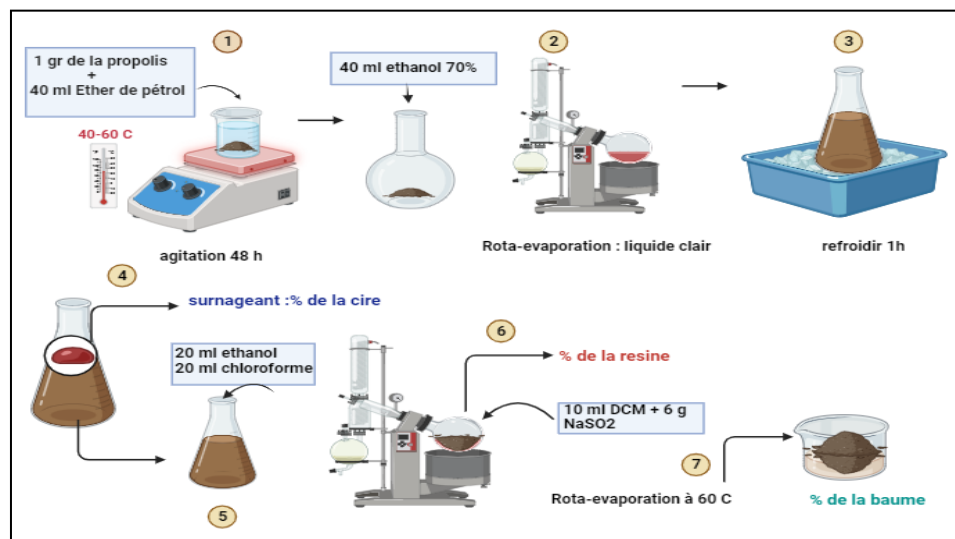


Figure 42 : Protocole expérimentale de Détermination simultanée de la cire, de résine et le baume [322]

La propolis résiduelle obtenue a été traitée avec 120 ml d'un mélange chloroforme/éthanol 1:1 (v/v) puis transféré dans un ballon d'évaporation et concentré sous pression réduite à 70 °C et séché à 110 °C pendant 1 h et transféré dans un dessiccateur jusqu'à obtention du baume où les résultats sont exprimé en % .

I.2.2.5 Détermination des métabolites primaires des produits de la ruche

I.2.2.5.1 Glucides totaux

La teneur totale en protéines des extraits de propolis a été déterminée par la méthode décrite par Ferreira-Santos et al.[323]. Cependant 100 mg de la matière sèche ont été dissoutes dans 10 ml d'éthanol à 80% dans un tube conique et porter à ébullition à 70 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, l'homogénat a été centrifugé à 1000 TRM durant 15 minutes, le surnageant a été récupéré pour le dosage des glucides totaux. Pour ce faire 100 µl de chaque surnageant des extraits ont été ajouté à 2 ml de la solution d'anthrone-acide sulfurique, chauffé dans un bain-marie bouillant à 95°C pendant 7 minutes et refroidi à 4 °C. Puis l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre UV/Vis (selecta UV 3100 ,4120021., Espagne.) à une longueur d'onde de 630 nm et une gamme d'étalonnage a été établie ($R^2 = 0,992$) à partir du Glucose en tant que standard d'une concentration allant du 10 - 600 mg/l. Tandis que les résultats obtenus ont été exprimé en milligramme équivalent de glucose (GlcE) par g de la propolis (mg GLcE/g).

I.2.2.5.2 Teneur en protéines solubles

La teneur en protéines solubles a été estimée par méthode spectrophotométrique [324]. Brièvement, la solution de Bradford a été préparée par ajout de 100 mg de bleu brillant de Coomassie G-250 à 50 ml d'éthanol 95 %. Ensuite, 100 ml d'acide phosphorique à 85 % (H_3PO_4) ont été soigneusement ajoutés sous agitation, avant d'ajouter l'eau pour obtenir un volume total de 1 litre. La solution a été filtrée et conservée à 4°C. La courbe d'étalonnage a été obtenue ($R^2 = 0,988$) par l'albumine sérique bovine comme standard de concentrations allant de 0 à 1 g /l. 100 µl de chaque extrait ont été mélangé avec 5ml de la solution préparée et immédiatement incubé à l'obscurité pendant 5 minutes et leur l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm. Les résultats ont été exprimé en mg BSA/g de la propolis.

I.2.2.6 Teneur en cendres

La teneur en cendres des échantillons de la propolis a été déterminée par calcination de 2 g de la propolis brute finement broyée à une température de 600°C pendant une heure, puis par dessiccation jusqu'à obtention d'un poids constant [325]. La teneur en cendres a été calculée en pourcentage du poids du résidu sec comme suit :

$$\text{Cendres (\%)} = m_C / m_E \times 100$$

Où m_C = la masse nette des cendres, et m_E = la masse brute de l'échantillon

I.2.2.7 La teneur minérale totale

La teneur minérale des extraits en sodium, potassium, calcium et magnésium a été déterminée par spectrométrie de masse à plasma inductif.[326] ;Initialement, 5 ml d'acide nitrique ont été ajoutés à 0,2 g de propolis minéralisée et une puissance de 1000 W a été appliquée pendant 5 min. Ensuite, 5 ml de HNO₃ et 1 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 % ont été ajoutés à la solution. Les échantillons ont été refroidis à température ambiante, complétés à 100 ml avec de l'eau distillée et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse. Les résultats ont été exprimés en µg/g.

I.2.2.8 Détermination des métabolites secondaires des produits de la ruche

I.2.2.8.1 Teneur totale des phénols : TPC

Les phénols sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) et la couleur bleue produite présente une absorption maximale à 765 nm [327] . Ce principe a été exploité pour déterminer la teneur totale en polyphénols dans les extraits des produits de la ruche. Pour ce faire 0,2 ml de chaque extrait a été mélangé avec 2 ml de réactif FC (1:10 v/v) et 1,8 ml de Na₂CO₃ 7,5 % puis incubé l'obscurité pendant 20 minutes et l'absorbance a été mesurée à 750 nm. Des solutions d'acide gallique à des concentrations allant de 0 à 1 mg/ml ont été utilisées pour obtenir la courbe d'étalonnage ($R^2 = 0,996$) [328]. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent acide gallique (AGE) par gramme d'extrait sec. Toutes les mesures ont été réalisées en triple.

I.2.2.8.2 Teneur totale en flavonoïdes totaux : TFC

La teneur totale en flavonoïdes des échantillons a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl₃) avec de légères modifications [329]. Pour cela ,100 µl de chaque extrait a été mélangé avec 0,5 ml de AlCl₃ à 10% et 0,5 ml de NaOH (1%). Ensuite, les tubes ont été incubés pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante et puis leurs absorbances ont été mesurées à 510 nm. La quercétine a été utilisée comme étalon avec des concentrations comprises entre 2,6 à 142 mg/l pour établir la courbe d'étalonnage standard ($R^2 = 0,997$). En effet la teneur totale en flavonoïdes a été exprimé en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de la matière séchée (mg QE/g MS). Toutes les mesures ont été réalisées en triple.

I.2.2.9 Evaluation de l'activité antioxydante

I.2.2.9.1 Activité de piégeage du radical ABTS

L'activité antioxydante totale des extraits des produits de la ruche étudiés a été déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS. Ce radical en contact d'un donneur de H• conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration de la solution [330]. Cette activité

a été déterminé par colorimétrie [331]. En bref, 2,5 ml de réactif ABTS ont été mélangés à 50 µl de chaque extrait et incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 6 min. Après incubation, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant du méthanol à 80 % comme contrôle. L'activité de piégeage de l'ABTS a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition } [(A_0 - A_1 / A_0) \times 100]$$

A_0 absorbance du contrôle, A_1 absorbance de la dilution

Des dilutions des extraits ont réalisées et évaluées dans les mêmes conditions et la IC_{50} en (µg/ml) a été déterminée à partir de la courbe. L'acide ascorbique été utilisé comme standard de référence.

I.2.2.9.2 Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

Le pouvoir réducteur ferrique a été déterminé selon la méthode colorimétrique avec quelques modifications [332]. Pour cela la solution du travail FRAP a été fraîchement préparée en utilisant le tampon acétate 0,3 M de (pH = 3,6), TPTZ 0,01M, HCl 0,04M et $FeCl_3$ 0,02M selon le rapport suivant 10:1:1 (v / v / v) et conservé à l'abri de la lumière, puis 75 µl de l'extrait du produit de la ruche ont été ajoutés à 2,25 ml de solution de travail FRAP et 0,225 ml d'eau déminéralisée ; le mélange a été homogénéisé et incubé à 37°C pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 593 nm. La courbe étalon a été préparée en utilisant du sulfate ferreux (200, 400, 600, 80 et 1000 µM). Les résultats sont exprimés en EC_{50} (µmol Fe^{2+} /g).

I.2.2.9.3 Activité d'inhibition du radical DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres a été déterminée par l'essai au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), tel que décrit par Chua et al. [333]. à cet effet, 1,5 ml de la solution de DPPH a été ajouté à 0,75 ml de chaque d'extrait. L'absorbance a été mesurée à 517 nm au spectrophotomètre après 15 min d'incubation à 25°C. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard et le pourcentage d'inhibition a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ DPPH} = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$

Où A_0 : l'absorbance du contrôle, et A_1 : l'absorbance de l'échantillon.

I.2.3 Screening phénolique HPLC-DAD

La séparation et la détection des composés phénoliques des extraits des produits de la ruche ont été effectuées selon la méthode adaptée par Vivar-Quintana et al. avec quelque modifications [334]. L'analyse a été effectuée sur le système de chromatographie liquide haute performance PROMINENCE HPLC : (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'un détecteur DAD, d'un

échantillonneur Rheodyne™ avec une boucle de 20 µL, d'un dégazeur et d'une pompe quaternaire. La séparation des polyphénols a été réalisée sur une colonne Agilent Zorbax C18 de dimension 4,6 mm × 250 mm × 5 µm 100 Å, avec un débit de 1 ml/min d'une phase mobile à gradient ternaire d'acétonitrile méthanol et d'eau acidifiée. La température de la colonne était de 30°C et le volume d'injection de l'échantillon était de 20 µl.

Le système des solvants a été constitué de l'eau acidifiée et d'acide orthophosphorique 0,2 % (solvant A) et du méthanol (solvant B) et de l'acétonitrile (solvant C) et qui a été utilisé avec le gradient :

Tableau 8 : Le système des solvants de la phase mobile – HPLC -DAD-

Temps (min)	Eau acidifiée 0,2% H ₃ PO ₄ (v/v) %	Méthanol %	Acétonitrile %
0	96	2	2
40	50	25	25
45	40	30	30
60	0	50	50
70	0	50	50
72	96	2	2
80	96	2	2

Les composés phénoliques ont été identifiés sur la base des temps de rétention des composé phénoliques standards en comparant leurs spectres et leurs temps de rétention., et la quantification a été réalisée par l'absorbance enregistrée à 280 et 320 nm par rapport aux standards externes d'acides phénoliques et de flavonoïdes

Les données chromatographiques ont été analysées sur le logiciel LabSolutions équipé d'un module d'identification spectrale des composés séparés ; Les résultats sont exprimés en mg/g de la matière séchée.

I.2.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des produits de la ruche

I.2.4.1 Test In- vitro de sensibilité antifongique : Détermination de la CMI-CMF

L'activité antifongique a été évaluée par détermination des CMI en utilisant des micro-dilutions avec révélation de la viabilité cellulaire par le TTC [335]. Brièvement, des inoculas des souches fongiques ont été préparés dans une solution saline stérile à 0,9% et leur turbidité a été ajustée à 0,5 McFarland. Initialement, sur une microplaque de 96 puits, à partir d'une solution mère des extraits étudiés, une série de dilution a été préparée dans le bouillon Sabouraud dextrose (BSD) pour un volume final de 20 µl pour chaque puits de 1 à 10 avec concentration allant de 1,95 à 1000 µg/ml puis 170 µL du BSD est ajouté dans chaque puits et enfin, 20 µl de la

suspension fongique de chaque souche ont été ajoutés. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, 5 µL de la solution du chlorure de triphényl tétrazolium (TTC) été ajoutée comme indicateur de la croissance bactérienne qui change au rouge [336]. Tandis que le puits 11^{ème} puit été utilisé pour le standard fluconazole et le 12^{ème} puit a été considéré comme contrôle de la croissance contenant les souches pures (figure 63).

La CMI est déterminée comme étant la plus faible concentration qui empêche un changement de la coloration du TTC.

La CMF a été définie comme la concentration la plus faible capable d'inhiber la croissance des souches fongiques. Après détermination de la CMI, le contenu du puits correspondant à la CMI et le contenu des deux concentrations précédentes ont été repiquées dans sur gélose SDA et incubés à 37°C pendant 48 heures. Le rapport $R = \text{CMF}/\text{CMI}$ a été calculé pour déterminer le type d'activité antifongique des extraits, fongistatique ($R \geq 4$) ou fongicide ($R < 4$) . [337]

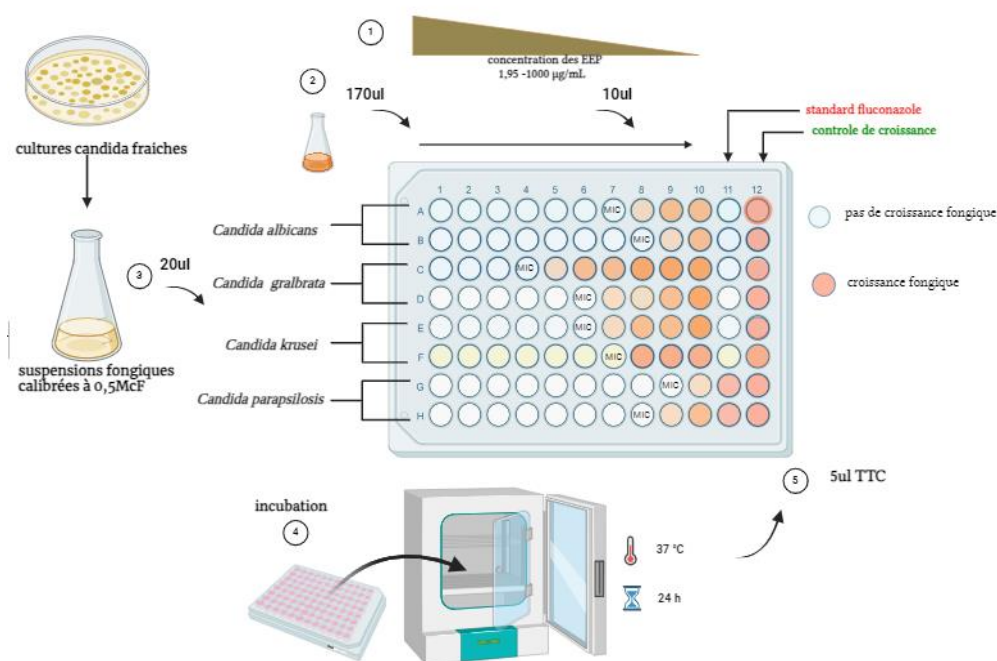


Figure 43 : Protocole de l'évaluation de l'activité antifongique

I.2.4.2 Test *In-vitro* de sensibilité antibactérienne : Détermination des CMI

Les valeurs minimales de concentration inhibitrice des mélanges suggérés par le plan d'expérience ont été déterminées par micro-méthode sur plaque à 96 puits avec révélation de la viabilité cellulaire par la résazurine [338] . À cette fin, des plaques de micro-titration de 96 puits en polystyrène ont été utilisées (SPL Life Sciences, Korea). Brièvement, 100 l de bouillon

Muller Hinton (BMH) a été distribué dans chaque puits, et des dilutions en double des mixtures des produits de la ruche ont été préparées directement sur la plaque en ajoutant 100 µl de chaque mélange pour atteindre la concentration finale. Les intervalles utilisés étaient de 2,92 à 1500 µg/ml pour chaque mixture puis 100 µl de l'inoculum normalisé ont été ajoutés à chaque puits. Le témoin négatif a été préparé avec le Bouillon Muller Hinton (figure 64).

Les plaques ont été recouvertes et incubées pendant 24 h à 37°C à l'étuve ensuite 10 µl de la résazurine à 0,15% ont été ajoutés à chaque puits et incubé à 37°C pendant 2 heures. Un changement de couleur du bleu (état oxydé) au rose (réduit) a indiqué la croissance bactérienne.

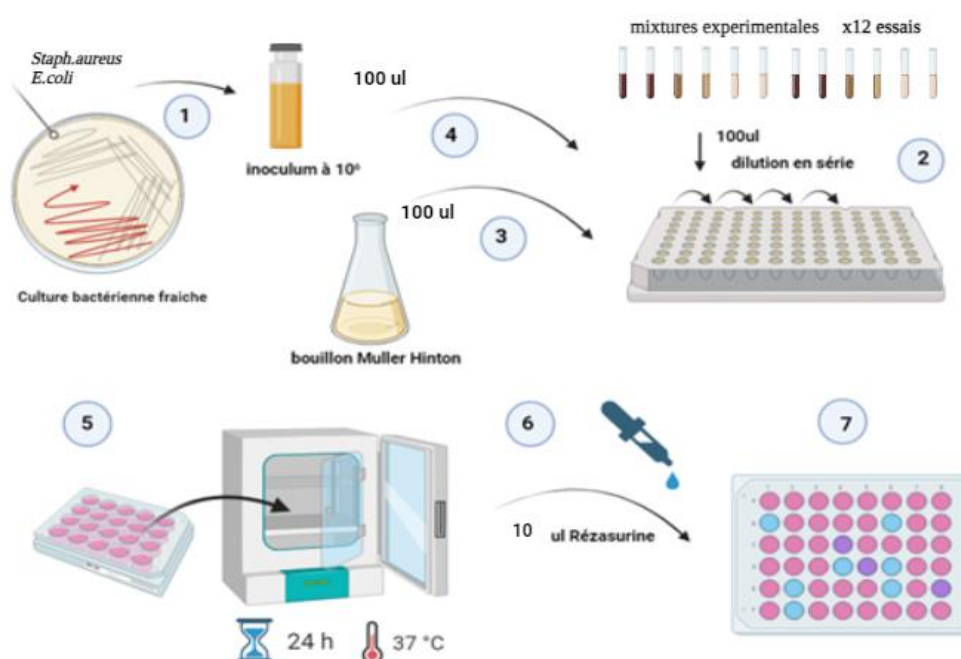


Figure 44 : Protocole de l'évaluation de l'activité antibactérienne [338]

I.2.5 Evaluation de l'activité anti-diabétique *In-vivo*

I.2.5.1 Protocole d'induction du diabète

✓ Déclaration éthique.

Toutes les expériences sur les rats ont été menées à l'animalerie relevant de la Faculté des sciences Dhar Mehraz / USMBA Fès selon le protocole éthique USMBA-SNAMOPEQ 2017-03, sous la responsabilité du laboratoire substances naturelles, pharmacologie modélisation environnement et qualité de vie et la manipulation des rats a été conformes aux directives standard internationale.

Pour développer un modèle animal du diabète, on avait recours aux travaux de Udumula et col.[339]. Pour cela, 77 rats Wistar mâles âgés de 5 à 6 semaines pesant 170 g, ils ont été répartis en 11 groupes de 7 rats chacun et qui ont été hébergés dans une pièce à température ambiante avec un cycle lumière-obscurité de 12 heures, ils ont été acclimatés pendant une semaine avec un accès libre à la nourriture. L'hyperglycémie a été induite en leur assurant un régime hypercalorique par apport du fructose à 10% pendant 2 semaines suivie par une injection intrapéritonéale unique de la STZ (AppliChem GmbH à Darmstadt, Allemagne) à une concentration de 35 mg/kg du poids corporel des rats à jeun depuis 12 heures. Des mesures de la glycémie ont été prise par le glucomètre chaque 3 jours à partir de la veine caudale jusqu'à obtention des taux de glycémie supérieurs à 2,88 g/l.

I.2.5.2 Protocole du traitement

En se référant à l'étude de Zhi Liu et col.[340]. Les formulations d'extrait de de la propolis et des feuille d'*Olea Europaea* générées par le plan d'expériences. A une dose de 500 mg/kg chacune ont été administrés au groupe de rats diabétiques quotidiennement par voie orale (gavage à l'aide d'une sonde oro-gastrique) pendant 3 semaines selon le tableau 10, ces expériences ont été comparé au groupe diabétique (Gmet) traité par la metformine et à un groupe témoin diabétique non traité (GT), Les rats ont reçus leurs régimes respectifs jusqu'à la fin de l'expérience et au bout de la 6^{ème} semaines ont été pesés et sacrifiés par exsanguination 24 heures après la dernière dose du traitement et leur sang a été récupéré dans des tubes de prélèvement spécifiques puis centrifugé à 3500 TPM pendant 10 min et le plasma a été recueilli et conservé à -20°C pour analyses ultérieures des marqueurs biochimiques du DT2.

Tableau 9 : Groupes expérimentaux des rats utilisés pour le DT2

Groupe (n= 5 rats)	EEPM en ml 500mg/kg	EPFO en ml 500mg/kg	GBL en ml 140 mg/kg	Eau de boisson en ml
Groupe 1	4	0	-	-
Groupe 2	0	4	-	-
Groupe 3	2	2	-	-
Groupe4	2	2	--	-
Groupe 5	2	2		-
Groupe 6	1	3	-	-
Groupe 7	3	1	-	-
Groupe 8	1,33	2,67	-	-
Groupe 9	2,67	1,33	-	-
Groupe Met	-	-	4	-
Groupe témoin	-	-	-	4

I.2.6 Applications des plans d'expériences

I.2.6.1 Optimisation d'extraction assistée par ultrasons de la propolis : BBD

La méthodologie de surface de réponse est une technique statistique avancée et multivariée qui implique des calculs complexes pour le processus d'optimisation [341], [342]. Cette approche développe un plan expérimental approprié combinant toutes les variables indépendantes et utilise les données de l'expérience pour générer un ensemble d'équations permettant de prédire théoriquement un résultat. Les résultats sont obtenus à partir d'une analyse de régression bien conçue basée sur les valeurs contrôlées des variables indépendantes [343].

Dans cette étude, un plan Box-Behnken (BBD) à trois facteurs et trois niveaux a été adopté, avec un total de 15 expériences pour évaluer l'impact des variables indépendantes, notamment le temps de sonication (X_1 en minutes), le rapport solvant/propolis (X_2 en mL/g), et la concentration en éthanol (% v/v) (X_3), tandis que les réponses étudiées incluaient le rendement d'extraction assisté par sonicateur, le TPC, le TFC, le DPPH-IC₅₀, et le FRAP-EC₅₀. Les essais ont été menés selon les conditions expérimentales détaillées dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Conditions expérimentales des essais du plan Box-Behnken.

Exp N°	Temps de sonication (min)	Ratio Solvant/Propolis (ml/g)	Ethanol (%)
1	15	10	60
2	45	10	60
3	15	30	60
4	45	30	60
5	15	20	40
6	45	20	40
7	15	20	80
8	45	20	80
9	30	10	40
10	30	30	40
11	30	10	80
12	30	30	80
13	30	20	60
14	30	20	60
15	30	20	60

Dans cette étude, un plan BBD à trois facteurs et trois niveaux a été adopté, avec un total de 15 expériences pour évaluer l'impact des variables indépendantes (Tableau 12), notamment le temps de sonication (X_1 en minutes), le rapport solvant/propolis (X_2 en ml/g), et la

concentration en éthanol X_3 en % v/v). Tandis que les réponses étudiées incluaient le rendement d'extraction assistée par ultrason, la TPC, la TFC, la DPPH-IC₅₀, et la FRAP-EC₅₀. Les essais ont été menés selon les conditions expérimentales suivantes :

Tableau 11 : Niveaux réels et codés des variables indépendantes utilisées pour le BBD

Variables Indépendants	Code	Niveaux des variables			Unité
		-1	0	1	
Temps de sonication	X_1	15	30	45	min
Ratio Solvant/Propolis	X_2	10	20	30	ml/g
Concentration Ethanol	X_3	40	60	80	%

▪ Modèle mathématique

Pour prédire les conditions optimales d'extraction assistée par ultrasons pour les réponses étudiées de la propolis marocaine et pour exprimer l'interaction entre les facteurs dépendants et indépendants, la conception BBD a supposé que les interactions les unes avec les autres sont mesurées à l'aide d'un modèle polynomial du second ordre comme ci-dessous [344] .

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + \varepsilon \quad \text{Eq 20}$$

Où Y représente la valeur de réponse prévue ; X_1 , X_2 , X_3 sont les variables indépendantes ; b_0 représente la valeur moyenne théorique de la réponse lorsque tous les facteurs sont au niveau 0 ; b_1 , b_2 , b_3 sont des coefficients de régression linéaire ; b_{11} , b_{22} , b_{33} sont des coefficients de régression quadratique ; b_{12} , b_{13} , b_{23} sont des coefficients de régression d'interaction ; et ε : est le terme d'erreur de régression.

1.2.6.2 Plan de mélange ternaire miel /propolis /pollen d'abeille : Plan centré augmenté

Le plan expérimental est une expérience dans laquelle les réponses sont supposées dépendre des proportions relatives des ingrédients du mélange et non de la quantité totale du mélange Cette méthodologie a été utilisée pour déterminer la formulation optimale tout en minimisant le nombre d'expériences. Ainsi, elle permet de déterminer la relation entre les variables et les réponses expérimentales mesurées

Dans cette étude, un plan centré augmenté a été utilisé pour déterminer les proportions optimales des constituants pour la formulation permettant la meilleure combinaison à base du miel, la propolis et le pollen d'abeille assurant les meilleurs effets antioxydants et

PARTIE EXPERIMENTALE

antimicrobiens illustrés respectivement par une teneur élevée TPC et un faible DPPH-IC₅₀ et les CMI's contre les souches testées.

Les résultats expérimentaux du plan choisi décrivant la relation entre les réponses et les facteurs considérés ont permis de construire un modèle polynomial. Ce modèle a été interprété graphiquement, en traçant des contours 2D et 3D et en appliquant statistiquement l'ANOVA. Trois facteurs ont été considérés (Figure 65), à condition que la somme de leurs proportions soit égale à 1 (Tableau 15) avec X₁ : **EEMM** : Extrait éthanolique de miel, X₂ : **EEPM** Extrait éthanolique de la propolis) et X₃ : **EEPAM** : Extrait éthanolique du pollen

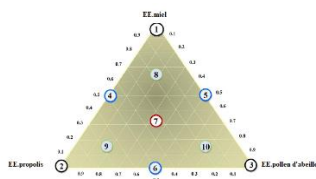


Figure 45 : Schéma du plan augmenté centré

Tableau 12 : Variables codées et niveaux des facteurs choisis

Composants	Variables codées	Niveau -	Niveau +
EEMM	X ₁	0	1
EEPM	X ₂	0	1
EEPAM	X ₃	0	1
Somme des proportions			1

Tableau 13 : Matrice expérimentale du plan de mélange ternaire miel-propolis-pollen d'abeille

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	Réponses			
				TPC	DPPH-IC ₅₀	CMI _{S.aureus}	CMI _{E.coli}
1	1	0	0				
2	0	1	0				
3	0	0	1				
4	0,5	0,5	0				
5	0,5	0	0,5				
6	0	0,5	0,5				
7	0,33	0,33	0,33				
8	0,33	0,33	0,33				
9	0,33	0,33	0,33				
10	0,66	0,16	0,16				
11	0,16	0,66	0,16				
12	0,16	0,16	0,66				

▪ Modèle mathématique

Les réponses étaient l'activité antioxydante déterminée par la TPC, DPPH-IC₅₀ et l'effet antibactérien quantifié par les CMI des mélanges des produits de la ruche suggérés par le plan de mélange choisi. Ensuite, les données ont été associées à un modèle polynomial spécial cubique utilisant la régression des moindres carrés pour estimer les coefficients inconnus dans l'équation suivante :

$$Y = \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_{12} + \alpha_{13} X_{13} + \alpha_{23} X_{23} + \alpha_{123} X_1 X_2 X_3 + \varepsilon \quad \text{Eq 21}$$

Où Y sont des réponses : TPC, DPPH-IC₅₀ et les CMI *S.aureus* et CMI *E. coli*

$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ sont des coefficients de termes linéaires;

$\alpha_{12}, \alpha_{13}, \alpha_{23}$: les coefficients de termes binaires;

α_{123} : Le coefficient de terme ternaire

ε est un terme d'erreur .

I.2.6.3 Plan de mélange binaire des extraits propolis et feuille d'*Olea Europaea*. : Plan Simplex Lattice

Pour optimiser l'efficacité de la combinaison binaire de l'extrait de propolis (EMPM) et des feuilles d'*Olea Europaea* (EMFOE), pour le traitement du DT2 induit chez le rat, une étude visant à évaluer les variations en pourcentage des marqueurs du diabète concernant la glycémie, l'insulinémie, HOMA-IR, HBA₁C et le poids corporel des rats a été entreprise. Cette approche a permis de déterminer les combinaisons optimales de ces deux composants en minimisant le nombre d'expériences nécessaires sous les conditions expérimentales dont le contenu de chaque composante était compris entre 0 et 1 et leur somme égale à 1 (Tableau 15) [345] .

Tableau 14 : Composants et facteurs du plan expérimental choisi

Constituant	Niveau - (%)	Niveau + (%)	Variables codées	Niveau -	Niveau +
EMPM	0	100	X ₁	0	1
EMFOE	0	100	X ₂	0	1
Somme des proportions	100 (%)			1	

L'objectif était d'obtenir des taux optimaux des taux de changements des marqueurs biochimiques du DT2 avec un minimum d'expériences. Pour ce faire, une étude de formulation optimale a été réalisée en utilisant un plan en réseau appelé *Simplex Lattice design* à deux facteurs. Cette matrice expérimentale est décrite par 2 expériences, chacune impliquant un composant pur (expériences 1 et 2), une expérience équilibrée de 0,5/0,5 (expérience 3),

répétition de l'expérience 3 pour évaluer la cohérence du modèle, 2 points axiaux, notés expériences 6 et 7 et les expériences 8 et 9 formulées par proportions de 0,67/0,33 de l'EMPM et EMFOE (Tableau 16).

Tableau 15 : Matrice expérimentale des résultats obtenu pour les réponses étudiées

EX P	EMPM	EMFOE	Taux de changement en %				
			Glycémie	Insulinémie	HOMA-IR	HbA _{1c}	Poids corporel
1	1	0	63±2,32 ^a	52±2,78 ^a	42±1,77 ^a	14±0,34 ^a	18±0,08 ^a
2	0	1	66±2,60 ^a	62±2,35 ^a	46±2,02 ^a	29±0,93 ^a	17±0,02 ^a
3	0,5	0,5	68±2,91 ^a	145±6,32 ^{ab}	32±1,02 ^a	23±0,91 ^{ab}	21±0,09 ^{bc}
4	0,5	0,5	70±4,82 ^b	159±7,72 ^{bcd}	30±1,09 ^a	24±0,90 ^{bc}	19±0,08 ^{bc}
5	0,5	0,5	70±2,37 ^{bc}	142±6,16 ^{ab}	29±1,12 ^{bc}	21±0,89 ^{bc}	18±0,12 ^a
6	0,25	0,75	65±3,17 ^{bcd}	47±2,91 ^{bc}	48±2,0 ^{bc}	20±0,99 ^{bc}	17±0,11 ^a
7	0,75	0,25	45±2,32 ^b	66±3,30 ^{bc}	41±1,98 ^{ab}	10±0,96 ^{bc}	27±0,12 ^a
8	0,67	0,33	55±2,54 ^{bc}	130±5,31 ^{abc}	32±0,99 ^{bcd}	16±0,91 ^a	26±0,10 ^a
9	0,33	0,67	65±3,32 ^{bc}	70±5,90 ^{bcd}	43±1,32 ^{bc}	24±0,92 ^a	15±0,07 ^{bcd}

Le modèle mathématique postulé à cette matrice était un modèle quartique :

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \delta X_1 X_2 (X_1 - X_2) + \gamma X_1 X_2 (X_1 - X_2)^2 + \varepsilon \quad \text{Eq 22}$$

Avec : Y est la réponse. β_1 , β_2 , sont les coefficients des termes linéaires.

β_{12} , δ , et γ sont les coefficients des termes d'interaction. ε : Le terme d'erreur .

I.2.4.7 Détermination des marqueurs s biochimiques :

I.2.4.7.1 Détermination de la glycémie :

Le sang est prélevé à partir de la veine caudale des rats de chaque groupe et la glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre à bandelettes réactives et les teneurs en glucose moyennes finales de chaque groupe ont été calculées. Les résultats sont exprimés en g/l.

I.2.4.7.2 Dosage de l'insulinémie :

A la fin du protocole après scarification des rats, du sang total été récupéré dans des tubes contenant et l'héparine de lithium qui va être centrifuger 3000 TPM pendant 5 min pour récupérer le plasma. L'insulinémie a été quantifiée à l'aide d'un dosage immunologique en une seule étape, permettant la détection de l'insuline humaine dans le sérum ou le plasma humain par le biais de la technologie d'immunoanalyse par microparticules chimiluminescence.

Dans cette méthode, l'insuline présente dans l'échantillon se lie aux microparticules paramagnétiques revêtues d'anti-insuline, puis les conjugués d'anti-insuline marqués à l'acridinium sont ajoutés. Après un processus de lavage, des solutions de pré-déclenchement et de déclenchement sont intégrées au mélange réactionnel. La réaction chimiluminescence qui en

résulte est mesurée en unités de lumière relative (ULR). Une relation linéaire existe entre la quantité d'insuline présente dans l'échantillon et les unités de lumière relative détectées [346].

I.2.4.7.3 Détermination de l'hémoglobine glyquée : HbA_{1c}

La mesure de l'hémoglobine glyquée a été effectuée par analyse HPLC BioRAD D10. Les échantillons ont été directement chargés dans l'instrument, après qu'ils ont été automatiquement dilués et injectés dans la cartouche analytique. Ensuite, un gradient de tampon programmé de force ionique croissante a été délivré à la cartouche. L'hémoglobine est séparée en fonction de ses interactions ioniques avec la cartouche. L'hémoglobine éluée traverse une cellule d'écoulement où son absorbance à 415 nm est enregistrée [347].

I.2.4.7.4 Détermination de l'indice HOMA-IR :

Modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline ou HOMA-I est un test utile pour l'évaluation de la sensibilité à l'insuline, [434]

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Insulinémie (mU/l)} \times \text{Glycémie (mmol /l)}] / 22,5 \quad \text{Eq 22}$$

I.2.4.7.5 Variation du poids corporel des rats.

Les variations en pourcentage ont été calculées en comparant le poids moyen de chaque groupe et le poids du groupe témoins.

I.2.8 Outils d'optimisation

Les logiciels **JMP V14** et **Design EXPERT V.13** ont été utilisés pour analyser les données expérimentales à travers l'étude de l'influence des variables indépendantes sur les facteurs de réponse [349]. Le logiciel a été utilisé pour générer des surfaces de réponse et des tracés de contour selon le plan de Box-Behnken, tout en maintenant une variable constante dans le modèle polynomial quadratique du second ordre. Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ écart type (ET).

I.2.9 Analyse statistique

La comparaison des moyennes a été réalisée par ANOVA et le test de comparaison multiple de Tuckey. Le principal effet de la régression a été considéré comme statistiquement significatif pour les valeurs de p inférieures à 0,05. De cette manière, le rapport entre la régression quadratique moyenne (**MS_R**) et le résidu carré moyen (**MS_r**) et le rapport $F_{R/r}$ a été utilisé pour établir si le modèle était statistiquement significatif. De plus, le rapport entre le manque d'ajustement carré moyen (**MS_{LOF}**) et l'erreur quadratique moyenne pure (**MSPE**) et le rapport $F_{LOF/PE}$ a été utilisé pour évaluer si le modèle était bien ajusté aux observations.

Le coefficient de détermination $\mathbf{R^2}$ a été utilisé pour évaluer l'adéquation du modèle postulé [350] .

Etude I

Caractérisation physicochimique de la propolis Marocaine issue de la région Fès Meknès et évaluation de ses activités antioxydante et antifongique



Veterinary World

— Open access and peer reviewed journal —

ISSN (Online): 2231-0916
ISSN (Print): 0972-8988

Home

Veterinary World, EISSN: 2231-0916

Available at www.veterinaryworld.org/Vol.15/February-2022/14.pdf

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of the antioxidant and anticandidal activities of Moroccan propolis

Abderrazak Aboulghazi¹, Soumaya Touzani², Mouhcine Fadil² and Badiia Lyoussi²

1. Department of Biology, Laboratory of Natural Substances, Pharmacology, Environment, Modeling, Health, and Quality of Life (SNAMOPEQ), Faculty of Sciences Dhar Mehraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez 30000, Morocco; 2. Physicochemical Laboratory of Inorganic and Organic Materials, Materials Science Center, Mohammed V University in Rabat, Morocco.

Corresponding author: Badiia Lyoussi, e-mail: lyoussi@gmail.com

Co-authors: AA: abdouaboughazi1@gmail.com, ST: touzani.soumaya@gmail.com, MF: fadil.mouhcine@gmail.com

Received: 23-08-2021, Accepted: 13-01-2022, Published online: 15-02-2022

doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2022.341-349 How to cite this article: Aboulghazi A, Touzani S, Fadil M, Lyoussi B (2022) Physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of the antioxidant and anticandidal activities of Moroccan propolis, *Veterinary World*, 15(2): 341-349.

Abstract

Background and Aim: Human mycotic infections are one of the major health problems worldwide. Prolonged use of antimycotic drugs has contributed to the development of resistance in pathogenic fungi. This study was conducted to examine antioxidant and anticandidal activities of Moroccan propolis.

Materials and Methods: Two ethanolic extracts of Moroccan propolis from the Fez-Meknes region were evaluated regarding the following physicochemical parameters: Yield, pH, total carbohydrates, total proteins, total lipids, minerals, total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity using ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays. In addition, we assessed the *in vitro* anticandidal activity against vulvovaginal candidiasis strains, that is, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida krusei*, using the broth microdilution according to the CLSI/M27-A3 reference guidelines.

Results: The propolis samples exhibited a mean yield of 16%, with an acidic pH ranging from 4.8 to 5.9; the sample from the Oued Amlil area (OAPEE) contained high levels of resin, balsam, moisture, total carbohydrates, and total lipids: 59.8%, 0.71%, 2%, 1.01 gGlcEq/g, and 120 mg/g, respectively. Moreover, the sample from the Sefrou area (SFPEE) was richer in total proteins and minerals, with values of 2.5 g/100 g and 1.84%, respectively. The total polyphenol and flavonoid content in the propolis extracts were 117.38 and 194.68 mg of gallic acid equivalent/g, and 17.45–27.79 mg of quercetin equivalent/g, respectively. Regarding the antioxidant activity, the most effective propolis extract was the sample from the Sefrou area, at 72.5 µg/mL and 118.78 µmol Fe²⁺/g for ABTS-half-maximal inhibitory concentration and FRAP-half maximal effective concentration, respectively. The analysis of phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with a diode-array detector revealed the presence of 13 polyphenols. The main compound in the OAPEE sample was epicatechin (310 mg/g), whereas in the SFPEE sample was apigenin (410 mg/g). Regarding the antifungal activity against *Candida* species, the minimum inhibitory concentration and minimum fungicidal concentration of the Moroccan propolis ethanolic extracts ranged between 31.2 and 62.5 µg/mL and 62.5 and 125 µg/mL, respectively, comparable with fluconazole (as a reference antimycotic).

Conclusion: This study suggests that Moroccan propolis (31.2 and 125 µg/mL) may be an important source of bioactive molecules with anticandidal activity. Propolis may be a promising naturally-occurring candidate for the development of antimycotic drugs.

Keywords: antioxidant activity, propolis, total flavonoids, total polyphenols, vulvovaginal candidiasis.

Résumé

Les infections mycosiques sont effectivement très répandues chez les femmes, et *le Candida albicans* est souvent en cause. Cependant, d'autres espèces de *Candida* peuvent également provoquer des infections, ce qui rend le traitement plus complexe [351]. La résistance aux antifongiques devient un problème croissant, limitant les options thérapeutiques [352]. Pour pallier ces difficultés, cette étude exploite la propolis, ce produit de la ruche riche en molécules bioactives dotées de propriétés antimicrobiennes notables[353]. Cependant une caractérisation physicochimique de deux types de la propolis locale issue de la région de Fès Meknès a été réalisé, ainsi que leur activité antifongique contre différentes souches de fongiques a été évaluée.

Enfin cette étude vise à valoriser la propolis locale et à évaluer son potentiel en tant qu'agent antifongique contre différentes souches de *Candida*, offrant ainsi une alternative possible aux traitements existants pour les infections mycosiques.

Résumé graphique

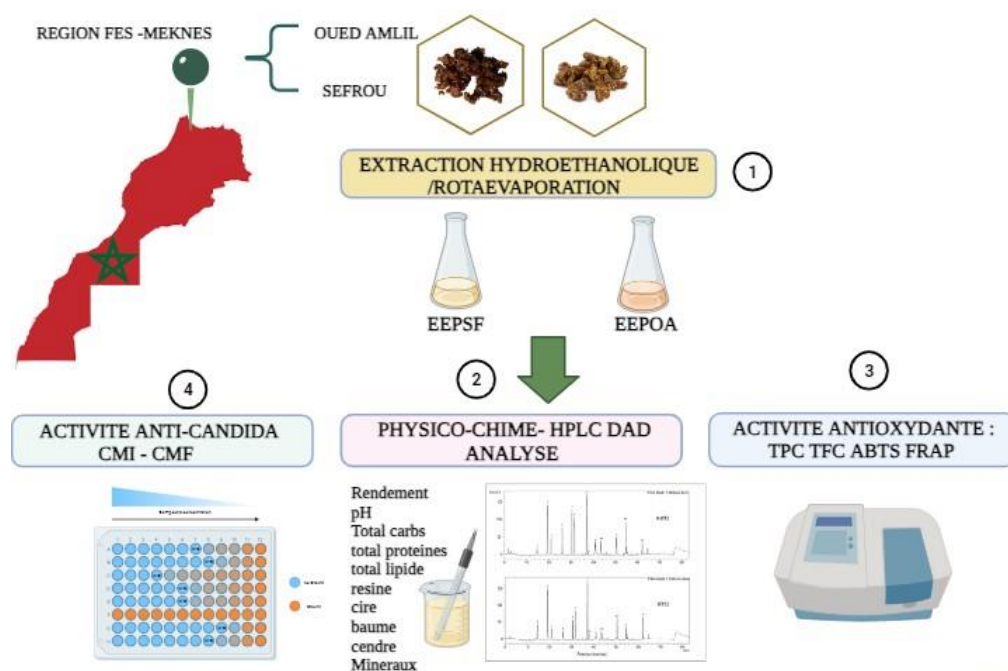


Figure 46 : Résumé graphique de la caractérisation physicochimique de la propolis Marocaine de la région Fès Meknès et évaluation de ses activités antioxydante et antifongique

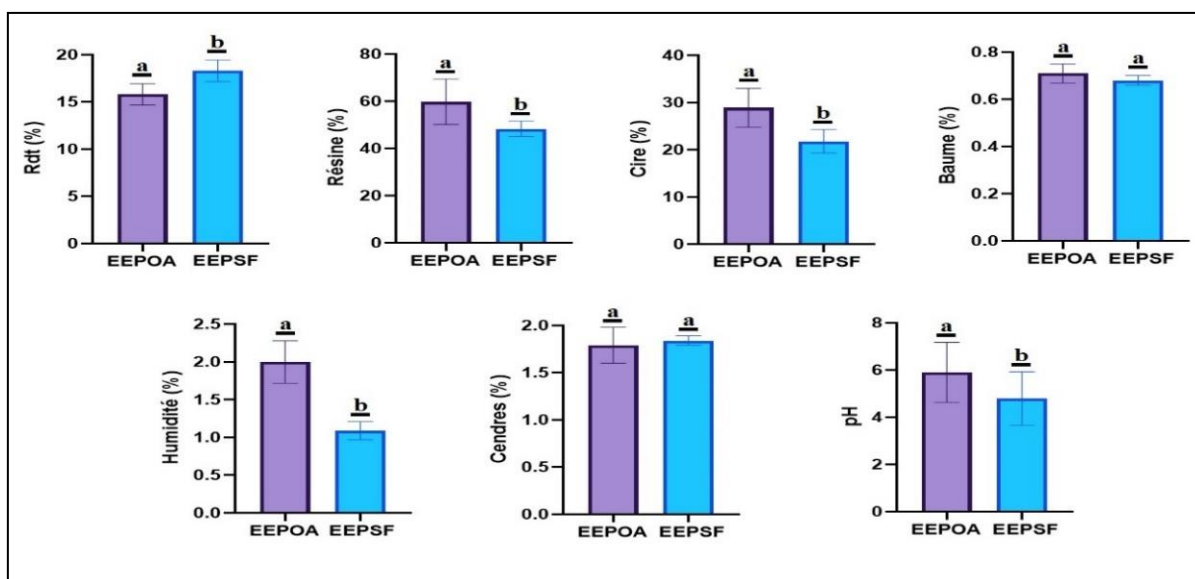
I.1 Résultats et discussions

II.1.1 Caractérisation physico-chimique des propolis

Les résultats obtenus ont révélé une différence significative du rendement d'extraction entre EEPSF à et celui de EEPOA avec des taux de 18,3% et 15,8% respectivement (figure 67). Ainsi qu'une acidité notable avec des valeurs de pH respectives de 4,8 et 5,9. Ces résultats étaient comparables à ceux observés pour la propolis Indonésienne, qui présentait un rendement de 18,3% et un pH de 5,4 [354] .

En règle générale, la propolis se compose d'environ 50% de résine et 30% de cire [438]. Nos résultats ont démontré que les teneurs en résine et en cire des échantillons étudiées étaient conformes aux normes, avec des valeurs significativement importantes pour l'EEPOA. Ce dernier a démontré des taux élevés en humidité et en baume que celui de Séfrou présentant des valeurs de 2,00% et 1,09% ; et 0,71% et 0,68% respectivement. On note que la teneur élevée en humidité peut indiquer des conditions de stockage et de conservation défavorables ainsi qu'une prolifération microbienne [356] . Ces résultats se situent dans les fourchettes des valeurs rapportées par des études antérieures pour la propolis du Maroc et d'autres pays [357], [358], [359].

La teneur totale en cendres reflète principalement la pureté du produit de la ruche ainsi que la possible présence de résidus ou de falsifications [108] , le résultat obtenu a été de 1,79% pour l'EEPOA et de 1,84% pour l'EEPSF. Ces valeurs respectent les normes de qualité qui imposent un seuil maximal de 5% [360]



. **Figure 47** : Graphes paramètres physicochimiques des extraits des propolis étudiées.

*EEPOA=Extrait éthanolique de la propolis d'Oued Amlil, EEPSF=Extrait éthanolique de la propolis de Séfrou, les graphes avec mêmes lettres ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$)

II.1.2 Dosage des Métabolites primaires et minéraux

Les teneurs totales en glucides étaient relativement égales dans les deux échantillons de la propolis avec des valeurs de 1,01 et 0,98 mgGlcEq/g pour l'EEPOA et l'EEPSF respectivement (figure 68) ce qui représente une moyenne de 10% de glucides. Ces résultats étaient similaires à ceux obtenue pour la propolis issue de différentes régions du Maroc [361]. En revanche, la teneur en protéines totales était significativement plus élevée dans l'EEPOA que l'EEPSF avec des valeurs qui varient de 0,99 % à 2,5%. Ces résultats confèrent une bonne qualité aux échantillons de la propolis vue que la norme de celle-ci est supérieure à 0,7% selon Bogdanov et al.[362] . Tandis que la teneur en lipides totaux obtenues pour les deux échantillons varie de 108 à 120 mg/g équivalent à 10,8% à 12%. Ces valeurs se sont avérées inférieures aux valeurs obtenues pour la propolis rouge (65,74 %) originaire du Brésil [363]. Ceci peut être expliquer par l'origine botanique, la race d'abeille, les conditions climatiques et la méthode d'extraction utilisée [364].

Compte tenu des minéraux qui font partie des micronutriments essentiels présents dans la propolis et peuvent contribuer aux propriétés pharmacologiques de ce produit de la ruche [365] , une teneur élevée en minéraux (sodium, potassium, calcium et magnésium) a été observée dans l'échantillon de la région de Séfrou par rapport à celui de la région d'Oued amlil. Ces résultats étaient différents à ceux retrouvés pour la propolis de la Malaisie et la Turquie [366], [367] . De ce fait, les valeurs des macromolécules et micromolécules de la propolis sont influencées par l'origine botanique, la race d'abeille, des conditions climatiques, type de récolte et des méthodes d'extraction [108], [368], [369].

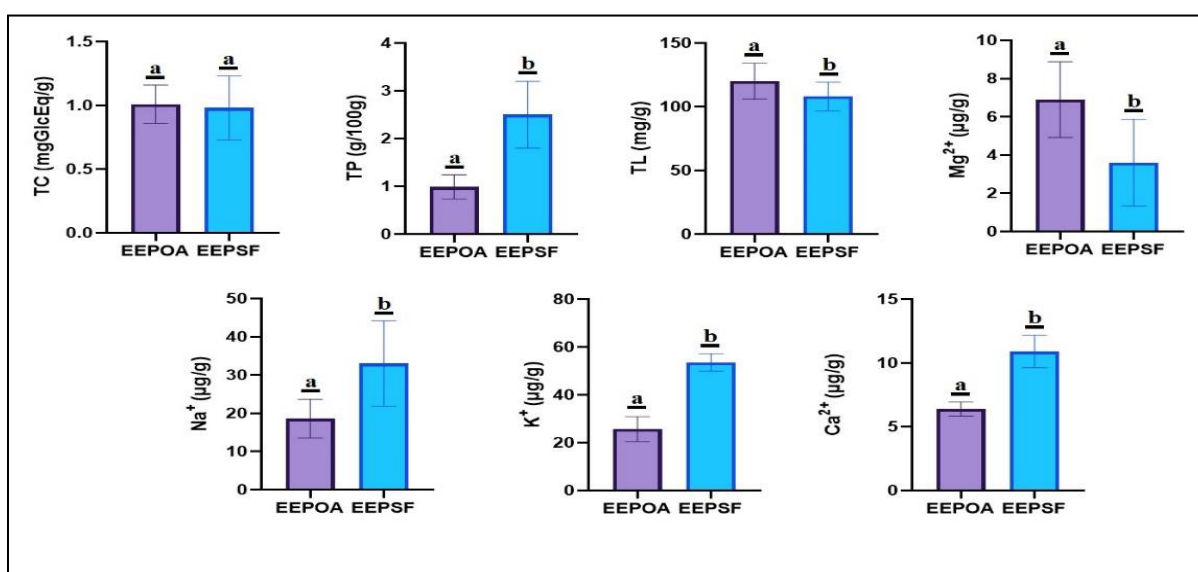


Figure 48 : Teneur en métabolites primaires et minéraux des propolis étudiées.(les graphes avec mêmes lettres ne sont pas significativement différents $p < 0,05$)

II.1.3 Dosage des métabolites secondaires et évaluation de l'activité antioxydante

II.1.3.1 Dosages des TPC et TFC

En accord avec nos résultats (figure 69), la TPC de l'EEPSF était notablement plus élevée avec une teneur de $194,68 \pm 2,07$ mgAGE/g MS par rapport à celle de l'EEPOA qui a démontré $117,38 \pm 1,8$ mgAGE/g MS. Ces observations ont été cohérentes avec les données obtenues pour la propolis provenant de différents pays les teneurs variaient entre 19,51 et 219,66 mgAGE/g MS [370], [371]. Mais ces valeurs étaient considérablement supérieures à celles enregistrées pour la propolis Tunisienne, oscillant entre 17,34 et 33,4 mgAGE/g MS [372]. Concernant les TFC (figures 68), les extraits des propolis étudiées présentaient des concentrations de $17,45 \pm 1,06$ mgQE/g MS pour l'EEPOA et de $24,79 \pm 0,78$ mgQE/g MS pour l'EEPSF. Ces résultats étaient similaires à ceux observés pour la propolis de Corée du Sud, où les valeurs variaient de 21 à 50 mgQE/g MS [373] et inférieures à celles obtenues pour la propolis Mexicaine (13 à 379 mgQE/g) et Turquie (522,71 mg QE/g) [374], [375]. En revanche, ces concentrations étaient supérieures à celles rapportées pour la propolis d'Algérie (0,57-3,53 mgQE/g MS) [376]. Ces variations des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes confirment l'effet de la provenance de l'échantillon, la zone d'échantillonnage et la flore environnante de la ruche. Ainsi, la diversité et la composition chimique de cette flore avaient un impact direct sur la concentration des composés bioactifs de ce produit de la ruche [377].

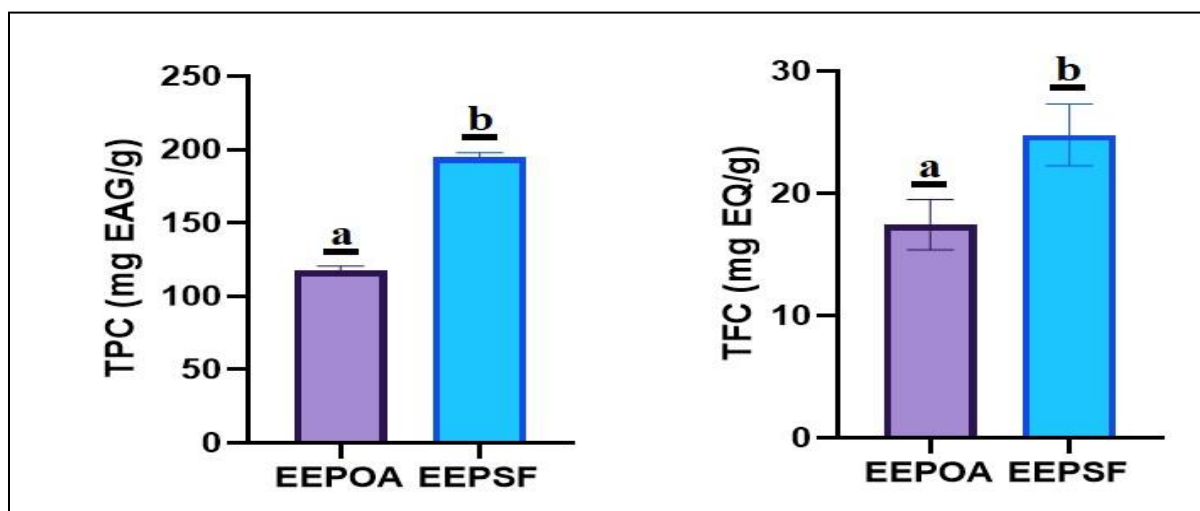


Figure 49 : Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits des propolis étudiées
les graphes avec mêmes lettres ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$)

II.1.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Les tests ABTS et FRAP ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante des propolis, l'activité antioxydante de leurs extraits éthanoliques s'est révélée remarquable, bien que des variations significatives aient été observées. Selon le test FRAP, les concentrations efficaces pour inhiber 50% du radical ferreux étaient plus au moins similaires au standard avec des valeurs de $100,57 \pm 2,13$, $118,78 \pm 4,27$ et $93,09 \pm 4,26$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ pour l'EEPOA, l'EPPSF et la quercétine respectivement. En revanche, les valeurs IC_{50} du radical ABTS ont indiqué que l'EPPSF était plus importante avec une valeur de $72,50 \pm 0,42$ $\mu\text{g/ml}$ que celle obtenue pour l'EEPOA de $115,5 \pm 0,67$ $\mu\text{g/ml}$. Tandis que l'acide ascorbique avait une IC_{50} de $28,6$ $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont concordants avec des constatations similaires pour la propolis d'Afrique et d'Asie [378] et dépassent celles relevés pour la propolis Grecque [379].

Ces variations des valeurs de TPC, TFC et de l'activité antioxydante peuvent être attribuées aux origines botaniques et géographiques de la propolis, des espèces d'abeilles, à l'année de récolte et aux variations saisonnières ainsi que les conditions expérimentales utilisées pour évaluer l'activité antioxydante et aussi bien les conditions d'extraction. On note que différentes méthodes de mesure de l'activité antioxydante peuvent donner des résultats variés en raison de leurs principes sous-jacents et de leur sensibilité à différents types de radicaux libres [380], [381], [382], [383]

Ces résultats soulignent l'importance de considérer divers facteurs lors de l'analyse de la composition de la propolis, et qui peuvent fournir des informations sur la variabilité naturelle des composés bioactifs de ce produit de la ruche, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques. Certains composés peuvent avoir une forte activité antioxydante en raison de leur capacité à neutraliser efficacement les radicaux libres [384]

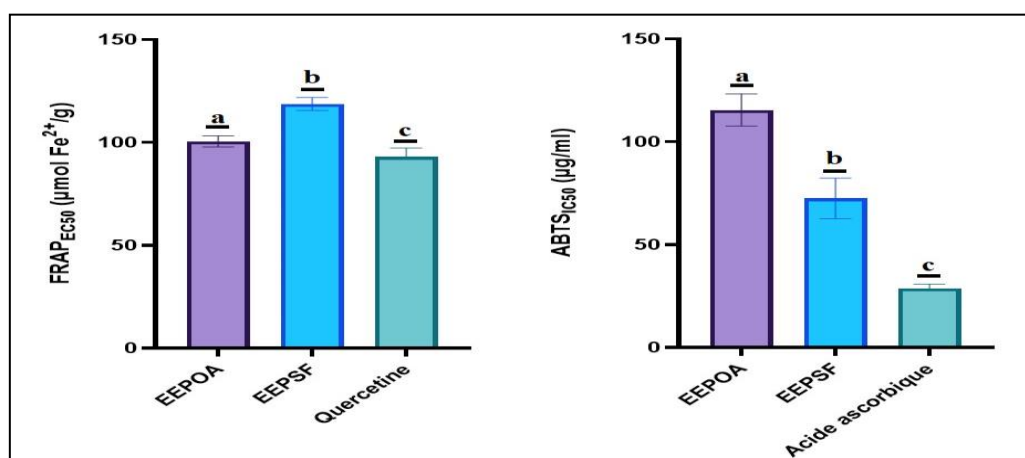


Figure 50 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des propolis étudiées. les graphes avec mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$)

II.1.4 Screening phénolique par HPLC-DAD

La détermination des composés phénoliques dans les échantillons de propolis a révélé la présence de 13 composés, dont les composés majoritaires pour l'EEPOA et l'EPPSF étaient respectivement l'épicatéchine et l'apigénine avec des concentrations de $310 \pm 28,3$ et $410 \pm 21,20$ mg/g successivement. Tandis que l'acide gallique et l'acide chlorogénique n'étaient pas détectés dans ces deux extraits de la propolis (Tableau 17). La standardisation de la propolis par l'analyse du screening phénolique émerge comme une approche intéressante pour garantir la qualité et la cohérence de ce produit de la ruche. Par exemple, Özkök et ses collaborateurs ont identifié des composés phénoliques spécifiques, tels que l'acide caféique, l'ester phénylique de l'acide caféique, la galangine et la pinocembrine, comme des marqueurs propres à la propolis turque [385]. Ces composés pourraient servir de référence pour évaluer l'authenticité et l'origine de la propolis Turque. De manière similaire, la propolis Polonaise se caractérise par la présence d'acide coumarique et des dérivés tels que le 2-acétyl-1,3-di-p-le coumarylglycérol, et de p-l'ester benzylique de l'acide coumarique ainsi que la galangine et la cirysine comme principaux polyphénols [386]. En effet la propolis Italienne se distingue par une concentration significative de pinocembrine en tant que flavonoïde majeur, accompagné des acides isoférulique, férulique et caféique en tant que principaux acides phénoliques [359].

L'utilisation de composés phénoliques spécifiques comme marqueurs de distinction offre non seulement une voie vers la standardisation de la propolis, mais elle permet également une meilleure compréhension de ses caractéristiques propres à chaque région. Cette approche peut être particulièrement bénéfique dans le contexte de la certification, de la commercialisation et de l'utilisation médicinale de la propolis.

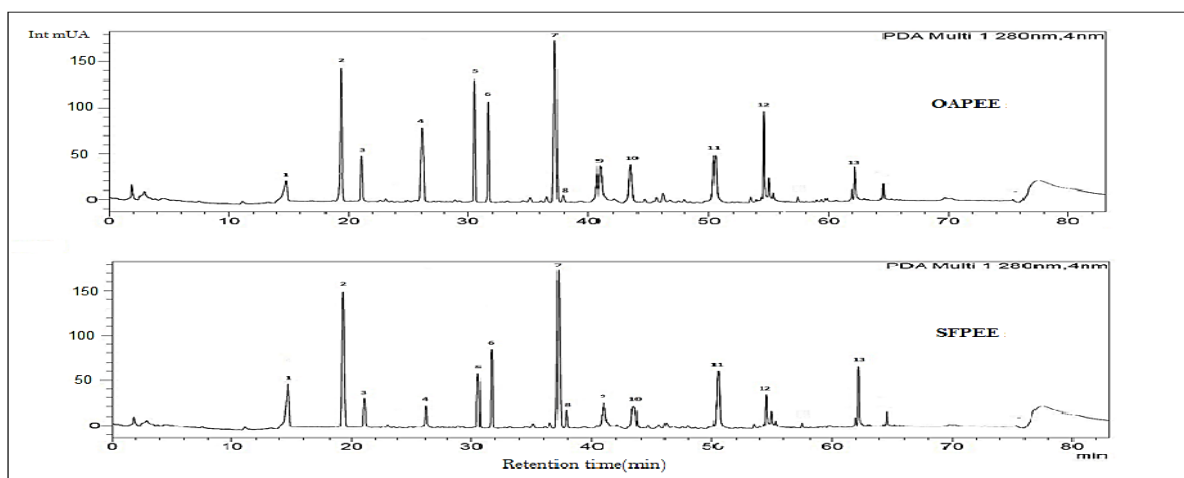


Figure 51 : Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits des propolis étudiées

Tableau 16 : Concentrations des composés phénoliques dans l'EEPOA et EEPsf.

Acides phénoliques /Flavonoïdes	Propolis	
	EEPOA (mg/g)	EEPSF (mg/g)
Acide vanilique	3,00±0,70 ⁿ	13,0±2,83 ^{mn}
Epicatechine	310±28,30 ^b	269±26,9 ^{bc}
Acide gallique	ND	ND
Acide coumarique	6,41±0,58 ^{mn}	16,0±4,24 ^{lmn}
Acide férulique	28,8±3,96 ^{ijklmn}	7,60±0,84 ^{mn}
Acide ellagique	98,0±4,24 ^{fgh}	56,0±7,07 ^h
Acide chlorogénique	ND	ND
Hespéridine	101±4,24 ^{fg}	145±9,90 ^{de}
Apigénine	245±21,20 ^c	410±21,20 ^a
Acide cinnamique	18,0±1,41 ^{klmn}	38,0±2,12 ^{ijklmn}
Acide rosmarinique	47,0±2,83 ^{ijklm}	68,0±4,24 ^{fgh}
Rutine	35,9±2,69 ^{ijklmn}	60,0±2,64 ^{gh}
Naringine	68,0±4,24 ^{fgh}	99,0±2,83 ^{fg}
Quercétine	87,0±7,07 ^{fgh}	32,0±6,83 ^{ijklmn}
Kaempferol	107±11,07 ^{ef}	150±12,83 ^{de}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET de 2 répétitions. Dans la même colonne, les valeurs suivies de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

II.1.5 Evaluation de l'activité antifongique

L'activité anticandidosique de la propolis pourrait être attribuée à sa teneur en polyphénols, en particulier à l'effet de certains composés phénoliques, une étude réalisée par Quiroga et al. a révélé que la pinocembrine et la galangine isolées de la propolis d'Argentine étaient partiellement responsables de son effet fongicide [387]. En outre, des molécules bioactives telles que la vanilline, l'acide 4-coumarique et le ferulate de méthyle font partie des inhibiteurs de la formation de biofilms chez les micro-organismes et des hyphes chez les levures qui représentent un facteur important de virulence pour ces levures pathogènes [388].

Tableau 17 : Résultats de l'activité antifongique des extraits des propolis.

CMI : concentration minimale inhibitrice en µg/ml, CMF : concentration minimale fongicide en µg/ml, **FLZ**, Fluconazole, R= CMF/CMI

Propolis		Espèces fongiques			
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
EEPOA	CMI	62,5	62,5	62,5	31,2
	CMF	125	125	125	62,5
	R	2	2	2	2
EEPSF	CMI	62,5	62,5	62,5	31,2
	CMF	125	125	125	62,5
	R	2	2	2	2
FLZ	CMI	4,6	4,6	9,3	37,5
	CMF	9,3	9,3	18,7	75
	R	2	2	2	2

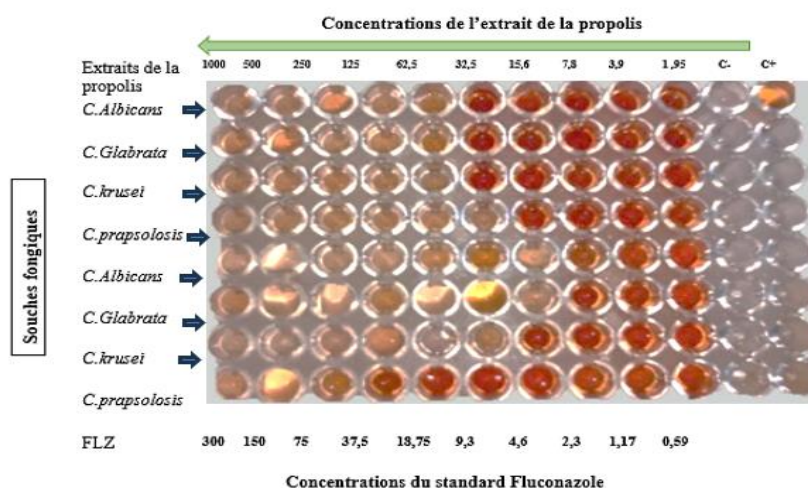


Figure 52 : Microplaques de l'activité antifongique des extraits de la propolis

Conclusion

Les échantillons de la propolis marocaine se distinguent par des propriétés physico-chimiques remarquables et une composition chimique abondante, notamment en minéraux, flavonoïdes et polyphénols appartenant à différents groupes chimiques : acides phénoliques (acide p-coumarique, acide férulique, acide ellagique, acide cinnamique, acide rosmarinique et acide chlorogénique), flavones (chrysrine et apigénine) flavanones (hespéridine et naringine), flavonols (galangine, kaempférol, quercétine et rutine) flavanols (catéchine). Ainsi qu'ils ont démontré un effet antifongique significatif envers les espèces fongiques étudiées. Cela fait de ce produit de ruche agent thérapeutique potentiel, susceptible d'être bénéfique dans la prise en charge des infections fongiques.

ETUDE II

Optimisation simultanée du rendement d'extraction, des composés phénoliques et de l'activité antioxydante des extraits de la propolis marocaine

Apport de l'ultrasonication et utilisation de la méthodologie de surface de réponse



processes



Article

Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology

Abderrazak Aboulghazi ¹, Meryem Bakour ¹ , Mouhcine Fadil ² and Badiia Lyoussi ^{1,*}

¹ Laboratory of Natural Substances, Pharmacology, Environment, Modeling, Health, and Life Quality, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez 30000, Morocco; Abderrazak.aboulghazi@usmba.ac.ma (A.A.); meryem.bakour@usmba.ac.ma (M.B.)

² Physico-Chemical Laboratory of Inorganic and Organic Materials, Materials Science Center, Ecole Normale Supérieure, Mohammed V University, Rabat 10210, Morocco; mouhcine.fadil@ens.um5.ac.ma

* Correspondence: lyoussi@gmail.com



Citation: Aboulghazi, A.; Bakour, M.; Fadil, M.; Lyoussi, B. Simultaneous Optimization of Extraction Yield, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Moroccan Propolis Extracts: Improvement of Ultrasound-Assisted Technique Using Response Surface Methodology. *Processes* **2022**, *10*, 297. <https://doi.org/10.3390/pr10020297>

Academic Editor: Francesca Blasi

Received: 4 January 2022

Accepted: 24 January 2022

Published: 25 January 2022

Abstract: Propolis has given rise to refreshing interest in recent years in the field of conventional medicine. Its extraction represents an important process that requires optimal conditions, which strongly affect the yield of extraction, total polyphenols, flavonoid content, and radical scavenging capacity markers. The objective of the present study was to optimize the ultrasound-assisted extraction conditions of Moroccan propolis. The studied responses were the extraction yield, total polyphenols, flavonoid contents (TPC, TFC), and antioxidant activity of the extract evaluated by DPPH-IC₅₀ and FRAP-EC₅₀ assays. The response surface methodology (RSM) and specifically the Box–Behnken design (BBD) were used, taking into account three variables: sonication time (min), solvent/propolis ratio (mL/g), and ethanol concentration (%). After the realization of experiments and data analysis, optimal response values were 15.39%, 192 mg GAE/g of propolis, 45.15 mg QE/g, 29.8 µg/mL, and 128.3 µmol Fe²⁺/g for extraction yield, TPC, TFC, DPPH-IC₅₀, and FRAP-EC₅₀, respectively. Besides, optimal ultrasound extraction conditions were 15 min for sonication time, 30 mL/g for solvent/propolis ratio, and 40% for ethanol concentration. All obtained experimental values were in good agreement with the predicted values, suggesting that using an experimental design in the ultrasound-assisted extraction process and optimization was prudently chosen.

Keywords: Moroccan propolis; Box–Behnken design; phenolics; antioxidant activity; ultrasound-assisted extraction

Résumé

Cette étude vise à optimiser les conditions d'extraction assistée par ultrasons de la propolis marocaine, en se concentrant sur le rendement d'extraction, les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux (TPC, TFC), ainsi que l'activité antioxydante évaluée par les tests DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀.

La méthodologie de surface de réponse en particulier le plan de BBD, a été employé, en prenant en considération trois variables : le temps de sonication (en minutes), le rapport solvant/propolis (en ml/g), et la concentration d'éthanol (en %). Après la réalisation des expériences et l'analyse des données, les valeurs optimales de réponse ont été déterminées, se situant à 15,39% pour le rendement d'extraction assistée par ultrasons, 192 mg AGE/g pour la TPC, 45,15 mg QEq/g pour la TFC, 29,8 µg/ml pour la DPPH-IC₅₀, et 128,3 µmol Fe²⁺/g pour la FRAP-EC₅₀.

Les conditions optimales d'extraction par ultrasons ont été identifiées comme suit : une durée de sonication de 15 min, un rapport solvant/propolis de 30 ml/g, et une concentration d'éthanol de 40 %. Toutes les valeurs expérimentales obtenues étaient en accord satisfaisant avec les valeurs prédites, suggérant que l'utilisation d'un plan expérimental dans le processus d'extraction assistée par ultrasons a permis d'obtenir des résultats fiables et l'approche d'optimisation avait une valeur ajoutée pour l'exploitation de la propolis.

Résumé graphique

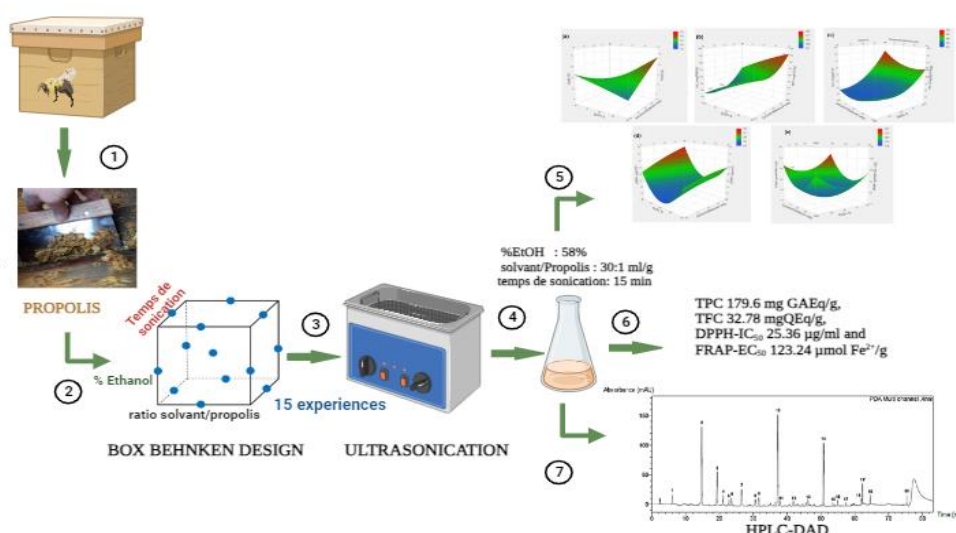


Figure 53 : Protocole expérimental de l'optimisation simultanée du rendement d'extraction par ultrasons, des composés phénoliques et de l'activité antioxydante des extraits de la propolis marocaine : apport de la méthodologie de surface de réponse

II.2 Résultats et discussions

Les résultats de l'application du protocole expérimental choisi représenté dans le tableau 19 , indiquant que le rendement d'extraction assistée par ultrasons , la TPC et la TFC varient respectivement de 6 % à 13,1 %, de 86,98 à 187,21 mg AGEq/g et de 9,7 à 38,8 mg QEq/g de la propolis brute, et les tests d'activité antioxydante DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀ varient respectivement de 21 à 39,15 µg/ml et de 100 à 130,21 µmol Fe²⁺/g. Ce résultat confirme l'influence des paramètres choisis sur toutes les réponses étudiées.

II.2.1 Validation statistique du modèle postulé

Les données expérimentales obtenues ont été analysées statistiquement par l'ANOVA et la signification des coefficients de régression a été évaluée par leurs valeurs *p* correspondantes. Les résultats du tableau 20 indiquent que les modèles ont été établis de manière significative en raison de la valeur de probabilité extrêmement significative ($p < 0,05$) pour toutes les réponses étudiées où les valeurs de *p* étaient de 0,001, 0,04, 0,0156, 0,0052 et 0,0370 pour le rendement d'extraction assistée par ultrasons, TPC, TFC, DPPH -IC₅₀ et FRAP-EC₅₀, respectivement.

Le rapport F (R/r) est calculé pour chaque réponse était supérieur à la valeur du rapport F (0,05 ; 9,5) à 95 % du niveau de confiance, qui est égal à 4,77. De plus, toutes les réponses montrent un manque d'ajustement en raison de leurs valeurs *p* supérieures à 0,05, et tous les rapports F calculés (LOF/PE) étaient inférieurs à la valeur F théorique (0,05 ; 3,2) du niveau de confiance à 95 %, qui était égale à 19,15.

Les coefficients de détermination R^2 étaient égaux à 98 %, 94,3 %, 93,7 % et 96 % pour le rendement d'extraction TPC, TFC, DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀, respectivement.

Ces valeurs reflètent une bonne relation entre les valeurs expérimentales et prédites. Ces résultats sont confirmés par les graphiques de la figure 74, démontrant une courbe linéaire pour les valeurs réelles par rapport à celles prédites

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 18 : Matrice de BBD et résultats pour le rendement d'extraction assistée par ultrason, TPC, TFC, DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀ de la propolis

Ex N°	T.S (min)	Ratio S/Ps (ml/g)	Et O H (%)	Rdt (%)	TPC (mgAGEq/g)	TFC (mgQEq/g)	DPPH-IC ₅₀ (µg/ml)	FRAP-EC ₅₀ (µmol Fe ²⁺ /g)
1	15	10	60	11,25±0,56 ^a	187,21±13,99 ^a	38,80±1,27 ^a	23,70±0,58 ^e	130,21±1,23 ^{abc}
2	45	10	60	13,1±0,17 ^a	147,10±14,03 ^{abc}	21,10±1,27 ^{cde}	21,00±0,46 ^e	126,98±2,26 ^{abc}
3	15	30	60	12,23±0,32 ^{ab}	184,98±8,20 ^a	34,20±4,20 ^{ab}	29,80±0,28 ^{cd}	134,00±1,27 ^{ab}
4	45	30	60	9,80±1,41 ^a	122,34±5,52 ^{bcd}	16,40±1,13 ^{def}	27,40±0,70 ^d	129,00±1,70 ^{abc}
5	15	20	40	12,80±1,41 ^a	164,00±7,07 ^{ab}	42,60±3,35 ^a	29,70±0,46 ^{cd}	122,80±3,25 ^{abc}
6	45	20	40	11,50±1,41 ^{ab}	154,4±20,6 ^{abc}	36,80±2,69 ^a	33,90±1,40 ^{cd}	113,35±4,60 ^{cde}
7	15	20	80	10,4±1,41 ^a	124,1±14,90 ^{bcd}	22,5±2,33 ^{cd}	30,06±0,76 ^{ab}	132,70±0,39 ^{ab}
8	45	20	80	11,8±1,41 ^a	128,3±12,7 ^{bcd}	18,78±1,32 ^{cdef}	30,50±1,56 ^{cd}	122,60±4,53 ^{abc}
9	30	10	40	8,50±1,41 ^{ab}	111,32±11,14 ^{cd}	34,72±3,42 ^{ab}	33,00±0,77 ^{abc}	128,01±12,8 ^{abc}
10	30	30	40	11,35±1,41 ^a	116,87±9,66 ^{bcd}	27,82±6,53 ^{bc}	34,80±1,50 ^a	122,10±3,25 ^{abc}
11	30	10	80	12,50±1,41 ^a	86,98±9,89 ^d	11,29±0,99 ^{ef}	33,90±0,59 ^{ab}	138,90±0,70 ^a
12	30	30	80	6,00±1,41 ^b	95,34±14,2 ^d	18,58±1,50 ^{cdef}	34,15±0,07 ^a	121,22±1,56 ^{bc}
13	30	20	60	9,34±1,41 ^{ab}	87,22±15,4 ^d	13,14±0,28 ^{def}	29,17±0,46 ^d	120,22±1,38 ^{bcd}
14	30	20	60	9,5±1,41 ^{ab}	93,00±14,3 ^d	11,34±1,32 ^{def}	33,26±1,47 ^{abc}	101,30±0,84 ^e
15	30	20	60	10,4±1,41 ^{ab}	94,21±5,5 ^d	9,70±1,61 ^f	29,85±0,49 ^{cd}	103,75±5,30 ^{de}

valeurs sont exprimées en moyenne ± ET de 3 répétitions. Dans la même colonne, les valeurs suivies de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (p < 0,05).

Les

Tableau 19 : Test ANOVA pour les modèles ajustés

	Modèle	DL	SC	MC	F	p-value
Rendement d'extraction	Régression	9	48,53	5,39	26,90	0,0010*
	Résidus	5	1,00	0,20	-	-
	Manque d'ajustement	3	0,34	0,11	0,36	0,79
	Erreur pure	2	0,65	0,32	-	-
	Totale	14	49,53	-	-	-
	R ²	98%				
TPC	Régression	-	12672,82	1408,09	9,29	-
	Résidus	-	758,01	151,60	-	-
	Manque d'ajustement	-	732,52	244,17	19,15	-
	Erreur pure	-	25,50	12,75	-	-
	Total	-	13430.82	-	-	-
	R ²	94,3%				
TFC	Régression	-	1623,89	180,43	8,31	0,0156*
	Résidus	-	108,52	21,70	-	-
	Manque d'ajustement	-	102,60	34,20	11,55	0,08
	Erreur pure	-	5,92	2,96	-	-
	Totale	-	1732,41	-	-	-
	R ²	93,7%				
DPPH-IC ₅₀	Régression	-	284,50	31,61	13,54	0,0052*
	Résidus	-	11,67	2,33		
	Manque d'ajustement	-	5,22	1,74	0,54	0,70
	Erreur pure	-	6,45	3,23	-	-
	Totale	-	296,17		-	-
	R ²	96%				
FRAP-EC ₅₀	Régression	-	975,78	108,42	5,54	0,0370*
	Résidus	-	97,87	19,57	-	-
	Manque d'ajustement	-	22,94	7,65	0,20	0,89
	Erreur pure	-	74.93	37.46	-	-
	Totale	-	1073.65	-	-	-
	R ²	98.3%				

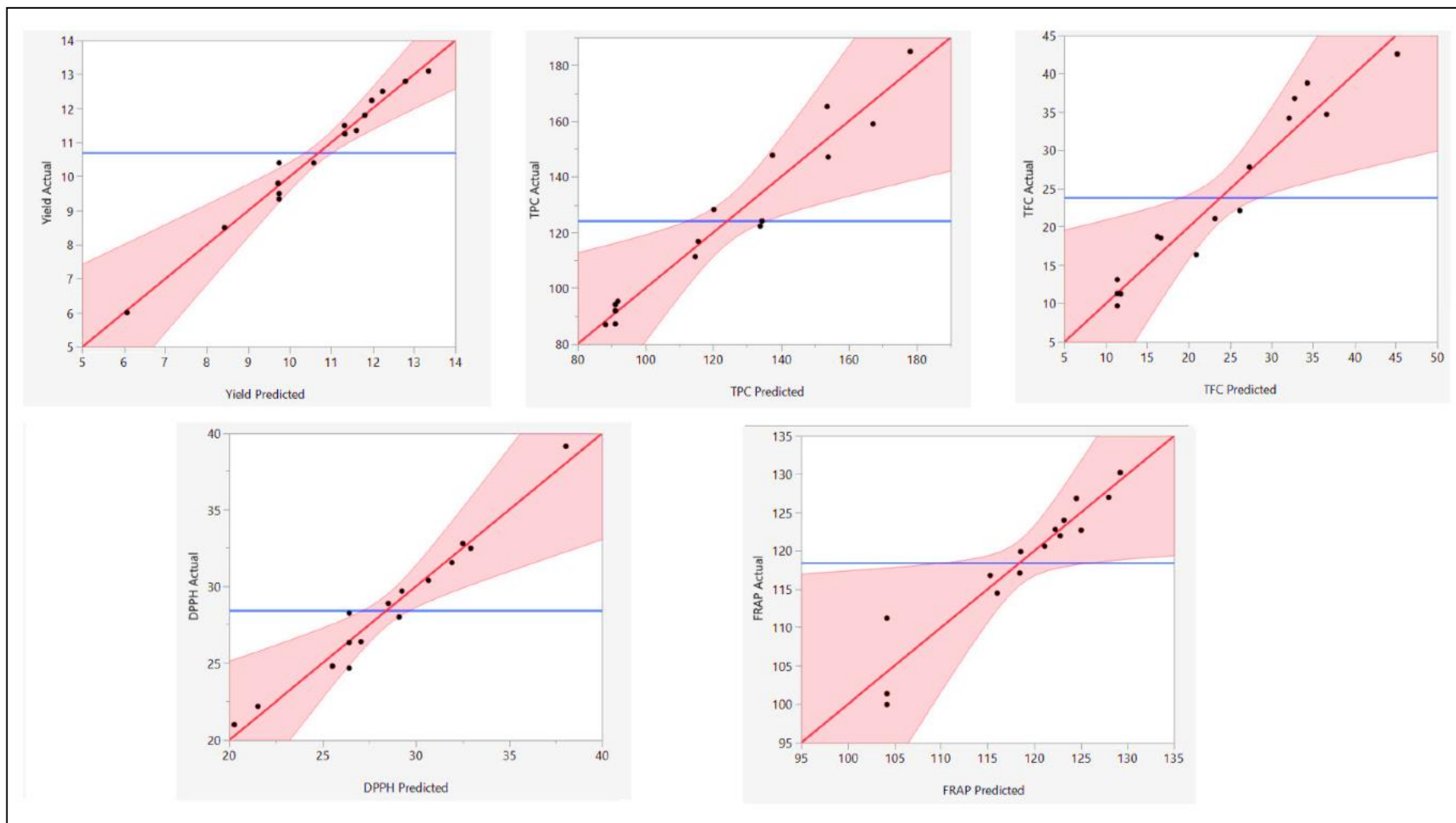


Figure 54 : Courbes des valeurs réelles par rapport aux valeurs prédites.

II.2.2 Estimation des paramètres du modèle et modèles ajustés

Le tableau 21 représente les effets linéaires de tous les facteurs étudiés, leurs termes quadratiques et d'interaction, leurs valeurs statistiques de T-Student et la probabilité observée (valeur p) de chacun d'eux. Les relations entre les paramètres testés et les réponses ont été expliquées par les équations de régression suivantes 4, 5, 6, 7 et 8 pour le rendement d'extraction, TPC, TFC, DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀, respectivement).

Pour la réponse rendement d'extraction, les constantes b_0 , les termes linéaires b_2 et b_3 ; les termes d'interaction binaire b_{12} , b_{13} , b_{23} ; et l'interaction quadratique b_{11} étaient des coefficients statistiquement significatifs. En conséquence, le modèle mathématique est représenté par l'équation suivante :

$$Y_{\text{REAU}} = 9.75 - 0.75 X_2 - 0.43 X_3 - 1.07 X_1 X_2 + 0.68 X_1 X_3 - 2.34 X_2 X_3 + 1.94 X_{11}^2 + \varepsilon \quad \text{Eq 23}$$

Concernant la réponse TPC, les coefficients statistiquement significatifs étaient la constante b_0 ; les termes linéaires b_1 , b_3 ; et le terme d'interaction quadratique b_{11} . Son modèle mathématique est décrit par l'équation :

$$Y_{\text{TPC}} = 91.14 - 12.52 X_3 + 50.48 X_{11}^2 + \varepsilon \quad \text{Eq 24}$$

Quant à la réponse TFC, les coefficients significatifs étaient la constante b_0 ; les termes linéaires b_1 et b_3 ; et les termes d'interaction quadratiques b_{11} et b_{33} . L'équation suivante représente le modèle liant TFC aux paramètres :

$$Y_{\text{TFC}} = 11.39 - 5.58 X_1 - 8.89 X_3 + 11.61 X_{11} + 7.08 X_{33} + \varepsilon \quad \text{Eq 25}$$

Concernant la réponse DPPH-IC₅₀, les constantes b_0 ; les termes linéaires b_2 , b_3 ; et les termes quadratiques b_{11} et b_{33} étaient les coefficients statistiquement significatifs. Par conséquent, le modèle ajusté est représenté par l'équation suivante :

$$Y_{\text{DPPH-IC50}} = 26.43 + 2.70 X_2 + 1.78 X_3 - 2.38 X_{11} + 6.61 X_{33} + \varepsilon \quad \text{Eq 26}$$

Enfin, seuls les termes d'interaction constants b_0 et quadratiques b_{11} et b_{22} étaient les coefficients statistiquement significatifs pour la réponse FRAP-EC₅₀. L'équation suivante représente son modèle mathématique :

$$Y_{\text{FRAP-EC50}} = 104.20 + 13.88 X_{11}^2 + 7.72 X_{22}^2 + \varepsilon \quad \text{Eq 27}$$

Les effets des paramètres étudiés, leurs valeurs estimées, et leurs valeurs p observées sont significativement influencés par le temps de sonication (X_1), le rapport (X_2), et la concentration de solvant (X_3), ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans des études antérieures [389], [390].

Il est bien établi que les mélanges éthanol-eau distillée présentent une efficacité d'extraction des composés phénoliques supérieure par rapport aux systèmes à solvant unique [391]. En augmentant la proportion d'eau distillée par rapport à l'éthanol, la polarité du solvant augmente, permettant ainsi au système de solvants d'extraire les polyphénols de différents degrés de polarité [392]. Plusieurs études ont également souligné l'importance de la concentration du solvant par rapport à d'autres facteurs [393], [394], [395]. Néanmoins, le temps d'extraction, lorsqu'il est associé au bon type de solvant, exerce une influence sur le rendement d'extraction, le TPC, le TFC, et l'activité antioxydante de la propolis [396].

II.2.3 Optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons

Afin de déterminer les valeurs optimales atteignables, on a ciblé les performances maximales lors de la réalisation des expériences. En effet les résultats optimaux enregistrés étaient de 13,1 % pour le rendement d'extraction assistée par ultrason, 187,21 mg AGEq/g pour la TPC, 42,6 mg QEq/g pour la TFC, 21 µg/ml pour le DPPH-IC₅₀, et 130,21 µmol Fe²⁺/g pour le FRAP-EC₅₀. En conséquence, nous avons adopté un paramétrage des facteurs sélectionnés pour garantir des réponses égales ou supérieures à ces valeurs optimales. Pour cela la température maintenue lors de nos expériences a été établie à 35 °C, une condition propice à l'extraction qui prévient la perte ou la dégradation des composés actifs [397]. Après une première analyse d'optimisation des cinq réponses, il est vivement recommandé de fixer le temps d'extraction à son niveau le plus bas (15 minutes) pour les trois premières réponses (rendement d'extraction, TPC et TFC). Ainsi, ce facteur sera maintenu à une valeur de 15 minutes pour ces réponses. Cependant, une maximisation du temps de traitement est préconisée pour le DPPH-IC₅₀ et le FRAP-EC₅₀.

Tableau 20: Coefficients de régression estimés du modèle cubique spécial

Terme	Coefficient	Rdt Ext		TPC		TFC		DPPH-IC ₅₀		FRAP-EC ₅	
		Estimé	P-value	Estimé	P-value	Estimé	P-value	Estimé	P-value	Estimée	P-value
Constante	b ₀	9,75	<0,0001*	91,14	<0.0001*	11,39	0,0082*	26,43	<0,0001*	104,20	<0,0001*
TS	b ₁	-0,06	0,7202	-10,98	0,0531	-5,58	0,0195*	0,07	0,9054	-0,41	0,804
S/P ratio	b ₂	-0,75	0,0053*	1,12	0,8081	-1,11	0,5289	2,70	0,0041*	-0,21	0,898
EtOH %	b ₃	-0,43	0,0416*	-12,52	0,0347*	-8,89	0,0029*	1,78	0,0218*	-0,16	0,924
TS × S/P ratio	b ₁₂	-1,07	0,005*	-11,13	0,1304	-0,03	0,9919	0,70	0,4015	2,81	0,260
TS × EtOH %	b ₁₃	0,68	0,0296*	3,85	0,5594	0,61	0,8046	0,44	0,5937	-1,54	0,517
S/P×EtOH %	b ₂₃	-2,34	0,0001*	0,70	0,9136	3,55	0,1883	0,99	0,2537	-1,43	0,548
TS×TS	b ₁₁	1,94	0,0004*	50,48	0,0005*	11,61	0,0049*	-2,38	0,0305*	13,88	0,0018*
S/P×S/P	b ₂₁	-0,09	0,7016	13,29	0,0927	4,63	0,1147	-0,45	0,5952	7,72	0,0203*
EtOH %×EtOH %	b ₃₃	-0,06	0,7927	-1,80	0,7898	7,08	0,033*	6,61	0,0004*	5,16	0,075

Rdt Ext : Rendement d'extraction assistée par ultrasons, **TPC** : Taux des polyphénols totaux, **TFC** : Taux des flavonoïdes totaux, **TS** : temps de sonication, **S/P** : Ratio solvant propolis, **EtOH** : Ethanol

II.2.4 Effets des conditions expérimentales sur les réponses étudiées :

II.2.4.1 Effet sur le rendement d'extraction assistée par ultrasons de la propolis.

En se basant sur les contours présentés dans les figures 75a et 76a, la valeur maximale du rendement d'extraction pouvait atteindre 15% en minimisant simultanément le temps de traitement et la concentration en solvant, tout en maximisant le rapport solvant/propolis. Tandis que le tracé de désirabilité dans la figure 77a confirme cette constatation en démontrant qu'il est envisageable d'atteindre un rendement d'extraction de 15,35 % avec une désirabilité de 99,9 % en ajustant le temps de sonication à 15 minutes, le rapport propolis-éthanol à 30 :1 mg/L, et la concentration d'éthanol à un niveau bas de 40%. Cette augmentation du rendement d'extraction assistée par ultrasons pourrait s'expliquer par l'effet de cavitation induit par la rupture du matériau sous l'action des ultrasons, favorisant la formation d'une structure poreuse [398]. La valeur optimisée du rendement d'extraction de la propolis Marocaine (15,35%) surpassait celle obtenue par extraction éthanolique conventionnelle [398] et se situait dans la même fourchette que celle des extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons de propolis Polonaise, qui affichaient des rendements qui varient de 10,04 % à 15,92 % [316].

II.2.4.2 Effet sur la teneur totale en polyphénols

Comme illustré par le tracé représenté par les figures 75b,76b, il est possible d'atteindre une valeur de la TPC supérieure à 190 mg AGEq/g MS en utilisant les mêmes conditions opératoires définies pour le rendement d'extraction, à savoir un temps de sonication de 15 minutes, un rapport solvant/propolis de 30 :1 et une concentration en éthanol de 40 %. De plus, la fonction de désirabilité pour cette réponse indique qu'une valeur de 192 mg AGEq/g MS était la plus élevée envisageable, avec un degré de compromis de 99,7 %. Cette concentration importante de composés phénoliques, due à la cavitation facilitant la libération des composés de la matrice de propolis, combinée à la présence d'eau dans l'éthanol à 40 %, ce qui a augmenté significativement la polarité du solvant, accélérant ainsi la dispersion des composés phénoliques [399]. Par ailleurs, l'eau facilite la pénétration du solvant dans la structure cellulaire des particules solides [400]. Par comparaison de résultat optimisée de la TPC, il revêtait une importance particulière par rapport à celui obtenu par extraction assistée par ultrasons de la propolis de la Malaisie, dont la valeur prédite était de 162,46 mg AGEq/g [401] dépassant celle de l'extrait de propolis Lituanienne obtenu par des méthodes d'extraction traditionnelles [402]. De plus, elle était comparable à celles obtenues par la même méthode d'extraction pour la propolis Chinoise, avec un intervalle de TPC qui varie de 166 à 201,07 mg QEq/g [403].

II.2.4.3 Effet sur la réponse du TFC

La concentration maximale de la TFC excédait 45 mg QEq/g MS (les figures 75c,76c). Ainsi que la courbe de désirabilité (Figure 77c) confirme cette valeur en démontrant qu'un réglage à 15 minutes, 30 ml/g et 40% pour le temps de sonication, le rapport solvant/Propolis et la concentration en éthanol, respectivement, aboutit à une valeur maximale de 45,15 mg QEq/g MS, avec un degré de compromis de 99,3%. Cette valeur était significativement comparée à celle obtenue par macération de la propolis Malaisienne, qui présentait des valeurs comprises entre 7,68 et 17,23 mg QE/g MS [404].

II.2.4.4 Effet sur la DPPH-IC₅₀

Comme le dévoile le graphique de contour (figures 75d,76d), la valeur optimisée de DPPH-IC₅₀ était d'environ 21 µg/ml, cette valeur peut être obtenue en ajustant les paramètres suivants : 45 minutes, 10 ml/g, et 60 % pour le temps de sonication, le rapport solvant/Propolis, et la concentration en éthanol, respectivement. Concernant le graphe de la désirabilité sur la (Figure 77d), il indique que nous avons une probabilité de 99,7% pour atteindre une valeur de DPPH-IC₅₀ de 20,27 µg/ml en respectant les conditions opératoires précitées. Cette valeur était supérieure à celle obtenue par l'extraction conventionnelle de la propolis Brésilienne, où les valeurs de DPPH-IC₅₀ variaient entre 31 et 183 µg/ml. En revanche, une étude menée par Yeo et al. a montré que l'extrait de propolis optimal obtenu par extraction assistée par ultrasons de la propolis originaire de la Chine présentait une DPPH-IC₅₀ de 27,89 µg/ml [405].

II.2.4.5 Effet des conditions de fonctionnement sur la réponse du FRAP-EC₅₀

Les figures 75e,76e illustrent la valeur optimisée de la FRAP-EC₅₀ qui a été d'environ 135 µmol Fe²⁺/g, obtenue en ajustant les paramètres suivants : 15 minutes, 30 ml/g et 40 % pour le temps de sonication, le rapport solvant/Propolis et la concentration en éthanol, respectivement. De plus, la valeur maximale à atteindre avec un degré de compromis de 99,1 %, indiquée par la fonction de désirabilité était de 136,26 µmol Fe²⁺/g (figure 76e), cette valeur était comparable à celle obtenue par extraction assistée par ultrasons de la propolis de la Chine, où les valeurs variaient de 126 à 290,34 µmol Fe²⁺/g et aussi celle rapportée pour la propolis Croate qui variait entre 40 et 1337,22 µmol Fe²⁺/g [406].

PARTIE EXPERIMENTALE

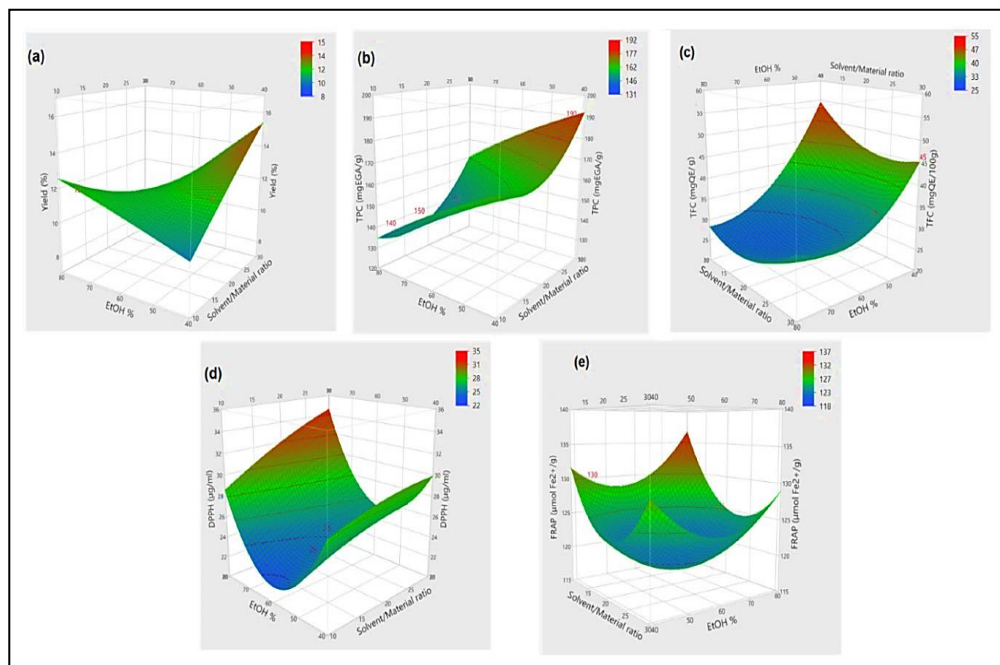


Figure 55 : Graphes tridimensionnels pour l'extraction assistée par ultrasons de la propolis marocaine, montrant la zone de compromis optimale conduisant à la meilleure valeur de (a) Rdt, (b) TPC, (c) TFC (d) DPPH- IC₅₀, et (e) FRAP-EC₅₀

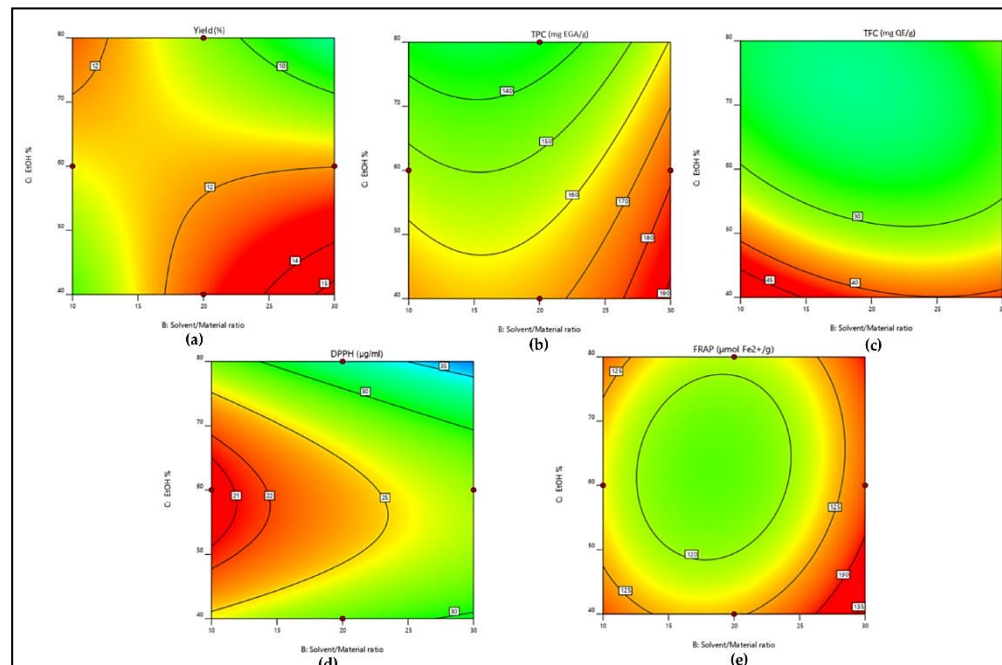


Figure 56 : Courbes de contour d'extraction assistée par ultrasons de la propolis Marocaine, montrant la zone optimale conduisant à la meilleure valeur de (a) Rdt, (b) TPC, (c) TFC, (d) DPPH- IC₅₀, et (e) FRAP-EC₅₀ .

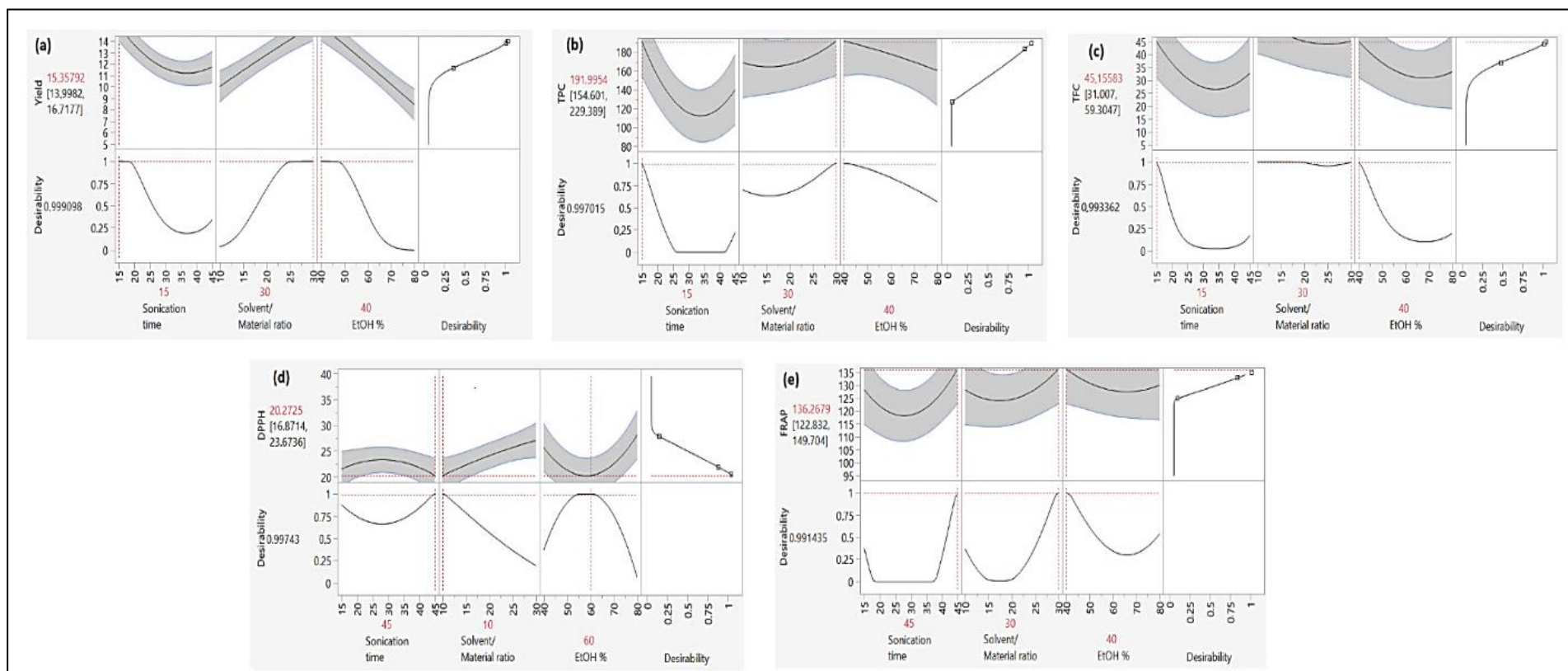


Figure 57 : Graphiques de désirabilité montrant le réglage précis des paramètres conduisant à la valeur optimale pour (a) le rendement, (b) TPC, (c) TFC, (d) DPPH-IC₅₀ et (e) FRAP-EC₅₀, séparément.

II.2.6 Optimisation simultanée des réponses étudiées.

La fonction de désirabilité permet également de déterminer simultanément des conditions optimales pour toutes les réponses étudiées [406]. Ainsi, plusieurs solutions peuvent être proposées par cette fonction, impliquant de déterminer à l'avance la priorité accordée à chaque réponse. Dans notre cas, l'optimisation des trois premières réponses, c'est-à-dire les rendements d'extraction assistée par ultrasons, TPC et TFC, nécessite le même réglage. Tandis que les deux réponses, DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀, en nécessitent un autre. Parmi les solutions proposées de réglages simultanés, nous avons choisi les conditions illustrées dans la figure 78. Par conséquent, un temps de traitement aux ultrasons de 15 minutes, un rapport solvant/propolis de 30:1 ml/g et une concentration de solvant de 58% ont été sélectionnés comme conditions optimales pour une optimisation simultanée. Ces paramètres permettent d'obtenir des valeurs de 12,32 %, 179,6 mg AGEq/g, 32,78 mgQEq/g d'extraire, 25,36 µg/ml et 123,24 µmol Fe²⁺/g pour le rendement d'extraction assistée par ultrasons, TPC, TFC, DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀, respectivement. Nos résultats confirment que la concentration du solvant, le temps de sonication et le rapport de solvant /propolis affectent toutes les réponses étudiées, comme observé dans d'autres travaux réalisés sur les propolis des différents pays, tel que la Malaisie [407], la Pologne [408] et la Roumanie [409].

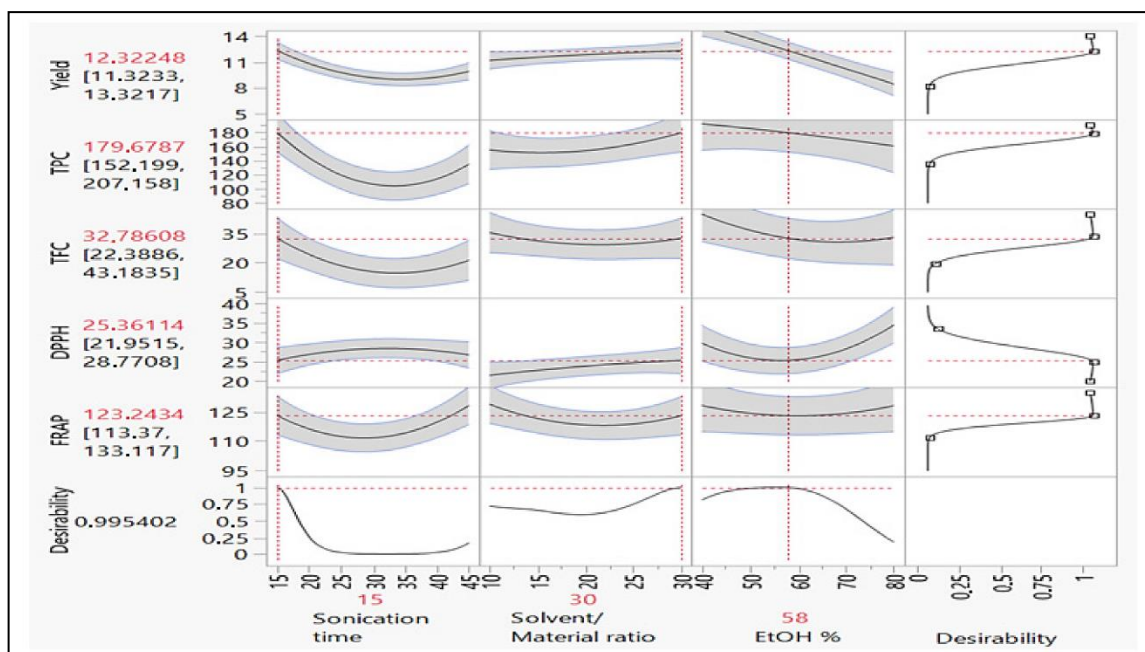


Figure 58 : Graphes de désirabilité d'optimisation simultanée montrant le réglage précis des paramètres conduisant à la valeur optimale pour le rendement, TPC, TFC, DPPH-IC₅₀ et FRAP-EC₅₀

II.2.7 Screening phénolique de l'extrait optimisé de la propolis Marocaine

Pour caractériser et quantifier les composés phénoliques individuels dans l'extrait de la propolis marocaine, obtenue dans des conditions optimales d'extraction assistée par ultrasons selon le plan d'optimisation ; Behnken Design, on a effectué une analyse HPLC-DAD dont les résultats sont présentés dans la Figure 79 et le Tableau 22, démontrant la caractérisation de vingt composés phénoliques. L'épicatéchine s'est avérée être l'acide phénolique le plus abondant avec une concentration de 0,1927 mg/g, suivi par l'acide coumarique avec 0,0530 mg/g) et l'acide rosmarinique avec 0,042mg/g. Tandis que la vanilline était présente à la concentration la plus basse parmi les composés phénoliques détectés (0,0021 mg/g). Une étude antérieure réalisée par Laaroussi et ses collaborateurs avait identifié plus de seize composés phénoliques dans sept échantillons de propolis collectés dans différentes régions du Maroc, incluant l'acide ellagique, l'apigénine, l'acide o-coumarique, le kaempférol et l'acide rosmarinique [361]. Ces travaux soulignent les particularités de la propolis marocaine par rapport à d'autres types de propolis, telle que celle provenant d'Espagne, caractérisée par des concentrations élevées de pinocembrine (482 mg/g), d'ester phényléthylque d'acide caféique (594 mg/g) et de kaempférol (189 mg/g). En comparaison, l'extrait éthanolique de la propolis originaire de la Bulgarie qui possède la pinobanksine (0,0147 mg/g) et la chrysine (0,1204 mg/g) en tant que composés phénoliques majoritaires [409]. Cette diversité du profil phénolique peut être attribuée à la variété de la flore butinée par les abeilles [410], ce qui confère à la propolis ses propriétés biologiques et pharmacologiques spécifiques [411], [412].

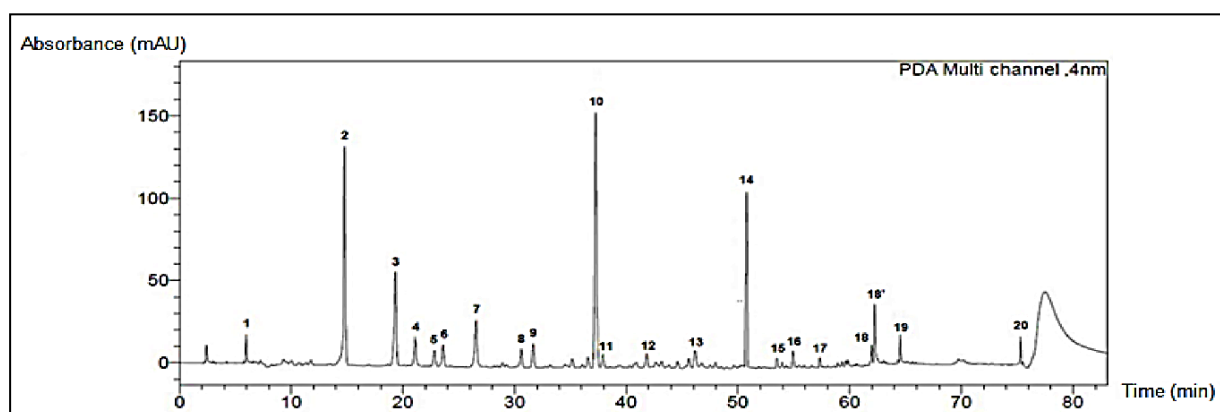


Figure 59 : Chromatogrammes HPLC-DAD de composés phénoliques d'extraits optimal

Tableau 21: Quantification par HPLC-DAD des composés phénoliques de l'extrait optimal de la propolis (Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ ET de 2 répétitions)

Composés phénoliques	Concentration mg/g MS
1- Vanilline	0,0021 $\pm$ 0,0014
2- acide coumarique	0,0530 $\pm$ 0,0007
3- Tyrosol	0,0099 $\pm$ 0,0013
4- Acide Férulique	0,0087 $\pm$ 0,0005
5- Hydroxytyrosol	0,0054 $\pm$ 0,0005
6-acide Syringique	0,0060 $\pm$ 0,0014
7- acide Caféique	0,0100 $\pm$ 0,0001
8- Ellagique	0,0180 $\pm$ 0,0005
9- Hespéridine	0,0053 $\pm$ 0,0004
10- Epicatéchine	0,1927 $\pm$ 0,0037
11- Catéchine	0,0021 $\pm$ 0,0001
12- Apigénine	0,0030 $\pm$ 0,0001
13- Acide cinnamique	0,0032 $\pm$ 0,0001
14- Acide rosmarinique	0,0429 $\pm$ 0,0013
15- Rutine	0,0173 $\pm$ 0,0004
16- Naringine	0,0027 $\pm$ 0,0009
17- Quercétine	0,0026 $\pm$ 0,0002
18- Pinoresinol	0,0061 $\pm$ 0,0001
18'-acetone Pinoresinol	0,0171 $\pm$ 0,0001
19- Kaempferol	0,0117 $\pm$ 0,0010
20- Luteoline	0,0130 $\pm$ 0,0002

Conclusion

Dans cette étude novatrice, l'optimisation de l'extraction assistée par ultrasons a été entreprise pour la première fois sur la propolis issue de la région Fès Meknès en utilisant la méthodologie de surface de réponse. Ce processus d'optimisation a conduit à une récupération accrue d'extraits présentant des concentrations élevées en TPC et TFC, ainsi qu'une activité antioxydante significative. L'application du BBD a permis d'établir des relations claires entre les variables indépendantes et les réponses étudiées en mettant en évidence que le temps de sonication par ultrason, la concentration du solvant d'extraction, et le rapport solvant/propolis ont été identifiés comme statistiquement significatifs, démontrant ainsi leur capacité à influencer les propriétés chimiques et biologiques de la propolis. En conséquence, l'utilisation de ce modèle expérimental s'avère cruciale pour améliorer l'efficacité du processus tout en réduisant les coûts et le nombre d'expériences nécessaires.

ETUDE III

Profil phénolique et Optimisation par plan du mélange pour l'évaluation *In-vitro* de l'activité antioxydante et antimicrobienne de la combinaison du miel, propolis et pollen d'abeille marocains

Wiley
Journal of Food Biochemistry
Volume 2024, Article ID 8246224, 16 pages
<https://doi.org/10.1155/2024/8246224>

WILEY

Research Article

Phenolic Screening and Mixture Design Optimization for *In Vitro* Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Honey, Propolis, and Bee Pollen

Abderrazak Aboulghazi ¹, Mouhcine Fadil ², Soumaya Touzani ¹, Lahbib Hibaoui ³,
Christophe Hano ⁴ and Badiaa Lyoussi ¹

¹Laboratory of Natural Substances, Pharmacology, Environment, Modeling, Health, and Life Quality, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar El Mahraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez, Morocco

²Laboratory of Applied Organic Chemistry, Faculty of Sciences and Techniques, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, P.O. Box 2202, Road of Imouzzer, Fez, Morocco

³Laboratory of Medical Sciences and Translational Research Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez, Morocco

⁴Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans-CNRS, UMR 7311, BP 6759, CEDEX 2, Orléans 45067, France

Correspondence should be addressed to Christophe Hano; hano@univ-orleans.fr and Badiaa Lyoussi; lyoussi@gmail.com

Received 19 October 2022; Revised 2 April 2024; Accepted 5 April 2024

Academic Editor: Kai Wang

Copyright © 2024 Abderrazak Aboulghazi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The current study used a design of experiments to evaluate the potential synergistic effects of three Moroccan bee products (honey (H), propolis (P), and bee pollen (BP)) on the free radical inhibition and antibacterial activity against clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The phytochemical contents of these three bee products were first evaluated using HPLC-DAD with 20 identified compounds (9 in both H and P extracts and 13 in BP extract). The P extract had the highest phytochemical content, with high levels of flavanone pinocembrin, flavanol catechin, lignan pinoresinol, and simple phenolics (*p*-coumaric and gallic acids). Then, the optimized mixtures were determined using an augmented simplex-centroid design. The optimized formulations (H33%:P43%:BP24%) and (H21%:P47%:BP32%) presented the optimal total phenolic content and DPPH-IC₅₀ with 226.88 mgGAE/g and 10.64 µg/mL, respectively, whereas the formulations (H26%:P52%:BP22%) and (H35%:P40%:BP25%) showed the optimal antimicrobial activity against *S. aureus* (MIC_{0.0005} equal to 4.34 µg/mL) and *E. coli* (MIC_{0.001} equal to 5.70 µg/mL), respectively. The predicted responses from these mixture proportions were also experimentally validated. Compared to the single free radical activity and antibacterial effect of each isolated bee product, these optimized formulations demonstrated an increased biological activity, and the determination of the fractional inhibitory concentrations revealed a synergistic effect between these products. This study emphasizes the interest in optimized bee product mixtures for practical applications beyond the pharmaceutical and food industries. Their potential can be extended to nutraceuticals, cosmeceuticals, animal health, environmental sustainability, and advanced biomedical research, offering holistic solutions for diverse challenges across various sectors. Exploring these applications further can unlock new avenues for innovation and sustainable development.

Résumé

Les produits de la ruche, tels que le miel, la propolis, le pollen d'abeille, sont utilisés depuis l'antiquité comme des antioxydants naturels et des traitements traditionnels pour soigner un large éventail de maladies, notamment les infections [413]. De nos jours, il y a un intérêt croissant pour ces composés naturels pour utiliser leurs propriétés antioxydantes et biologiques en médecine alternative et en apithérapie [414]. Bien que les propriétés antioxydantes et antibactériennes des composés bioactifs extraits des produits apicoles aient été largement rapportées, leur utilisation est encore limitée par rapport aux médicaments standard [415]. En outre les références existantes soutiennent leur efficacité contre les souches multi-résistantes, qui sont parmi les plus importants défis mondiaux de santé publique du XXI^e siècle [416]. Ces produits sont fréquemment utilisés de manière unitaire. Les mélanges à base de ces produits sont recherchés pour maximiser l'utilisation de ceux générés en quantités restreintes tout en améliorant leur activité biologique.

L'optimisation des effets chimiques et biologiques des composés naturels est devenue un processus exploité dans plusieurs domaines tels que l'agriculture, l'alimentation et l'industrie pharmaceutique [417], [418], [419]. Malgré les études sur les activités antioxydantes et antimicrobiennes du miel [420], propolis [509] et du pollen d'abeilles [422], aucune étude sur l'activité combinée antioxydante et antimicrobienne des mélanges de ces produits de la ruche n'a été menée.

la présente recherche vise d'une part la caractérisation phytochimique et l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes du miel, de la propolis et du pollen d'abeille issus de la région Fès-Meknès et d'autre part la détermination des proportions optimales de leur combinaison ternaire en utilisant le plan du mélange « simplex-centroïde augmenté » permettant de maximiser leur effets antioxydante et antimicrobienne contre les isolats cliniques de bactéries Gram-positives et Gram-négatives (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*).

Résumé graphique

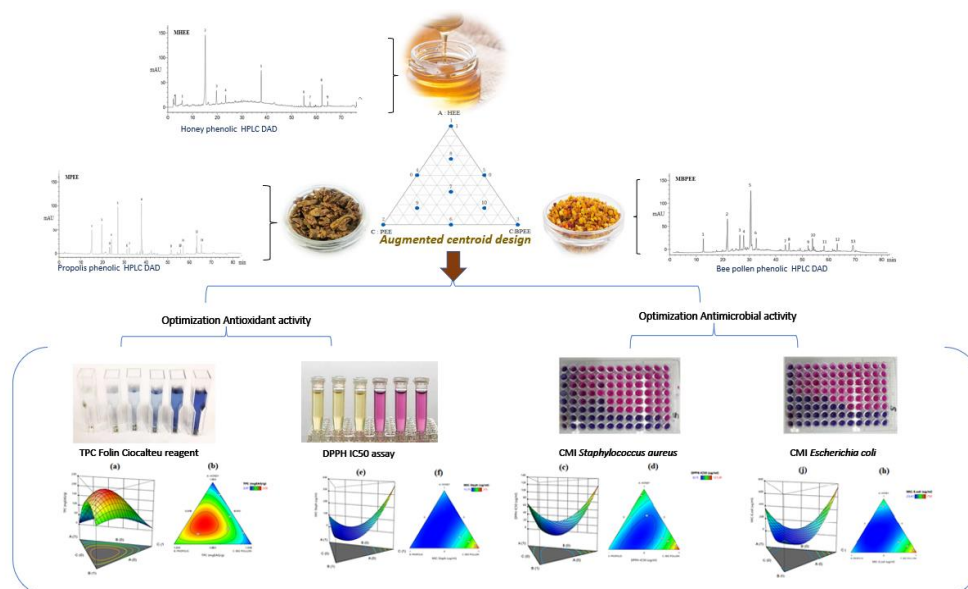


Figure 60 : Protocole expérimental d'optimisation par plan du mélange du screening phénolique et l'évaluation in vitro de l'activité antioxydante et antimicrobienne de la mixture miel, propolis et pollen d'abeille

II.3 Résultat et discussions

II.3.1 Screening phénolique

Le screening phénolique du miel, propolis et pollen d'abeille issus de la région Fès Meknès a été évalué par analyse HPLC-DAD, comme le montre la figure 81 et le tableau 23. Cette analyse a révélé la présence de 9 composés dans l'extrait éthanolique de miel (EEMM). Pourtant les extraits éthanoliques de la propolis (EPPM) et du pollen d'abeille (EPPAM) ont révélé 13 et 12 composés phénoliques respectivement.

Au total, 20 différents composés phénoliques ont été identifiés et quantifiés. Ces derniers appartiennent aux groupes phénoliques simples (6 composés), flavonoïdes (13 composés : 1 dihydrochalcones, 2 flavanols, 5 flavonols, 2 flavones et 3 flavanones) et aux lignanes (1 composé). La teneur la plus élevée en composés phénoliques simples a été retrouvée dans l'EPPAM, ce dernier était plus riche en flavonoïdes. En revanche le dérivé de lignanes a été observé seulement dans l'EPPM. On note que l'acide caféique était le composé le plus abondant retrouvé dans EEMM et EPPAM avec 34 et 41 mg/g d'extrait respectivement. Par ailleurs la pinocembrine et l'acide p-coumarique étaient les composés majoritaires de l'extrait EPPM avec 29,1 mg/g et 22,2 mg/g d'extrait respectivement. La galangine, le kaempférol et l'acide gallique

ont également été retrouvés en concentrations importantes dans les les extraits des produits de la ruche étudiés. Ces concentrations observées ne diffèrent pas de celles rapportées dans des études antérieures [423], [424], [425], [426].

En outre, l'acide chlorogénique et l'isorhamnétine n'étaient abondants que dans l'EEPAM avec des concentrations de 22,9 mg/g et 11,04 mg/g MS, respectivement. Ces résultats sont également en accord avec les études publiées précédemment [427], [428].

Tableau 22 : : Profil phénoliques dans les produits de la ruche étudiés obtenu par HPLC - DAD).

Composés phénoliques		EEMM (mg/g)	EEPM (mg/g)	EEPAM (mg/g)
<i>Dérivés phénoliques simples</i>				
Acide gallique		2,30± 0,05 ^c	15,43± 0,10 ^a	11,71± 0,07 ^b
Acide p-coumarique		5,90 ±0,09 ^b	22,20 ± 0,08 ^a	nd ^c
Acide ferulique		nd ^c	4,70 ± 0,17 ^b	9,00± 0,09 ^a
Acide caféique		34,00 ± 0,20 ^b	8,01 ± 0,12 ^c	41,00± 0,29 ^a
Acide p-cinnamique		nd ^c	5,00± 0,06 ^b	6,00±0,20 ^a
Acide chlorogénique		nd ^b	nd ^b	22,90±0,20 ^a
Total		42,20±0,34 ^c	55,34±3 ^b	90,61 ±0,85 ^a
<i>Dérivés flavonoïdes</i>				
Naringine	Dihydrochalcones	nd ^b	nd ^b	7,40± 0,02 ^a
Catechine	Flavanol	nd ^c	14,22± 0,08 ^a	10,80 ± 0,04 ^b
Épicatéchine	Flavanol	nd ^b	4,90± 0,07 ^a	nd ^b
Quercétine	Flavonol	4,00±0,09 ^a	nd ^b	4,30 ± 0,10 ^a
kaempférol	Flavonol	12,20±0,01 ^a	nd ^c	3,40± 04 ^b
Isorhamnetine	Flavonol	nd ^b	nd ^b	11,00 ± 0,2 ^a
Galangine	Flavonol	18,10 0,01 ^a	11,09±0,26 ^b	nd ^c
Rutine	Flavonol	nd ^b	nd ^b	5,41± 0,02 ^a
Apigénine	Flavone	nd ^c	4,30±0,11 ^b	7,22 0,03 ^a
Chrysine	Flavone	10,00±0,02 ^a	4,09± 0,07 ^b	nd ^c
Pinocembrine	Flavanone	1,90± 0,08 ^b	29,01± 0,3 ^a	nd ^c
Pinostrobin	Flavanone	nd ^b	4,10± 0,30 ^a	nd ^b
Pinobanksine	Flavanone	2,30 ± 0,50 ^a	nd ^b	nd ^b
Total		48,50± 0,71 ^b	71,71± 1,20 ^a	49,53± 0,85 ^b
<i>Dérivés des lignanes</i>				
Pinoresinol		nd ^b	11,1±0,09 ^a	nd ^b

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET de 2 répétitions. Dans la même colonne, les valeurs suivies de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$). Nd : non détecté.

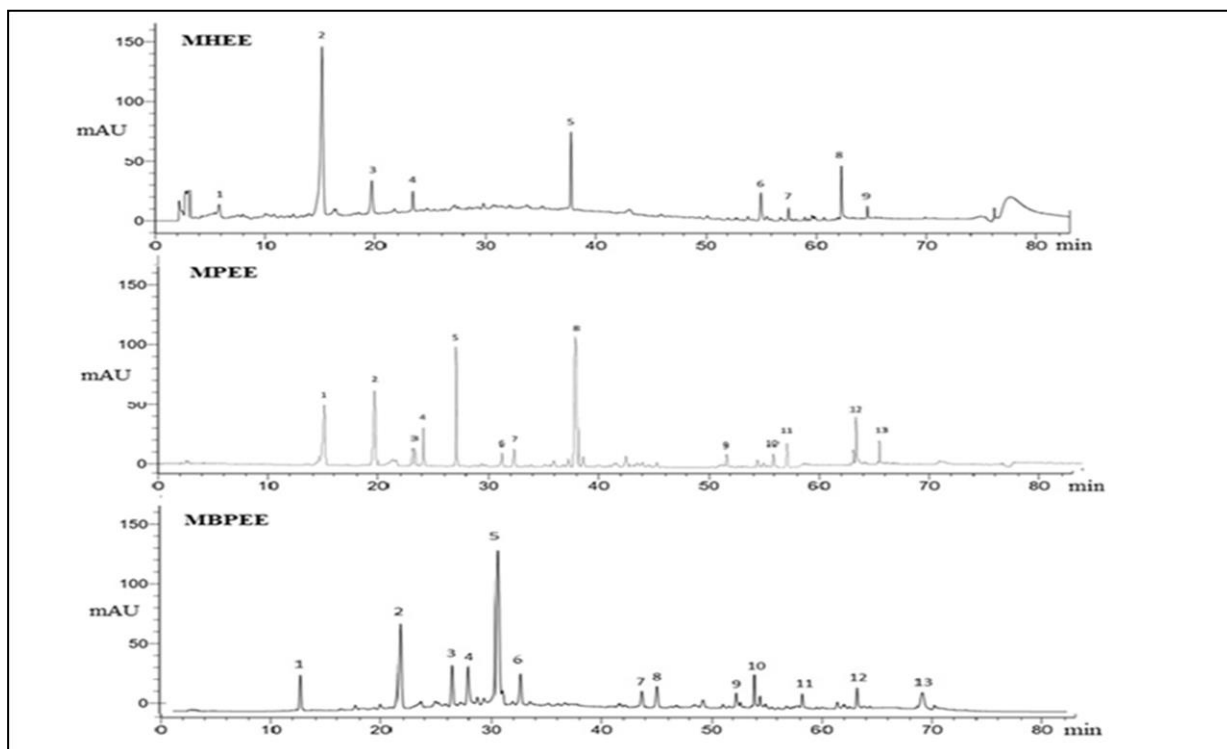


Figure 61: Chromatogrammes HPLC-DAD des extraits des produits de la ruche étudiés.

II.3.2 Analyse des activités antioxydantes et antibactériennes des produits de la ruche.

Selon les données présentées dans le tableau 22, l'extrait EEPM se distingue par la concentration la plus élevée en polyphénols, atteignant 144 mg AGE/g MS, une valeur qui se situe approximativement au même niveau que la concentration observée dans la propolis du Brésil (129 mg AGE/g MS) [429]. En revanche, l'extrait EEMM affiche une concentration de 8,26 mg AGE/g MS, dépassant ce qui avait été précédemment rapporté pour le miel Marocain, avec des variations allant de 0,75 à 2,45 mg AGE/g MS [430]. Enfin, l'extrait du pollen d'abeille présente une concentration de 4,8 mg AGE/g MS qui est inférieure à celle obtenue pour le pollen d'abeille originaire de la Turquie, démontrant une fourchette de 7,12 à 17,42 mg AGE/g MS [429].

Les concentrations requises des produits de la ruche étudiés pour inhiber le radical DPPH de 50 % étaient 53,06, 28,78 et 49,79 $\mu\text{g/ml}$ pour l'EEMM, EEPM ET EEPAM respectivement. Par ailleurs, ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour le miel et le pollen d'abeille provenant de la Turquie, où les valeurs se situaient entre 12,56 et 152,40 mg/ml et entre 0,65 et 8,2 mg/ml, respectivement [431], [432]. En outre la propolis de Chine a démontré des valeurs de l' IC_{50} qui variaient de 71,19 $\mu\text{g/ml}$ à 432,08 $\mu\text{g/ml}$ [433].

L'indice antioxydant phénolique (PAOXI), qui prend en considération à la fois la teneur en phénols antioxydants et leur efficacité antioxydante, a été calculé afin d'évaluer chaque extrait. EEPAM a également présenté un niveau élevé d'activité de piégeage des radicaux libres par rapport à sa concentration en phénols qui a été de 5 (tableau 24). Tandis que l'EEMM et l'EEPM avait une efficacité PAOXI de 0,15 et 0,10 respectivement. Cela peut indiquer la présence d'autres composés qui peuvent interférer avec l'activité antioxydante des phénols ou une moindre capacité à agir efficacement contre certains types de radicaux libres [434].

Cependant ces différences observées entre les extraits EEPAM, EEMM et EEPM mettent en lumière la complexité des interactions chimiques et biologiques dans la manifestation de l'activité antioxydante, allant au-delà de la simple concentration en phénols.

Tableau 23 : Activités antioxydante et antimicrobienne individuelles du miel, propolis et pollen d'abeille

Echantillon	Activité Antioxydante			Activité Antimicrobienne	
	TPC (mg AGE/g)	DPPH-IC ₅₀ (µg/mL)	PAOXI	CMI _{S.aureus} (µg/mL)	CMI _{E.coli} (µg/mL)
EEMM	8,26 ± 0,86 ^b	53,06 ± 1,67 ^b	0,15 ^b	93,75 ± 0,00 ^c	375,0 ± 0,00 ^c
EEPM	144,00 ± 9,09 ^a	28,78 ± 0,94 ^c	5,00 ^c	46,87 ± 0,00 ^b	187,5 ± 0,00 ^b
EEPAM	4,80 ± 0,04 ^c	49,76 ± 0,82 ^b	0,10 ^a	-	750,0 ± 0,00 ^d
Ac ascorbique	-	-	-	-	-
Tobramycine	-	-	-	160 ± 0,00 ^a	64 ± 0,00 ^a

PAOXI : indice antioxydant phénolique. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± écart type de 2 mesures. Sur la même colonne, les valeurs suivies de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

II.3.3 Optimisation des mélanges par plans d'expériences

Nous avons entrepris l'optimisation des mélanges de produits apicoles pour atteindre une teneur phénolique totale optimale, une activité antioxydante évaluée par le test de piégeage du radical DPPH, ainsi que l'activité antimicrobienne évaluée par la détermination des CMI en testant 2 espèces différentes de bactéries celle à Gram négatif (*E. coli*) représentée par la figure 82 et à Gram positif (*S. aureus*) représentée sur la figure 83. Pour ce faire, nous avons utilisé un plan de mélange type simplex-centroïde design comprenant trois composants X_1 : EEMM X_2 : EEPM, X_3 : EEPAM. Les essais ont été menés de manière aléatoire afin de perfectionner les paramètres du processus, comme le présente le tableau 25. Nous avons également recueilli les résultats expérimentaux et prévus des variables dépendants. Ces expériences ont inclus les composants individuels (#1, 2, 3), les mélanges binaires (#4, 5, 6), le point central (#7, 8, 9), ainsi que les mélanges ternaires (#10, 11, 12).

II.3.4 Validation statistique des modèles postulés

Une analyse de régression a été utilisée pour décrire la relation entre les variables de réponse et les facteurs choisis. Les données des réponses expérimentales ont été soumises à une analyse du plan augmenté centré, et une équation de prédiction a été développée pour chaque réponse. Par le biais de l'analyse de variance ANOVA (Tableau 26), l'adéquation et l'ajustement du modèle ont été examinés, et les valeurs p ont été utilisées pour estimer la signification de tous les coefficients (Tableau 27). La variance due aux paramètres de régression du modèle polynomial était statistiquement significative ($p < 0,05$) au niveau de signification de 95 %. De plus, les modèles n'ont pas montré de manque d'ajustement, et la probabilité de la valeur p est supérieure à 0,05.

De ce fait, le coefficient de détermination (R^2) a été calculé pour évaluer la performance de la conception de l'expérience pour l'approximation de la sortie souhaitée de chaque réponse. Il est important de noter que R^2 est un paramètre permettant de vérifier l'exactitude de l'ajustement entre les résultats expérimentaux et prévus, et il peut être défini comme un critère standard pour l'évaluation de la performance statistique et employé pour vérifier la précision de la capacité prédictive des modèles assemblés [435]. Les valeurs de R^2 étaient de 0,98 pour le TPC, de 0,99 pour le DPPH-IC₅₀, et également de 0,99 pour les deux CMI contre les souches testées. Ainsi, les résultats indiquent que les modèles sélectionnés s'ajustent bien aux données.

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 24: Plan d'expérience des mixtures des extraits des produits de la ruche étudiés et les réponses obtenues pour les variables dépendantes.

Exp ^a	Code du facteur			Activité antioxydante				Activité antimicrobienne µg/mL			
	X ₁	X ₂	X ₃	TPC (mg GAE/g)		DPPH-IC ₅₀ (µg/ml)		CMI _{S.aureus}		CMI _{E.coli}	
				Exp. ^b	Predi.	Exp. ^b	Predi.	Exp. ^b	Predi.	Exp. ^b	Predi.
1	1	0	0	3,97±0,11	6,41	69,82±0,98	69,01	93,75±0,90	115,54	375±8,00	367,29
2	0	1	0	124,2±3,98	116,24	36,32±0,19	37,22	46,87±0,15	41,3	187,5±7,00	216,73
3	0	0	1	8,06±0,89	12,55	121,09±4,4	122,15	375,0±7,10	367,82	750,0±11,00	742,29
4	0,5	0,5	0	178,29±8,00	172,24	48,20±0,67	48,29	23,43±0,60	19,65	46,87±0,50	76,10
5	0,5	0	0,5	46,41±2,07	53,34	27,55±0,21	27,81	46,87±0,90	52,47	93,75±2,70	78,32
6	0	0,5	0,5	112,5±8,80	108,99	19,29±0,78	21,25	46,87±0,80	45,29	93,75±2,00	95,37
7	0,33	0,33	0,33	217±9,76	218,27	10,15±0,56	11,92	11,75±0,30	11,51	23,43±0,90	17,34
8	0,33	0,33	0,33	226±9,09	218,27	10,15±0,58	11,92	11,75±0,12	11,51	23,43±0,90	17,34
9	0,33	0,33	0,33	215±9,00	218,27	11,99±0,63	11,92	11,75±0,13	11,51	23,43±0,90	17,34
10	0,66	0,16	0,16	148,15±6,32	141,89	29,56±0,21	30,82	23,43±0,70	30,37	46,87±0,89	76,10
11	0,16	0,66	0,16	172±7,02	197,05	21,88±0,25	18,04	23,43±0,60	6,87	46,87±0,90	24,97
12	0,16	0,16	0,66	135,08±2,56	122,69	43,87±0,42	39,52	93,75±1,00	115,54	187,5±2,00	196,83

a Les expériences ont été réalisées après randomisation X₁ : EEMM , X₂ : EEPM, X₃ : EEPAM ; b Chaque réponse est la moyenne des duplicatas ±l'erreur standard.

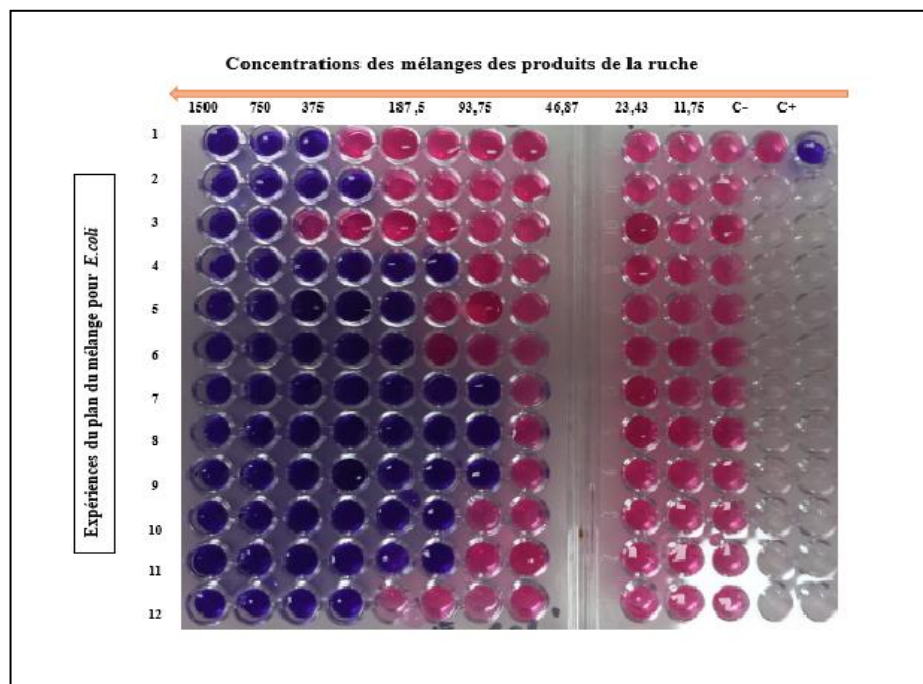


Figure 62 : Microplaque de détermination des CMI des mélanges des PR contre *E.coli*

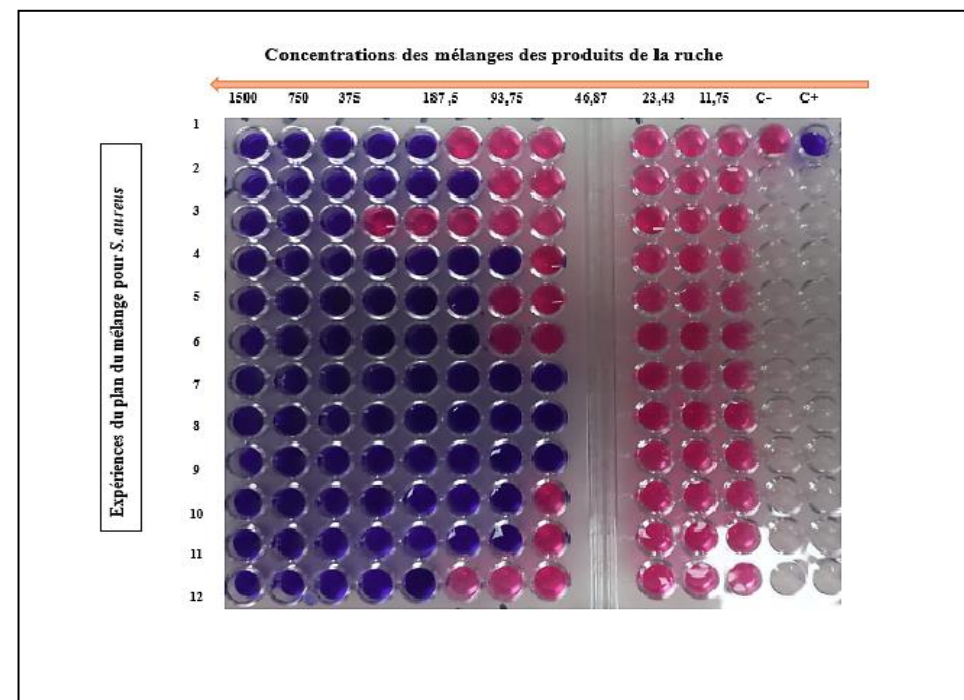


Figure 63 : Microplaque de détermination des CMI des mélanges contre *S. aureus*

On observe dans la figure 84 que les valeurs sont réparties normalement des deux côtés de la ligne, ce qui indique que les données expérimentales sont en excellent accord avec les valeurs prédites. Les constatations ci-dessus indiquent que le modèle proposé est adéquat pour représenter les réponses variables dans la plage de TPC : de 3,97 à 226 mg AGE/g MS, de DPPH-IC₅₀ : de 10,15 à 121,09 µg/ml, de MIC_{S.aureus} : de 11,75 à 375 µg/ml et de MIC_{E.coli} : de 23,43 à 750 µg/ml, respectivement. Les graphiques montrant la distribution des données prédites et expérimentales pour toutes les variables de réponse du miel, de la propolis et du pollen d'abeille forment une ligne droite.

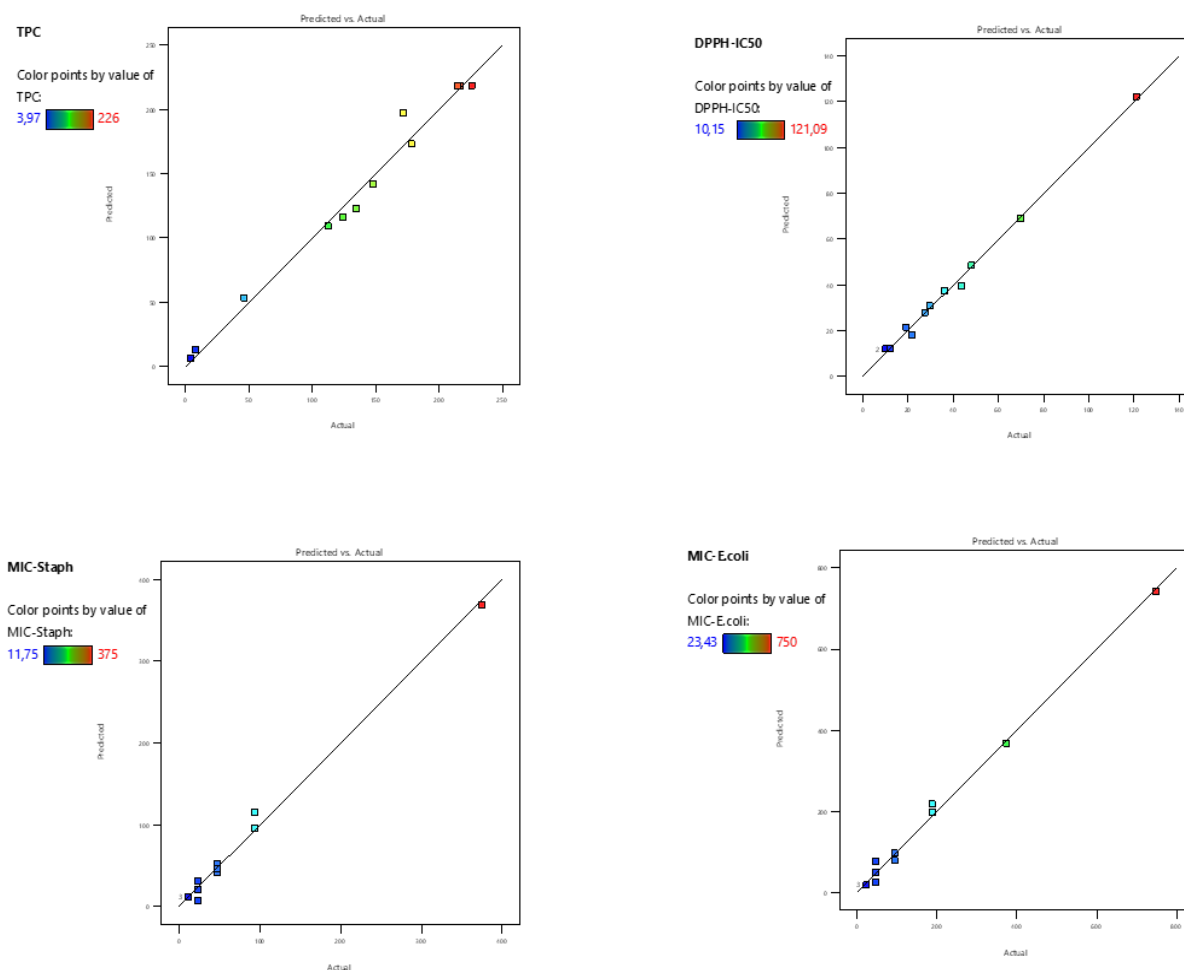


Figure 64 : Représentation des valeurs expérimentales et prédites des réponses étudiées

Tableau 25: Analyse de la variance pour les différents modèles ajustés aux réponses

Source		SC*	DL*	MC*	F-value	p-value
TPC	Régression	65408,09	6	10901,35	50,78	0,0003
	Résidus	1073,45	5			
	Manque d'ajustement	1004,79	3	334,93	9,76	0,0944
	Erreur pure		2			
	Total	66481,55	11			
	R ²	0,98				
DPPH-IC ₅₀	Régression	11024,79	6	1837,46	191,47	< 0,0001
	Résidus	47,98	5			
	Manque d'ajustement	45,72	3	15,24	13,51	0,0697
	Erreur pure		2			
	Total	11072,77	11			
	R ²	0,99				
MIC _{S.aureus}	Régression	1,114E+05	6	18571,46	99,53	< 0,0001
	Résidus	932,91	5			
	Manque d'ajustement	932,91	3	310,97		
	Erreur pure		2			
	Total	1,124E+05	11			
	R ²	0,99				
MIC _{E.coli}	Régression	4,962e+05	6	82696,11	150,39	< 00001
	Résidus	2749,39	5			
	Manque d'ajustement	2749,39	3	916,46		
	Erreur pure		2			
	Total	4,989E+05	11			
	R ²	0,99				

SC : sommes des carrés, DL : degré de liberté, MC : moyen des carrés

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 26: Coefficients estimés de régression des modèles

Terme	Coeff	TPC (mg AGE/g MS)			DPPH-IC ₅₀ (µg/mL)			CMI _{S.aureus} (µg/mL)			CMI _{E. coli} (µg/mL)		
		Estimé	t Ratio	Prob> t	Estimé	tRatio	Prob> t	Estimé	t Ratio	Prob> t	Estimé	t Ratio	Prob> t
EEMM	α_1	6,377	0,4	0,703	67,906036	17,53	<0,0001*	95,089364	7,21	0,0008*	367,28675	16,22	<,0001*
EEPM	α_2	116,20	7,35	0,0018	37,471491	9,68	0,0002*	52,471182	3,98	0,0106*	196,8322	8,69	0,0003*
EEPAM	α_3	12,51	0,79	0,47	122,40967	31,61	<0,0001*	367,81845	27,88	<,0001*	742,28765	32,78	<,0001*
EEMM*EEPM	α_{12}	445,51	5,60	0,005*	-21,00495	-1,08	0,3307	-173,638	-2,61	0,0474*	-934,2821	-8,19	0,0004*
EEMM*EEPAM	α_{13}	175,21	2,20	0,0924	-272,8086	-13,99	<0,0001*	-761,704	-11,47	<,0001*	-1905,851	-16,71	<,0001*
EEPM*EEPAM	α_{23}	178,29	2,24	0,0887	-232,7177	-11,93	<0,0001*	-659,420	-9,93	0,0002*	-1496,76	-13,12	<,0001*
EEMM*EEPM*EEPAM	α_{123}	2293,05	4,95	0,0078*	-165,3768	-1,56	0,1798	456,624	1,26	0,2621	1721,1096	2,77	0,0392*

En général, une valeur négative d'un coefficient dans le modèle ajusté indique la capacité de son facteur associé à réduire la réponse, tandis que le signe positif montre la capacité d'un facteur à augmenter la variable de réponse [436]. Dans cette étude, l'objectif était d'augmenter l'effet antimicrobien synergique et le DPPH-IC₅₀, c'est-à-dire de minimiser leurs valeurs et d'augmenter la teneur totale en polyphénols, c'est-à-dire de maximiser sa valeur.

II.3.5 Effet des composants des mélanges et de leurs interactions sur les réponses.

Le miel, la propolis et le pollen d'abeille possèdent une variété de composés bioactifs tels que des acides phénoliques, des flavonoïdes, des esters et des terpénoïdes qui présentent une capacité antioxydante interactive [437]. De plus, l'activité antimicrobienne combinée des produits de la ruche a montré des effets synergiques, entraînant des résultats plus élevés que ceux des composants unitaires [438]. Bien que leurs mélanges puissent être modifiés par des interactions synergiques, additives ou antagonistes entre ces composants, ce qui peut influencer les effets biologiques [439].

II.3.5.1 Effet des composants des mélanges sur l'activité antioxydante.

L'activité antioxydante des mélanges des extraits du miel, la propolis et le pollen d'abeille a été déterminée par le dosage de la teneur en polyphénols et en utilisant le test d'inhibition du radical DPPH, utilisée pour l'évaluation du pouvoir des substances susceptibles de fonctionner en tant qu'agents piègeurs de radicaux libres. Il s'agit d'une approche rapide, facile et abordable [440], [441].

Cependant, on a également obtenu des valeurs significatives par rapport à leur composant individuel en TPC et DPPH-IC₅₀. Les proportions ternaires (expériences 7, 8 et 9) ont exprimé de manière significative des valeurs de la TPC et le DPPH-IC₅₀ de 226 mg AGEq/g et 10,15 µg/ml respectivement, par rapport à leurs composants pris séparément ou en combinaisons binaires. Une étude similaire menée par Baj et ses collaborateurs a révélé que le potentiel antioxydant mesuré dans les mélanges ternaires donnait des résultats supérieurs à l'échantillon pur [442] et les mélanges issus des extraits de plantes présentaient des valeurs de TPC élevées, supérieures à celles des extraits individuels [443]. Les termes statistiquement significatifs confirment que les réponses antioxydantes dépendent de tous les termes d'un modèle mathématique adapté.

Les modèles mathématiques estimés reliant ainsi les réponses aux proportions des extraits de miel, de propolis et de pollen d'abeille sont représentés par les équations suivantes :

$$Y_{\text{TPC}} = 7,35X_2 + 5,6X_{12} + 2,24X_{23} + 4,95X_{123} + \epsilon \quad \text{Eq 28}$$

$$Y_{\text{DPPH-IC}_{50}} = 67,90X_1 + 37,47X_2 + 122,40X_3 - 272,8X_{13} - 232,71X_{23} + \epsilon \quad \text{Eq 29}$$

II.3.5.2 Effets des composants du mélange sur l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli* a été représentée respectivement par $CMI_{S.aureus}$ et $CMI_{E.coli}$. Les coefficients statistiquement significatifs étaient les termes linéaires : $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$; le terme d'interaction binaire α_{12} , tandis que le terme d'interaction ternaire α_{123} était significatif uniquement pour $CMI_{E.coli}$, comme détaillé dans le Tableau 27.

On a observé que les extraits réalisés avec les mélanges ternaires des extraits éthanoliques du miel, de la propolis, de et du pollen d'abeille étaient les plus efficaces contre les souches testées, montrant une diminution significative de l'inhibition pour les deux souches, bien plus importante que celle observée pour les extraits uniques ou les combinaisons binaires. Les CMI's les plus élevées étaient de 11,75 $\mu\text{g/ml}$ et de 23,43 $\mu\text{g/ml}$ obtenues respectivement contre *S. aureus* et *E. coli*. (Figures 85).

Dans la présente étude, les extraits éthanoliques du miel, propolis et pollen d'abeille ont montré une puissante activité antimicrobienne synergique lors de leur mélange. En effet le mécanisme de l'activité antimicrobienne de ces produits de la ruche est complexe et pourrait être attribué à l'activité synergique entre ses divers ingrédients bioactifs, tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, en particulier la galangine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique issus de ces produits apicoles, qui ont précédemment prouvé leur activité antimicrobienne dans de nombreuses études [444], [445], [446].

En conséquence, les modèles résultants des deux dépendances sont représentés comme suit :

$$Y_{MIC-S. aureus} = 95,08X_1 + 52,47X_2 + 367,81X_3 - 173,63X_{12} - 761,70X_{13} - 659,42X_{23} + \epsilon \quad \text{Eq 30}$$

$$Y_{MIC-E. coli} = 367,28X_1 + 196,83X_2 + 74228X_3 - 934,28X_{12} - 1905,85X_{13} - 1496,76X_{23} + 1721,1 X_{123} + \epsilon \quad \text{Eq 31}$$

II.3.6 Analyse des graphes des Mélanges

Les tracés de contour des mélanges illustrent comment chaque réponse est liée aux trois variables de conception continues (miel, propolis et pollen d'abeille), tout en maintenant les autres composants du modèle à des proportions spécifiques. Les tracés de contour permettent de visualiser la zone de compromis entre les nombreuses réponses. Les lignes des tracés de contour représentent la valeur de chaque réponse pour différentes proportions des variables étudiées.

II.3.6.1 Activité antioxydante

Le mélange ternaire des extraits des produits de la ruche étudiés composé du miel, de la propolis et du pollen d'abeille avec des proportions de (33% : 43% : 23%) respectivement, a présenté la

concentration la plus élevée en TPC qui a été de 228,28 mg AGEq/g), comme le montrent les Figures 85a et 85b. Tandis qu'un ratio composé de 21% du miel, 47 % de la propolis et 32 % du pollen d'abeille, a exprimé la meilleure concentration de 10,68 µg/ml en DPPH-IC₅₀ (Figures 85c et 85d). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui confirment que le miel enrichi avec pollen d'abeille améliore l'activité antioxydante en raison du remplacement d'une partie du miel par le pollen d'abeille [447]. Cependant une augmentation proportionnelle du contenu en molécules bioactives, due à l'ajout d'extrait de propolis, potentialise de plus en plus l'activité antioxydante et de l'inhibition antiradicalaire comme a été confirmé par Habryka et al. [448].

II.3.6.2 Activité Antibactérienne

Les extraits réalisés avec le mélange ternaire se sont révélés plus efficaces contre *S. aureus* et *E. coli* que les extraits mono-composants et les mélanges binaires (Figure 85). L'activité la plus élevée se trouvait au centre du triangle. L'analyse a montré que les valeurs optimales de CMI_{*S.aureus*} était de 4,34 µg/ml et de CMI_{*E.coli*} était de 5,70 µg/ml, ces valeurs ont été obtenues lorsque le mélange de miel, de propolis et de pollen d'abeille était réglé à (26 % : 52 % : 22 %) et (35 % : 40 % : 25 %) respectivement. Cette activité antimicrobienne pourrait être attribuée aux fortes concentrations de composés phénoliques [449]. On sait que ces composés peuvent affecter la croissance et le métabolisme des bactéries, ce qui conduit à la perturbation de l'intégrité de la paroi cellulaire, au blocage des canaux ioniques et à l'inhibition de la synthèse de l'adénosine triphosphate [450].

II.3.7 Optimisation simultanée des réponses étudiées

Dans le but de créer la zone optimale de mélange de produits de la ruche conduisant à l'amélioration simultanée de l'activité antioxydante, représentée par une teneur élevée en polyphénols et une forte inhibition des radicaux libres DPPH. Ainsi que des concentrations minimales d'inhibitrices contre *S. aureus* et *E. coli*, les zones de compromis des quatre réponses sur leur optimiseur d'iso-réponse commune ont été utilisées avec succès (Figure 86). Les points optimaux sont situés dans les zones maximales correspondant au mélange couvrant 36,33 % du miel, 28,54 % de propolis et 35,13 % de pollen d'abeille, avec une désirabilité de 99 %. Les valeurs attendues de TPC, de DPPH-IC₅₀, de CMI contre *S. aureus* et de CMI contre *E. coli* étaient respectivement de : 226,88 mg AGEq/g), 10,64 µg/ml, 4,68 µg/ml et 6,11 µg/ml.

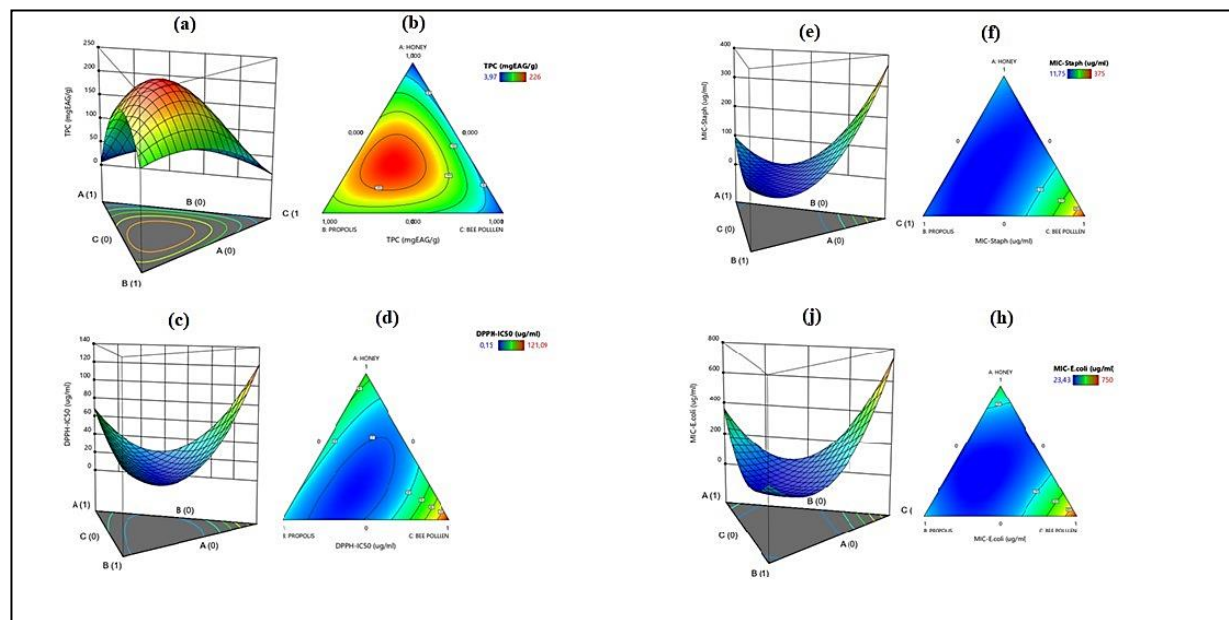


Figure 65: Graphes 2D et 3D des mixtures du miel, propolis et pollen d'abeille pour TPC (a,b), DPPH-IC₅₀ (c,d) et CMI *S. aureus* (e,f) et CMI *E. coli* (g,h), montrant la zone de compromis souhaitée .

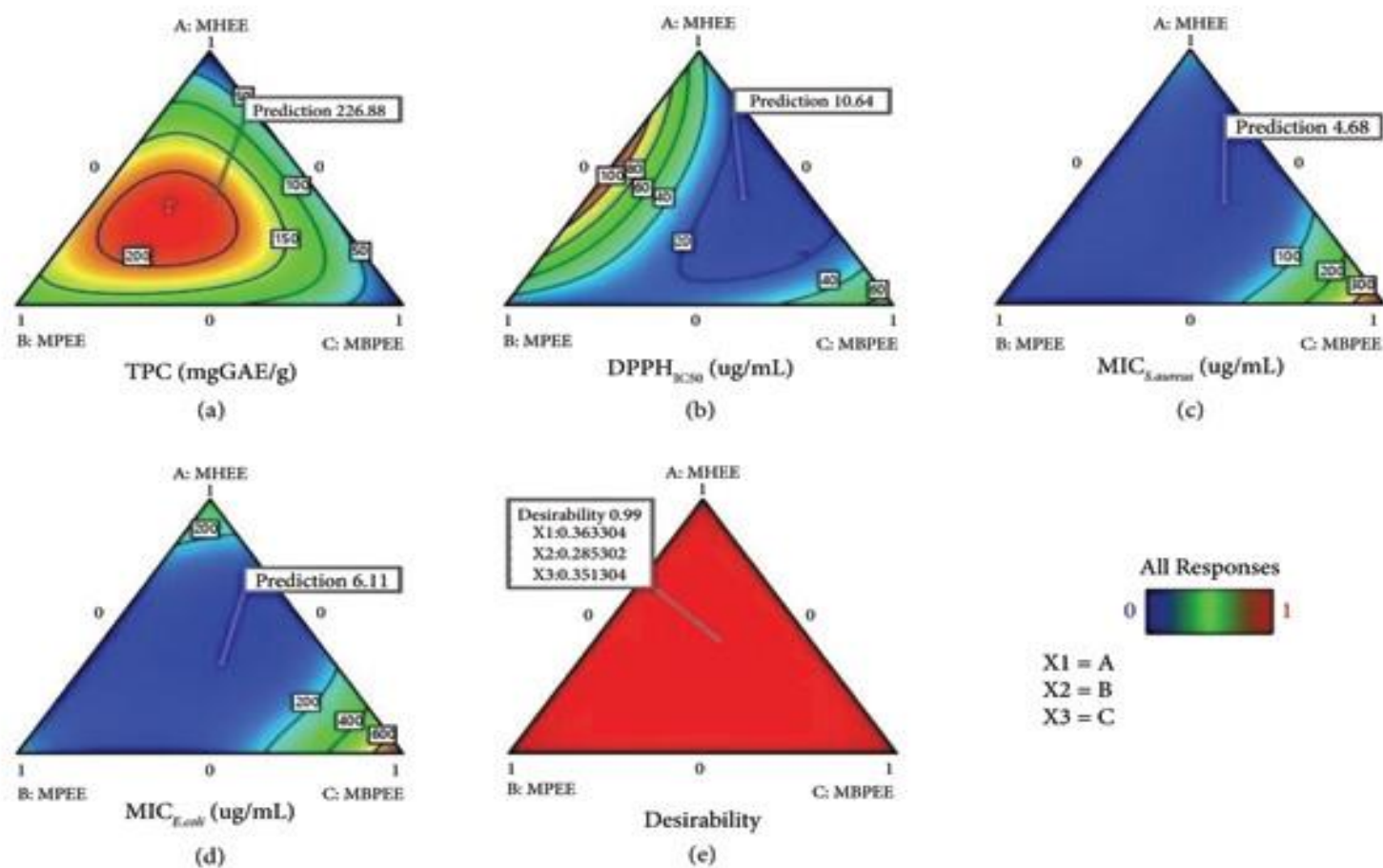


Figure 66: Graphe 2D de désirabilité montrant les proportions des produits de ruche étudiés menant aux valeurs optimales simultanées TPC (a), de DPPH-IC₅₀ (b) et CMI *S. aureus* et CMI *E. coli*

Conclusion

Dans la présente étude, le mélange ternaire d'extraits de miel, de propolis et de pollen d'abeille dans un rapport de (0,36 : 0,28 : 0,35), suggéré par le modèle postulé du centroïde augmenté, a permis d'améliorer sa teneur en composés phénoliques, son activité antioxydante en augmentant le taux de piégeage des radicaux libres et son effet antibactérien contre les souches testées de *S. aureus* et *E. coli*. En effet la combinaison des extraits des produits de la ruche a donné de meilleurs résultats que ceux fournis par les composants individuels, et la conception choisie de l'expérience a été utile pour étudier les relations entre les facteurs, les activités antioxydantes et antibactériennes, et pour prédire les valeurs optimales pour chaque réponse séparément et simultanément.

Cette recherche représente la première étude sur les mixtures ternaires des produits de la ruche Marocains, qui peut être étendue à d'autres combinaisons de produits apicoles pour obtenir des mélanges riches en composés phénoliques ayant une forte activité antioxydante et un potentiel effet antimicrobien, qui devraient être exploités de manière rationnelle dans le traitement des infections bactériennes pathogènes.

ETUDE IV

Évaluation *In-vivo* de l'effet du mélange binaire des extraits de la propolis Marocaine et des feuilles d'*Olea europaea* sur le diabète de type 2 induit par le fructose et la streptozotocine chez le rat : formulation par plan d'expériences

Résumé

La présente étude visait à explorer l'impact de la combinaison des extraits méthanoliques de la propolis Marocaine (EMPM) et de feuilles d'*Olea Europaea* (EMFOE) sur les changements dynamiques des principaux marqueurs biochimiques associés au DT2 chez les rats Wistar. L'étude s'est concentrée sur des paramètres tels que la glycémie à jeun (FBS), l'insulinémie, l'indice HOMA-IR, l'hémoglobine glyquée (HbA_{1C}) et le poids corporel (PC) des rats. En outre, un plan de mélange binaire, plus précisément le plan « simplex lattice design » a été utilisé pour optimiser l'activité anti-diabétique via l'optimisation des taux de changements des paramètres étudiés le long de la durée du protocole. Cependant l'analyse phytochimique préliminaire a révélé des teneurs totales en polyphénols et en flavonoïdes de 89,53 mgAGE/g -31,91 mg QE/g pour EMPM et 35,01 mg AGE/g et 18,99 mg QE/g pour l'EMFOE.

Le screening phénolique HPLC-DAD a permis d'identifier 14 composés phénoliques dans l'extrait de propolis, dont l'apigénine (0,342 mg/g), le kaempférol (0,310 mg/g) et l'épicatéchine (0,222 mg/g) étant les principaux composés majoritaires. Tandis que les feuilles d'*Olea Europaea* contenaient 6 composés phénoliques, l'oleuropéine étant la molécule la plus abondante avec une concentration de 29,91 mg/g.

Le protocole expérimental a obtenu une formulation de 49% d'EMPM et 51% d'EMFOE permettant d'atteindre des changements simultanément de 68,95 %, 148,08 %, 30,36 %, 23,00 %, et 19,24 % pour la glycémie, l'insulinémie, l'indice HOMA-IR, l'HbA_{1C} et le poids corporel des rats respectivement.

Résumé graphique

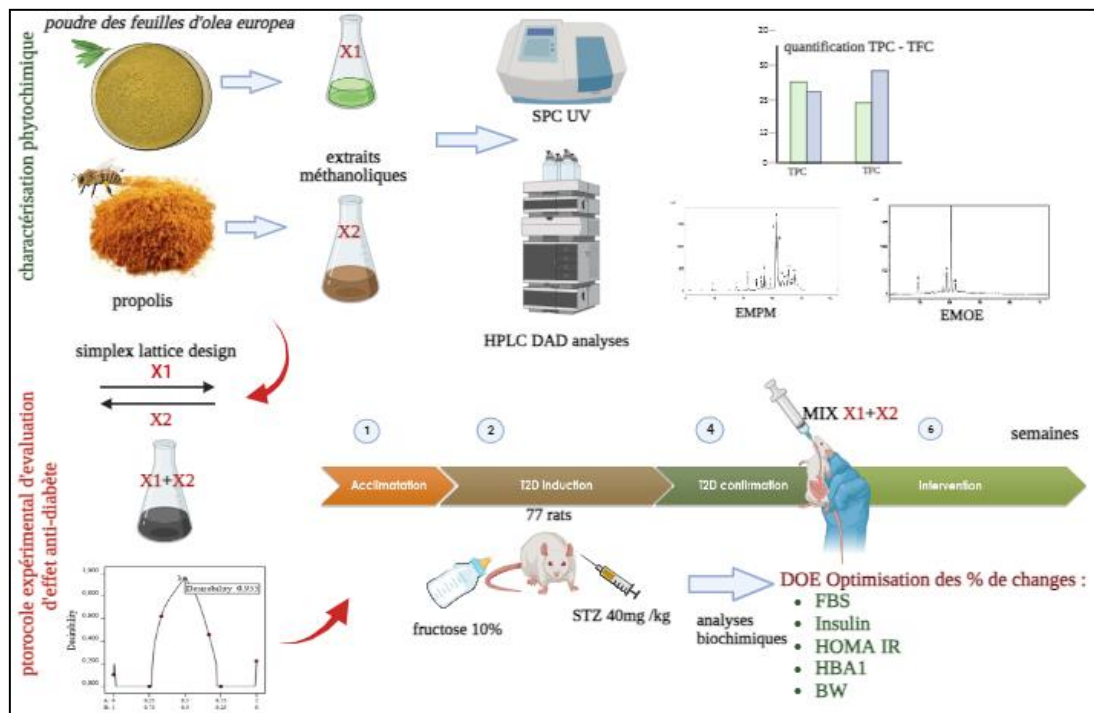


Figure 67: Schéma de l'évaluation *In-vitro* et *In-vivo* de l'activité anti-diabétique combinée des extraits de la propolis et les feuilles d'*Olea Europaea*

II.4 Résultat et discussions

II.4.1 Détermination de taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux

L'extrait méthanolique de la propolis étudiée a démontré des teneurs en TPC et TFC de 89,53 mg AGE/g et 31,91 mg QE/g. Ces valeurs sont en accord avec les données rapportées pour divers échantillons de propolis issus de différentes régions, présentant des TPC allant de 31,00 à 302,00 mg AGE/g [358], [451], [452], [453]. Toutefois, nos résultats en termes de TFC étaient nettement inférieurs à ceux observés pour les propolis de la Chine, pour lesquelles les TFC variaient de 105,25 à 351,25 mg QE/g [451]. Ces divergences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que l'origine géographique, la source botanique, les espèces d'abeilles mellifères, les conditions environnementales, le climat et la saison de collecte, ainsi que la méthode d'extraction [454], [455]. Concernant l'extrait des feuilles d'*Olea europaea*, les teneurs en TPC et TFC obtenus étaient respectivement de 35,01 mg AGE/g et 18,99 mg QE/g, par rapport aux autres cultivars. Une

comparaison des teneurs totales en polyphénols avec celles rapportées par d'autres études a révélé qu'elles étaient très cohérentes [456] .

Tableau 27 : Teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits de la propolis et des feuilles *d'Olea europaea*

Echantillon	TPC mg AGE/g	TFC mg QE/g
EMPM	89,53 ^a ±3,06	31,91 ^b ±2.32
EMFOE	35,01 ^a ±1,15	18,99 ^b ±1,02

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET de 2 répétitions. Dans la même colonne, les valeurs suivies de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (p < 0,05).

II.4.2 Screening phénolique

Les figures 88 -89 et le tableau 27 représentent les chromatogramme HPLC-DAD et les concentrations des composés phénoliques obtenues pour les extraits de la propolis et les feuilles *d'Olea europaea* marocaines, En effet l'EMPM a démontré sa haute teneur en polyphénols avec la présence de 14 composés différents dont l'apigénine était le composé majoritaire avec une concentration de 0,342 mg /g suivi du kaempférol, épicatechine ayant respectivement des concentrations de 0,310 et 0,222 mg /g. Ce résultat représente de point de vue qualitatif et quantitatif une empreinte spécifique pour la propolis marocaine confirmant les résultats de l'étude menée dans par Laaroussi et al [457] . Comparativement avec la propolis provenant des autres régions, la composition chimique varie considérablement, influencée par des facteurs tels que l'origine botanique, le climat, la race d'abeille, la saison de récolte et les méthodes d'extraction [458]. Cette diversité phytochimique est étroitement liée aux effets pharmacologiques et biologiques de ce produit de la ruche. Cependant des composés spécifiques ont démontré exercer des activités précises, par exemple l'apigénine, qui a montré son effet hypoglycémiant en stimulant le métabolisme du glucose et son transport dans les tissus périphériques. En outre, elle augmente la sécrétion d'insuline par le pancréas et prévient la destruction des cellules β, favorisant ainsi la libération d'insuline [459], [460]. De même, le kaempférol a démontré une vaste gamme d'activités pharmacologiques, notamment l'effet antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien, anticancéreux, cardioprotecteur, antidiabétique et neuroprotecteur [461], [462], [463].

Compte au EMFOE, il a démontré la présence de cinq composés phénoliques, avec l'oleuropéine comme composé majoritaire, présentant une concentration de 29,91 mg/g MS. Ensuite, l'hydroxytyrosol (2 mg/g MS), la lutéoléine (1,33 mg/g MS), la quercétine (0,88 mg/g MS), et la rutine (0,18 mg/g MS) ont été observés. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour les extraits de feuilles d'olivier en provenance de la Turquie, qui présentent un nombre similaire de composés lors du screening phénolique, mais avec des concentrations variables. En particulier, l'oleuropéine est le composé prédominant, avec des concentrations variant de 74 à 216 mg/g MS.[464]. Ces composés phénoliques ont démontré leurs bienfaits pour la santé, notamment l'effet hypocholestérolémiant chez les rats diabétiques, ce qui revêt une importance majeure pour prévenir les complications du diabète et les problèmes cardiovasculaires. Deux mécanismes possibles ont été suggérés pour expliquer l'effet hypoglycémique de l'Oleuropéine : l'amélioration de la libération d'insuline induite par le glucose et l'augmentation de l'absorption périphérique du glucose, aboutissant à une réduction de la glycémie circulante [465], [466].

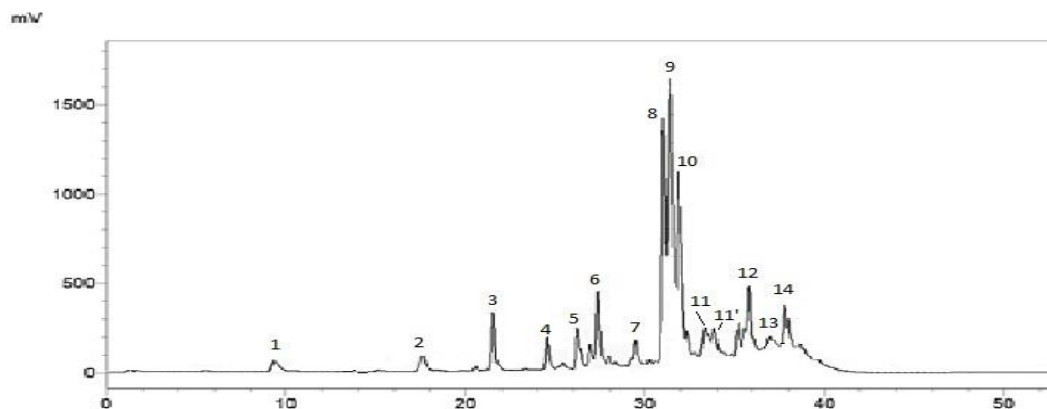


Figure 68 : Chromatogramme HPLC- DAD de l'extrait méthanolique de la propolis étudiée

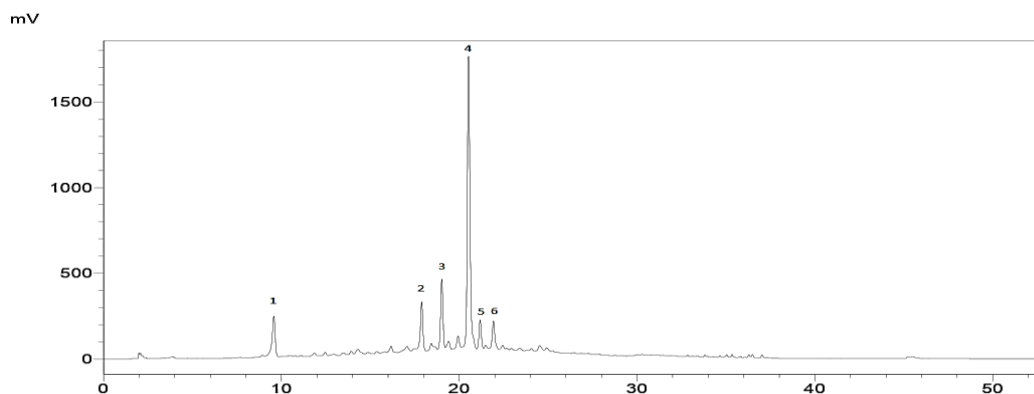


Figure 69 : Chromatogramme HPLC- DAD de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea Europaea*

Tableau 28: Composés phénoliques détectés par HPLC-DAD dans les extraits de la propolis et des feuilles d'*Olea europaea*

Echantillon	Composés phénoliques	Concentration (mg /g MS)
EMFO	1. Hydroxytyrosol	2,00± 0,05
	2. Quercétine	0,88± 0,09
	3. Rutine	0,18± 0,00
	4. Oleuropéine	29,91± 0,16
	5. Oleocanthal	0,71± 0,02
	6. Luteoline	1,33 ± 0,05
EMPM	1. Catéchine	Nd
	2. Acid vanilique	Nd
	3. Epicatechine	0,222 ± 0,00
	4. Acid o-coumarique	0,0008 ± 0,00
	5. Acid férulique	0,0002 ± 0,00
	6. Acid ellagique	0,055 ± 0,00
	7. Narginine	0,077± 0,00
	8. Hespéridine	0,098 ± 0,00
	9. Apigénine	0,342± 0,00
	10. Acid cinnamique	0,026 ± 0,00
	11. Resvératrol	0,023 ± 0,00
	12. Acid rosmarinique	0,037 ± 0,00
	13. Rutine	0,025 ± 0,00
	14. Gallo-catéchine	Nd
	15. Acide chlorogénique	0,015 ± 0,00
	16. Quercétine	0,029 ± 0,00
	17. Kaempferole	0,310± 0,00

s valeurs sont exprimées en moyenne ± ET de 3 répétitions. Dans la même colonne, les valeurs suivies de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$). Nd : non détecté

II.4.3 Validation statistique du modèle postulé

Tableau 29 : Matrice expérimentale des résultats obtenu pour les réponses étudiées

EX P	EMPM	EMFOE	Taux de changement en %				
			Glycémie	Insulinémie	HOMA-IR	HbA _{1C}	Poids corporel
1	1	0	63±2,32 ^a	52±2,78 ^a	42±1,77 ^a	14±0,34 ^a	18±0,08 ^a
2	0	1	66±2,60 ^a	62±2,35 ^a	46±2,02 ^a	29±0,93 ^a	17±0,02 ^a
3	0,5	0,5	68±2,91 ^a	145±6,32 ^{ab}	32±1,02 ^a	23±0,91 ^{ab}	21±0,09 ^{bc}
4	0,5	0,5	70±4,82 ^b	159±7,72 ^{bcd}	30±1,09 ^a	24±0,90 ^{bc}	19±0,08 ^{bc}
5	0,5	0,5	70±2,37 ^{bc}	142±6,16 ^{ab}	29±1,12 ^{bc}	21±0,89 ^{bc}	18±0,12 ^a
6	0,25	0,75	65±3,17 ^{bcd}	47±2,91 ^{bc}	48±2,0 ^{bc}	20±0,99 ^{bc}	17±0,11 ^a
7	0,75	0,25	45±2,32 ^b	66±3,30 ^{bc}	41±1,98 ^{ab}	10±0,96 ^{bc}	27±0,12 ^a
8	0,67	0,33	55±2,54 ^{bc}	130±5,31 ^{abc}	32±0,99 ^{bcd}	16±0,91 ^a	26±0,10 ^a
9	0,33	0,67	65±3,32 ^{bc}	70±5,90 ^{bcd}	43±1,32 ^{bc}	24±0,92 ^a	15±0,07 ^{bcd}

La matrice expérimentale obtenu par application du plan d'expériences choisi , simplex lattice design tableau 30 , a permis des variations significatives , dans les réponses étudiées, tout en variant les expériences de mélange , on a noté un taux de changement de la glycémie caudale de GLY : 45 - 70 %, et d'insulinémie de 47 à 159 %, l'indice HOMA IR de 29 à 46 % ,HbA₁C de 10 - 29 % et le poids corporel des rats qui a changé de 15 à 27 %, ces résultats confirment l'influence du mélange binaire fait des extraits de la propolis et les feuilles d'*Olea europaea* sur toutes les réponses

Selon les données du tableau 31 d'analyse de la variance, on déduit que l'effet principal de la régression est significatif pour les cinq réponses, étant donné que les valeurs de probabilité (p-value) sont toutes inférieures à 0,05. Les p-values sont spécifiquement de 0,0031, 0,01, 0,0034, 0,002 et 0,009 pour les réponses des taux de changements de la glycémie, l'insulinémie, l'indice HOMA-IR, HbA₁C et le poids corporel des rats, respectivement.

En outre, les modèles ne montrent pas de signes de manque d'ajustement, puisque les valeurs de F-value pour ce test sont supérieures à 0,05 dont les valeurs ont été de manière spécifique 0,15, 0,21, 0,32, 0,62 et 0,60 pour les réponses des taux de changements de la glycémie, l'insulinémie, HOMA-IR, HbA₁c et le poids corporel des rats respectivement.

Les coefficients de détermination sont extrêmement satisfaisants, avec des valeurs de 0,96, 0,95, 0,96, 0,97 et 0,94 respectivement pour les taux de changements de la glycémie, l'insulinémie, HOMA-IR, HbA₁C et le poids respectivement. Ces valeurs attestent d'une excellente concordance entre les données expérimentales et les valeurs prédites par le modèle ajusté cela est illustré par la courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prédites qui suit parfaitement une tendance linéaire (figure 90).

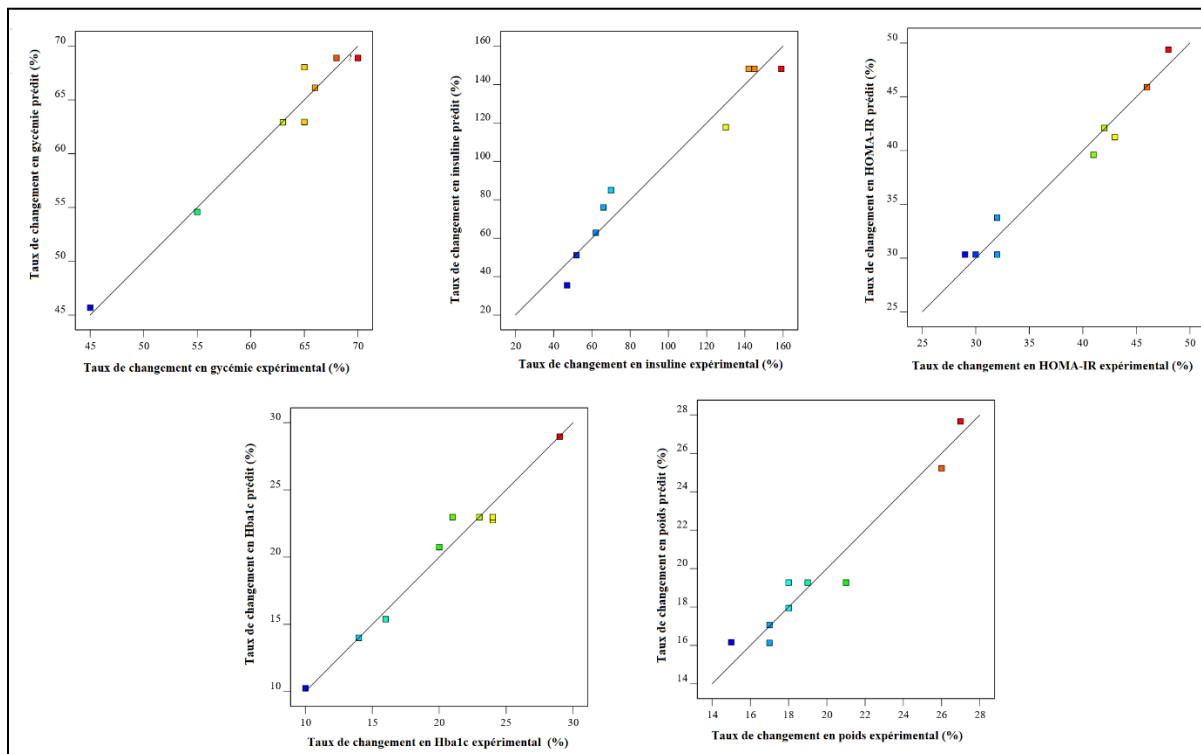


Figure 70: Courbes des valeurs observées en fonction des valeurs prédites pour les des taux de changements des marqueurs biologique du DT2

Tableau 30: Analyse de la variance des réponses étudiées. (DDL : Degré de liberté, SCE : SC : Somme des carrées, carrée moyen)

Réponse	Source	DDL	SC	CM	F-value	p-value
% de change Glycémie	Régression	4	510,72	127,68	29,56	0,0031
	Résidus	4	17,28	4,32		
	Manque d'ajustement	2	14,61	7,31	5,48	0,15
	Erreur pure	2	2,67	1,33		
	Totale	8	528			
	R²			0.96		
% de change Insulinémie	Régression	4	15927,15	3981,79	20,56	0,01
	Résidus	4	774,85	193,71		
	Manque d'ajustement	2	610,18	305,09	3,71	0,21
	Erreur pure	2	164,67	82,33		
	Totale	8	16702,00			
	R²			0.95		
% de change HOMA-IR	Régression	4	416,1878	104,0470	28,3100	0,0034
	Résidus	4	14,7011	3,6753		
	Manque d'ajustement	2	10,0344	5,0172	2,1502	0,32
	Erreur pure	2	4,6667	2,3333		
	Totale	8				
	R²			0.96		
% de change HbA1C	Régression	4	267,38	66,84	35,60	0,002
	Résidus	4	7,51	1,88		
	Manque d'ajustement	2	2,84	1,42	0,61	0,62
	Erreur pure	2	4,67	2,33		
	Totale	8	274,89			
	R²			0.97		
% de change Poids corporel	Régression	4	129,72	32,43	16,55	0,009
	Résidus	4	7,84	1,96		
	Manque d'ajustement	2	3,17	1,59	0,68	0,60
	Erreur pure	2	4,67	2,33		
	Totale	8	137,56			
	R²			0.94		

II.4.4 Effets des facteurs sur les modèles mathématiques des réponses étudiées

En se fondant sur les coefficients de détermination R^2 , nous avons pu identifier le meilleur modèle pour chaque réponse. Il s'avère que le modèle quartique a présenté le R^2 le plus élevé pour les cinq réponses examinées :

Les effets de tous les facteurs examinés, ainsi que les valeurs statistiques estimées et les probabilités observées (p-values), sont répertoriés dans le tableau 32. Permettant de déduire les effets suivants :

II.4.4.1 Effet sur le taux de changement de la glycémie :

Les coefficients statistiquement significatifs pour le taux de changement de la glycémie sont :

- Les coefficients des termes linéaires β_1, β_2 ,
- Les coefficients des termes d'interaction β_{12} et γ .

Le modèle mathématique retenu pour cette réponse est présenté par l'équation suivante :

$$Y = 62,92X_1 + 66,13X_2 - 83,56X_1X_2(X_1-X_2) - 287,95X_1X_2 (X_1-X_2)^2 + \epsilon \quad \text{Eq 32}$$

II.4.4.2 Effet sur le taux de changement d'insulinémie :

Les coefficients statistiquement significatifs pour la réponse taux de changement de l'insulinémie sont les coefficients des termes d'interaction β_{12} et γ .

Le modèle mathématique retenu pour la réponse taux de changement de l'insulinémie est présenté par l'équation (33) :

$$Y = 364,72X_1X_2 - 1485,79X_1X_2 (X_1-X_2)^2 + \epsilon \quad \text{Eq 33}$$

II.4.4.3 Effet sur le taux HOMA-IR :

D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- Les coefficients des termes linéaires β_1, β_2 .
- Les coefficients des termes d'interaction β_{12}, δ et γ .

Le modèle mathématique retenu pour la réponse taux de changement de l'indice HOMA-IR est présenté par l'équation (34) :

$$Y = 42,11X_1 + 45,89X_2 - 54,68X_1X_2 - 42,04X_1X_2(X_1-X_2) + 229,27X_1X_2 (X_1-X_2)^2 + \epsilon \quad \text{Eq 34}$$

II.4.4.4 Effet sur le taux de changement de l'HbA1c

D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- Les coefficients des termes linéaires β_1, β_2 .

- Le coefficient du terme d'interaction γ .

Le modèle mathématique retenu pour le taux de changement de l'HbA₁C est présenté par l'équation (35) :

$$Y = 14X_1 + 28,96X_2 - 151,65X_1X_2 (X_1-X_2)^2 + \varepsilon \quad \text{Eq 35}$$

II.4.4.5 Effet sur le taux de changement du poids corporel des rats :

D'après ce tableau, les coefficients statistiquement significatifs sont :

- Les coefficients des termes linéaires β_1, β_2
- Les coefficients des termes d'interaction δ .

Le modèle mathématique retenu pour la réponse taux de changement du poids corporel des rats est présenté par l'équation (36) :

$$Y = 17,94X_1 + 17,06X_2 + 59,17X_1X_2(X_1-X_2) + \varepsilon \quad \text{Eq 36}$$

Tableau 31: Coefficients des modèles mathématiques postulés

Coefficient	Terme	Glycémie		Insulinémie		HOMA-IR		HbA _{1c}		Poids corporel	
		Est.	p-value	Est.	p-value	Est.	p-value	Est.	p-value	Est.	p-value
A	β_1	62,92	0,009*	51,19	0,44	42,11	0,024*	14,00	0,001*	17,94	0,014*
B	B_2	66,13	0,009*	62,87	0,44	45,89	0,024*	28,96	0,001*	17,06	0,014*
AB	β_{12}	17,50	0,077	364,72	0,002*	-54,68	0,001*	5,98	0,288	7,07	0,229
AB(A-B)	δ	-83,56	0,004*	247,33	0,06	-42,04	0,034*	-16,09	0,164	59,17	0,004*
AB(A-B) ²	γ	-287,95	0,001*	-1485,79	0,004*	229,27	0,003*	-151,65	0,003*	65,50	0,058

II.4.5 Optimisation des réponses étudiées

Les résultats d'optimisation les combinaisons d'extraits de la propolis et des feuilles d'*Olea europaea* qui offrent les meilleurs résultats en termes de taux de changement des marqueurs biochimiques étudiés du diabète de type 2 sont représentés dans la figure 91.

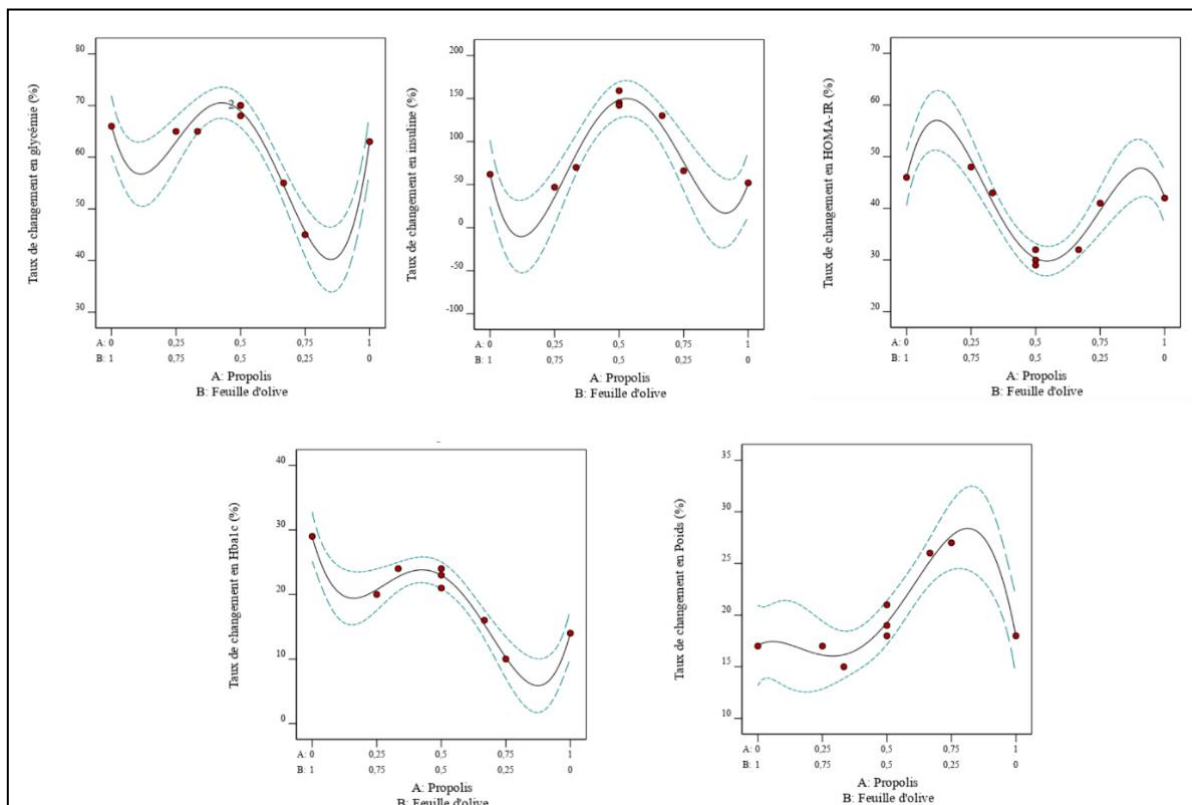


Figure 71 : Graphique de mélange binaire qui montre la zone de maximisation du taux de changement des cinq réponses Glycémie, Insulinémie, HOMA-IR, HbA1c et Poids corporel.

II.4.5.1 Optimisation du taux de changement de la glycémie

Selon le profil de mélange binaire relatif au taux de changement de la glycémie, il est possible d'obtenir un taux de réduction d'environ 70% de la glycémie en utilisant un mélange la combinaison suivante :

- Une proportion de propolis comprise entre 38 % et 45 %.
- Une proportion d'extraits d'*Olea europaea* située entre 55 % et 62 %.

II.4.5.2 Optimisation du taux de changement d'insulinémie.

D'après le profil de mélange binaire pour la réponse taux de changement d'insuline), il est possible d'obtenir un taux de changement d'environ 148 % en utilisant un mélange binaire composé de :

- Une proportion d'extrait de la propolis entre 50 % et 53 %.
- Une proportion d'extraits de feuille d'*Olea europaea* entre 47 % et 50 %.

II.4.5.3 Optimisation du taux de changement de HOMA-IR.

D'après le profil de mélange binaire de la réponse taux de changement de HOMA-IR (figure 93), on peut voir qu'on peut atteindre une réduction d'environ 56% de cette réponse en assurant un mélange binaire constitué de :

- Une proportion de propolis entre 9 et 12%.
- Une proportion d'extraits de feuilles d'*Olea europaea* entre 88 et 91%

II.4.5.4 Optimisation du taux de changement de HbA₁C.

D'après le profil de mélange binaire de la réponse taux de changement de HbA₁C (figure 94), on peut obtenir une valeur optimale de réduction de 28% si et seulement si en assure un traitement par les extraits d'*Olea Europaea* uniquement.

II.4.5.5 Optimisation du taux de changement de poids corporel des rats.

En se référant au profil de mélange binaire de la réponse « taux de changement de poids corporel » (figure 9), on peut voir qu'on peut atteindre une réduction d'environ 28%, en assurant un mélange binaire constitué de :

- Une proportion d'extrait de la propolis entre 79 et 82%.
- Une proportion d'extrait d'*Olea europaea* entre 18 et 21%.

II.4.6 Étude de la désirabilité

En utilisant la fonction de désirabilité, on peut connaître les valeurs optimales exactes des proportions des deux constituants menant à une valeur maximale des taux de changements des marqueurs biochimiques du DT2.

II.4.6.1 Réponse taux de changement de la glycémie

La figure 92 indique que la valeur maximale du taux de réduction de la glycémie qu'on pourrait atteindre est d'environ 70,52% avec une désirabilité de l'ordre de 100% en assurant les conditions opératoires suivantes :

- Une proportion de l'extrait de la propolis de 43,5%
- Une proportion d'extraits de feuilles d'*Olea Europaea* de 56,5 %

II.4.6.2 Réponse taux de changement d'insulinémie

La figure 93 indique que la valeur maximale du taux de réduction de l'insuline qu'on pourrait atteindre est d'environ 149,89%. L'atteinte de cette valeur est possible avec une désirabilité de l'ordre de 92% en assurant les conditions opératoires suivantes :

- Une proportion de propolis de 53%
- Une proportion d'extraits de *d'Olea europaea* 47%

II.4.6.3 Réponse taux de changement de la réponse HOMA-IR

La figure 94 indique que la valeur maximale du taux de réduction la réponse HOMA-IR qu'on pourrait atteindre est d'environ 57%. L'atteinte de cette valeur est possible avec une désirabilité de l'ordre de 100% en assurant les conditions opératoires suivantes :

- Une proportion de propolis de 11%
- Une proportion d'extraits de feuilles *d'Olea europaea* de 89%

II.4.6.4 Réponse taux de changement de la réponse HbA1c

La figure 95 indique que la valeur maximale du taux de réduction de la réponse HbA1c qu'on pourrait atteindre est d'environ 28,96%. L'atteinte de cette valeur est possible avec une désirabilité de l'ordre de 99% en assurant les conditions opératoires suivantes :

- Une proportion de propolis de 0%
- Une proportion d'extraits de feuilles *d'Olea europaea* 100%

II.4.6.5 Réponse taux de changement du poids corporel des rats.

La figure 96 indique que la valeur maximale du taux de réduction du poids corporel des rats qu'on pourrait atteindre est d'environ 28,35%. L'atteinte de cette valeur est possible avec une désirabilité de l'ordre de 100% en assurant les conditions opératoires suivantes :

- Une proportion d'extrait de la propolis de 80%
- Une proportion d'extrait des feuilles *d'Olea europaea* 20%.

PARTIE EXPERIMENTALE

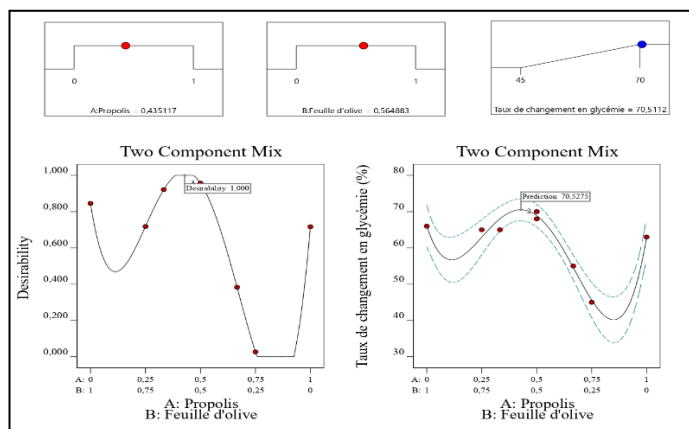


Figure 72 : Profil de désirabilité du mélange optimal d'EMPM et d'EMFOE pour maximiser le taux changement de la glycémie

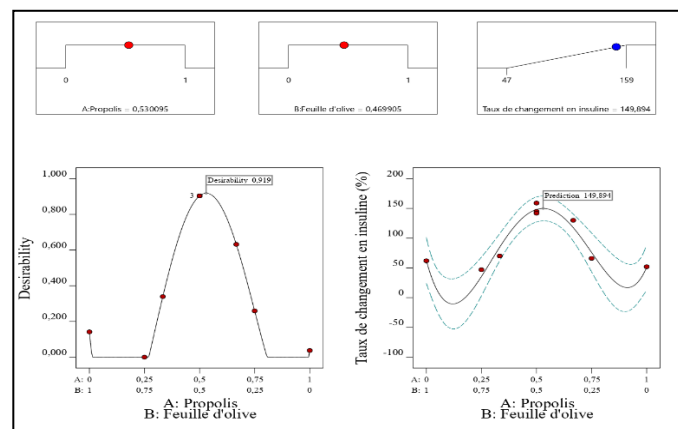


Figure 73 : Profil de désirabilité du mélange optimal d'EMPM et d'EMFOE afin de maximiser le taux changement de l'insulinémie

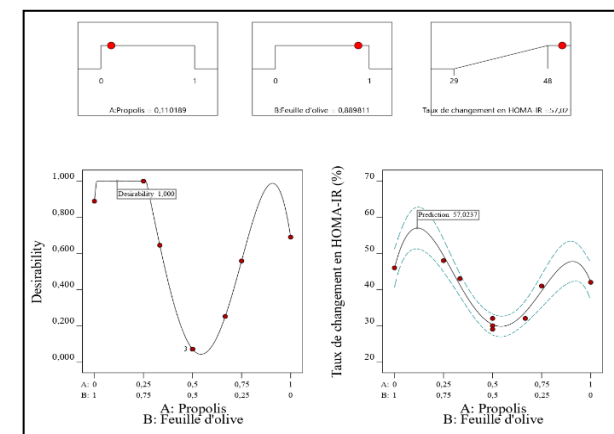


Figure 74 : Profil de désirabilité du mélange optimal d'EMPM et d'EMFOE afin de maximiser le taux changement la réponse HOMA-IR.

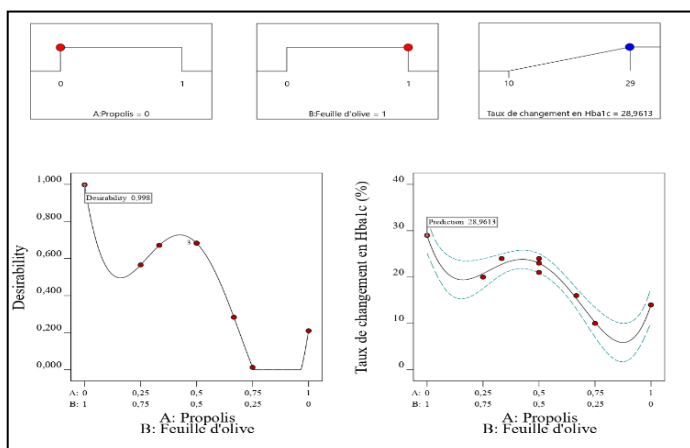


Figure 75 : Profil de désirabilité du mélange optimal optimal d'EMPM et d'EMFOE de maximiser le taux changement de la réponse HbA1c

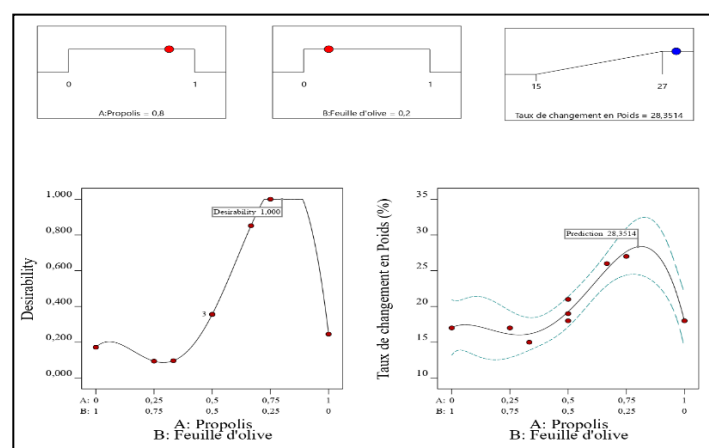


Figure 76 : Profil de désirabilité du mélange optimal optimal d'EMPM et d'EMFOE afin de maximiser le taux changement du poids corporel

II.4.6.6 Optimisation simultanée des réponses étudiées.

Grace à la fonction désirabilité, nous pouvons chercher les conditions d'optimisation des cinq réponses simultanément. Ainsi nous pouvons trouver le mélange optimal capable de maximiser les taux de changement des réponses telles que la glycémie, insulínémie, HOMA-IR, HbA1C et le poids corporel des rats avec une meilleure désirabilité. Cette opération est d'autant plus faisable si les réponses ont les mêmes tendances d'optimisation et permettent ainsi d'obtenir un pourcentage de désirabilité proche de 100%. Cependant, dans notre cas, les cinq réponses n'ont pas les mêmes tendances, donc on doit choisir les réponses auxquelles donner la priorité dans l'optimisation simultanée. Pour cela on a choisi les deux réponses taux de changement en glycémie et en insulínémie comme réponses prioritaires puis on a cherché le mélange optimal des extraits de la propolis/feuilles des feuilles d'*Olea Europaea* qui maximise ces deux réponses tout en gardant un niveau acceptable pour les trois autres réponses.

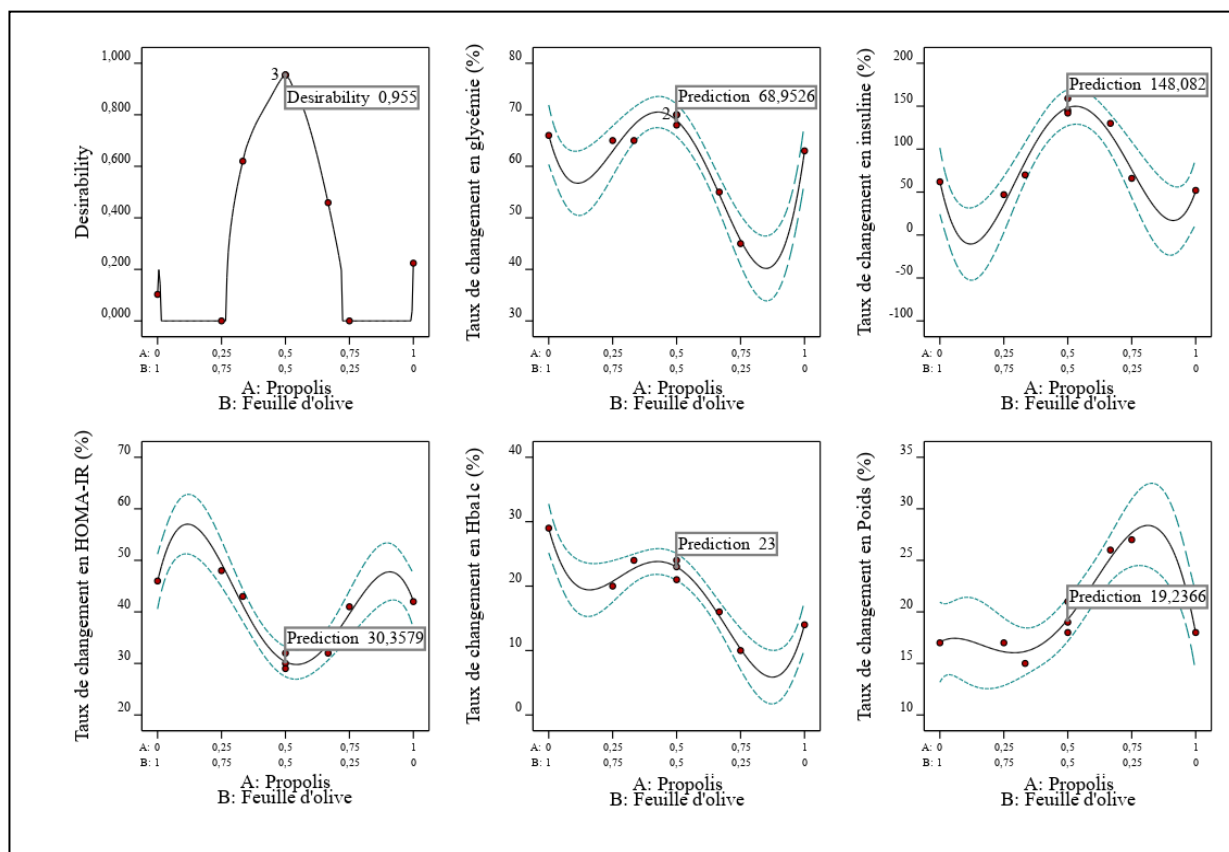


Figure 77 : Graphe de désirabilité simultanée des taux de changement des marqueurs biochimiques du DT2 en administrant le mélange binaire optimal d'EMPM et d'EMFOE

En se basant sur ce graphe, avec une désirabilité de 95,5 % (figure 97), on peut obtenir simultanément des taux de changement de 68,95%, 148,08%, 30,35%, 23% et 19,23% pour la

glycémie, l'insulinémie, HOMA-IR, HbA_{1C} et le poids corporel des rats respectivement, en assurant un mélange binaire constitué de 49% d'extraits de la propolis et 51% d'extraits de feuilles d'*Olea europaea*.

Tableau 32: Désirabilité de l'optimisation simultanée des réponses étudiées

Désirabilité (%)	EMP	EMFO	Taux de changement en %				
			Glycémie	Insulinémie	HOMA-IR	HbA _{1C}	Poids corporel
95,5	0,49	0,51	68,95	148,08	30,36	23,00	19,24

II.4.7 Discussion

Dans cette étude, le diabète de type 2 associé à la résistance à l'insuline a été induit chez les rats par un régime alimentaire additionné de 10% de fructose, suivi par l'administration d'une faible dose de la streptozotocine (40 mg/kg, ip). Ce modèle est conçu pour simuler le DT2 chez l'être humain [467], [468]. La confirmation de l'induction du diabète chez les rats a été établie à travers l'observation de l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et la défaillance des cellules β pancréatiques [469].

On note qu'aux premiers jours, une mortalité des rats d'environ 22% a été observé. Cela pourrait être attribué à une hypoglycémie sévère causée par la libération d'insuline après la destruction excessive des cellules β et la toxicité de la streptozotocine [470].

Les rats modèles du DT2 ont démontré une augmentation des taux de glucose plasmatique, d'insuline et d'HbA_{1C} chez les rats diabétiques, ce qui est cohérent avec des études ultérieures [471]. Parallèlement, l'indice HOMA-IR a diminué chez les rats diabétiques. Ces résultats confirment la mise en place de la résistance à l'insuline et du DT2 chez ces animaux [472]. Cet état de résistance à l'insuline peut être attribuée à divers mécanismes, tels que, la stimulation de la synthèse du glycogène par l'insuline est affectée [473]. De même, le stress oxydatif causé par la STZ induit la peroxydation des lipides, ce qui entraîne une altération de la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique [474] et un apport par excès des lipides des sucres perturbe leur métabolisme ce qui accumule les acides gras dans les muscles et le foie, contribuant ainsi à une résistance secondaire à l'insuline [475].

Les résultats de cette étude ont mis le point sur l'effet significatif de la combinaison d'EMPM et d'EMFOE, observant des variations notables dans différents marqueurs du diabète et de la toxicité induite par la STZ. Expérimentalement, l'utilisation d'un mélange binaire composé d'extraits

équivalents formulés par les extraits de la propolis et les feuille d'*Olea Europaea* a démontré des améliorations remarquables au niveau de la glycémie et de l'insuline, avec des taux de changement atteignant respectivement 70 % et 159 % en 6 semaines. Par ailleurs, les mixtures les plus efficaces pour obtenir les meilleurs pourcentages de changement pour l'indice HOMA et le poids corporel de 48% et 27% respectivement ont été identifiés dans les proportions de 0,25/0,75 et 0,75/0,25 de EMPM et EMFOE successivement.

L'application du plan d'expérience a permis l'optimisation de ces changements pour chaque réponse individuelle et simultanée permettant ce qui suit :

- ✓ Une réduction de la glycémie d'environ 70,52% en utilisant des proportions de 43,5% de l'EMPM et 56,5 % d'EMFOE
- ✓ Une diminution de la sécrétion d'insuline de 149,89% en utilisant un mélange binaire composé des 53%de EMPM et 47% d'EMFOE
- ✓ Amélioration de l'indice HOMA-IR et d'HbA_{1c} d'environ 56% et 28,96% respectivement en assurant un mélange binaire constitué de 11% de EMPM et 89% d'EMFOE.
- ✓ Reduction du poids corporels de 28,35% par la formulation de 80% d'EMPM et 20%d'EMFOE

Cependant une mixture composée de 49 % EMPM et 51 % EMFOE a permis d'atteindre des changements simultanément de 68,95 %, 148,08 %, 30,36 %, 23,00 %, et 19,24 % pour la glycémie, l'insuline, l'indice HOMA-IR, l'HbA_{1c} et le poids corporel, respectivement.

D'après nos recherches, la combinaison des extraits de la propolis et des feuilles d'*Olea Europaea* pour l'amélioration des marqueurs du DT2 n'avait encore jamais été explorée.

L'utilisation exclusive des extraits de feuilles d'olivier, a démontré une diminution de la glycémie et de l'insuline sans aucun effet sur le poids corporel [476] . Par ailleurs, la supplémentation de la nourriture des rats avec 30 % d'extrait de la propolis a montré une réduction de la glycémie de 3,93 à 1,54 mg/l, équivalent à un changement de 60,8%[477] . En outre, une administration par voie orale de 50 à 100 mg/kg par jour de l'extrait de la propolis pendant 15 jours aux rats diabétiques a significativement réduit les niveaux de glycémie et le poids corporel [478] .

L'action anti-hyperglycémique des feuilles d'*Olea europaea* et de la propolis est principalement attribuable à leurs composés phénoliques, notamment l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, qui démontrent une efficacité pour améliorer la sensibilité à l'insuline, réduire la glycémie à jeun et stimuler la libération d'insuline en réponse au glucose [479], [480]. De plus, les composés bioactifs principalement la galangine, l'apigénine et la quercétine sont responsables de l'activité antioxydante et l'effet hypoglycémiant de la propolis en luttant contre le stress oxydatif causé par

la STZ au niveau du pancréas [479], [480], [481] . Ainsi que ces composés phénoliques agissent sur les voies de signalisation du diabète, tel que l'acide caféique qui a amélioré la résistance à l'insuline grâce à la modulation de la voie de signalisation JNK et NF- κ B chez les rats modèles [482] . Ainsi, une combinaison de ces deux composés naturels potentialise davantage leur efficacité antidiabétique [483], [484], [485].

La propolis exerce son activité antioxydante et son effet hypoglycémiant principalement grâce à des composés tels que la galangine, l'apigénine et la quercétine [479], [480], [481] . Ces substances agissent sur les voies de signalisation associées au diabète. Par exemple, l'acide caféique a démontré une amélioration de la résistance à l'insuline en modulant les voies de signalisation JNK et NF- κ B chez les rats modèles de diabète [482]. Ainsi, une synergie entre ces composés naturels permet de potentialiser leur efficacité antidiabétique [483], [484], [485].

Conclusion

La formulation d'un mélange optimisé à base d'extraits de la propolis et les feuilles d'*Olea europaea*, deux produits naturels riches en composés bioactifs aux propriétés médicinales variées, a permis d'améliorer l'efficacité de leur activité antidiabétique synergique en utilisant la méthodologie du plan d'expérience.

Cette recherche a montré des résultats prometteurs qui pourraient contribuer au développement de nouveaux mélanges à base de produits naturels à haute valeur thérapeutique, en optimisant les mélanges et l'effet pharmacologique.

Cependant, l'exploitation de ces résultats nécessite des recherches supplémentaires, en particulier des études cliniques utilisant des extraits standardisés qui garantissent la reproductibilité des propriétés pharmacologiques et facilitent la transposition des observations issues de nombreuses études *In-vivo* à des applications humaines.

L'objectif principal de ce travail était la contribution à la valorisation des produits de la ruche issus de la région Fès Meknès via l'utilisation des outils d'optimisation par plan d'expériences pour obtenir des extraits optimisés avec de meilleurs effets biologiques. En fait, le miel, la propolis et le pollen d'abeille sont les produits de la ruche les plus consommés au Maroc et qui représentent un exemple caractéristique des aliments fonctionnels et des sources naturelles de composés bioactifs. Récemment, plusieurs études ont été entreprises pour évaluer leurs activités pharmacologiques, englobant celles antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydante, anticancéreuse, immunomodulatrice, antidiabétique, hypolipidémique et anti-allergique. Ces propriétés biologiques sont indéniablement attribuables à la diversité des antioxydants qu'ils comportent.

Les résultats rapportés dans ce manuscrit mettent en évidence en premier lieu la caractérisation physico-chimique des propolis, du miel et du pollen d'abeille issus de la région Fès- Meknès et leur screening phénolique par HPLC-DAD démontrant une variété des composés bioactifs appartenant à divers groupes phénoliques simples et complexes dans leur extraits et en deuxième lieu l'exploitation des plans d'expériences initialement au criblage des facteurs qui influencent l'extraction par ultrason de la propolis. A cet effet le plan expérimental « *Box-Behnken design* » appliqué a permis d'identifier les facteurs qui impactent ce procédé qui sont le temps d'extraction, la concentration du solvant d'extraction et le rapport solvant/propolis et qui ont conduit à un rendement d'extraction, des teneurs en polyphénols et flavonoïdes notables et une activité antioxydante significative, démontrant le rôle crucial de ce plan expérimental pour amélioration de l'efficacité du processus d'extraction tout en réduisant les coûts et le nombre d'expériences nécessaires.

Par ailleurs, l'application du plan de surface de réponse « *simplex centroïde design* » pour la formulation des mixtures ternaires à base du miel, propolis et pollen d'abeilles dans les proportions de 0,36 : 0,28 : 0,35 respectivement, a permis d'obtenir une teneur accrue en composés phénoliques et elle a également améliorée l'activité antioxydante en augmentant le taux de piégeage des radicaux libres et a démontré des effets antibactériens significatifs contre *S. aureus* et *E. coli*.

En dernier lieu, on a opté pour l'optimisation de l'effet anti-diabétique d'une formulation à base des extraits de la propolis et des feuilles d'*Olea europaea*, pour cela une application du plan de mélange binaire « *simplex Lattice design* » a permis d'obtenir des mixtures dotées d'une activité anti diabétique considérable du diabète type 2 induit *In-vivo* par la Streptozotocine, tout en améliorant les taux de changements des marqueurs biologiques tel que la glycémie, HbA_{1C},

HOMA-IR et l'insulinémie. Ceci plaide en faveur du maintien de l'hémostase glucidique chez les rats modèles du diabète type 2.

Les travaux de cette thèse démontrent clairement que les outils mathématiques représentés par les plans d'expériences peuvent s'inscrire dans une démarche scientifique et technique originale visant une meilleure compréhension et représentation des phénomènes chimiques et biologiques et que les techniques expérimentales conventionnelles couplées aux outils statistiques permettent de développer des méthodes innovantes, rapides et peu coûteuses pour une meilleure valorisation des produits de la ruche.

Par ailleurs, ces produits ne sont toujours pas incorporés dans l'utilisation thérapeutique clinique en raison de plusieurs facteurs, notamment le manque de normalisation de leur composition, qui dépend fortement de plusieurs paramètres (c'est-à-dire la zone géographique, les conditions climatiques, les plantes, les méthodes utilisées pour l'extraction et l'analyse de qualité, etc.) ; la rareté des données concernant la sécurité, l'allergie et la toxicité liées à leur utilisation ou leur efficacité thérapeutique provenant d'études cliniques. D'autres études sont donc absolument nécessaires pour :

- ✓ Normaliser les protocoles d'extraction et d'analyse de qualité de ces matrices alimentaires,
- ✓ Évaluer la biodisponibilité et le métabolisme des formulations des produits de la ruche
- ✓ Combiner les molécules bioactives issues des produits de la ruche et celles synthétiques
- ✓ Optimisation d'autres techniques innovantes d'extraction (Micro-ondes, Extraction par fluides supercritiques, extraction par solvants eutectiques profonds...)
- ✓ Extension d'application des PEX pour les autres produits de la ruche et évaluer les effets de leur
- ✓ Formulations pour d'autres activités biologiques (antivirale, anti-inflammatoire, antitumorale etc);
- ✓ La combinaison entre les plans d'expériences et d'autres outils de l'intelligence artificielle pour l'optimisation et la formulation

Une connaissance et une compréhension plus approfondies de ces produits de la ruche pourraient être d'une importance cruciale pour promouvoir leur utilisation dans la médecine moderne, pour la prévention des pathologies les plus courantes, et pour découvrir de nouveaux produits pharmaceutiques naturels pour le traitement de plusieurs maladies, en combinaison avec des thérapies classiques.

- [1] L. Cornara, M. Biagi, J. Xiao, and B. Burlando, "Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products," *Front Pharmacol*, vol. 8, no. JUN, p. 261216, Jun. 2017, doi: 10.3389/FPHAR.2017.00412/BIBTEX.
- [2] J. M. Sforcin, V. Bankova, and A. K. Kuropatnicki, "Medical Benefits of Honeybee Products," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/2702106.
- [3] B. Olas, "Bee Products as Interesting Natural Agents for the Prevention and Treatment of Common Cardiovascular Diseases," *Nutrients*, vol. 14, no. 11, Jun. 2022, doi: 10.3390/NU14112267.
- [4] P. M. Fratellone, F. Tsimis, and G. Fratellone, "Apitherapy Products for Medicinal Use," <https://home.liebertpub.com/acm>, vol. 22, no. 12, pp. 1020–1022, Dec. 2016, doi: 10.1089/ACM.2015.0346.
- [5] S. Trumbeckaite, J. Dauksiene, J. Bernatoniene, and V. Janulis, "Knowledge, Attitudes, and Usage of Apitherapy for Disease Prevention and Treatment among Undergraduate Pharmacy Students in Lithuania," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/172502.
- [6] W. A. Weis *et al.*, "An overview about apitherapy and its clinical applications," *Phytomedicine Plus*, vol. 2, no. 2, p. 100239, May 2022, doi: 10.1016/J.PHYPLU.2022.100239.
- [7] S. Przemysław *et al.*, "Apitherapy – the medical use of bee products," *Journal of Education, Health and Sport*, vol. 9, no. 8, pp. 384–396, Aug. 2019, doi: 10.5281/zenodo.3376968.
- [8] J. M. Alvarez-Suarez, "Bee products - chemical and biological properties," *Bee Products - Chemical and Biological Properties*, pp. 1–306, Sep. 2017, doi: 10.1007/978-3-319-59689-1/COVER.
- [9] S. Touzani *et al.*, "In Vitro Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties," *Biomed Res Int*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4836378.
- [10] M. Thibault and M. Thibault Le, "Le pollen apicole : ses propriétés et ses utilisations thérapeutiques", Accessed: Mar. 03, 2023. [Online]. Available: <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>
- [11] BABIN Marie, "La gelée royale, de son origine à sa valorisation pharmaceutique," 2014. Accessed: Mar. 03, 2023. [Online]. Available: <https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20082238/2015PPHA5057/fichier/5057F.pdf>
- [12] P. Choudhary *et al.*, "Exploring the Potential of Bee-Derived Antioxidants for Maintaining Oral Hygiene and Dental Health: A Comprehensive Review," *Antioxidants 2023*, Vol. 12, Page 1452, vol. 12, no. 7, p. 1452, Jul. 2023, doi: 10.3390/ANTIOX12071452.
- [13] V. D. Wagh, "Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials," *Adv Pharmacol Sci*, vol. 2013, p. 11, 2013, doi: 10.1155/2013/308249.

- [14] J. M. Alvarez-Suarez, S. Tulipani, S. Romandini, E. Bertoli, and M. Battino, "Contribution of honey in nutrition and human health: A review," *Med J Nutrition Metab*, vol. 3, no. 1, pp. 15–23, Apr. 2010, doi: 10.1007/S12349-009-0051-6/METRICS.
- [15] C. Aneklaphakij *et al.*, "Diversity of Chemical Structures and Biosynthesis of Polyphenols in Nut-Bearing Species," *Front Plant Sci*, vol. 12, p. 440, Apr. 2021, doi: 10.3389/FPLS.2021.642581/BIBTEX.
- [16] A. Durazzo *et al.*, "Bee Products: A Representation of Biodiversity, Sustainability, and Health," *Life*, vol. 11, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/LIFE11090970.
- [17] H. E. ÇAKIR, Y. ŞİRİN, S. KOLAYLI, and Z. CAN, "Validation Methods for Phenolic Components with RP-HPLC-UV in Various Bee Products," *Journal of Apitherapy and Nature*, vol. 1, no. 1, pp. 13–19, Apr. 2018, Accessed: Mar. 05, 2023. [Online]. Available: <https://dergipark.org.tr/en/pub/jan/issue/36344/374912>
- [18] A. Aboulghazi, S. Touzani, M. Fadil, and B. Lyoussi, "Physicochemical characterization and in vitro evaluation of the antioxidant and anticandidal activities of Moroccan propolis," *Vet World*, vol. 15, no. 2, p. 341, Feb. 2022, doi: 10.14202/VETWORLD.2022.341-349.
- [19] M. Casagrande *et al.*, "Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification," *Ind Crops Prod*, vol. 125, pp. 207–219, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.INDCROP.2018.08.088.
- [20] P. Seufert, J. Schwientek, and M. Bortz, "Model-based design of experiments for high-dimensional inputs supported by machine-learning methods," *Processes*, vol. 9, no. 3, pp. 1–25, Mar. 2021, doi: 10.3390/PR9030508.
- [21] G. Squeo, D. De Angelis, R. Leardi, C. Summo, and F. Caponio, "Background, applications and issues of the experimental designs for mixture in the food sector," *Foods*, vol. 10, no. 5, 2021, doi: 10.3390/FOODS10051128.
- [22] D. G. Mercurio, L. S. Calixto, and P. M. B. G. M. Campos, "Optimization of cosmetic formulations development using Box-Behnken design with response surface methodology: physical, sensory and moisturizing properties," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 56, Jan. 2020, doi: 10.1590/S2175-97902020000318502.
- [23] Anicet. Desrochers, A.-Virginie. Schmidt, and Miels d'Anicet., "Miel : l'art des abeilles, l'or de la ruche," 2013.
- [24] F. W. Marlowe, J. C. Berbesque, B. Wood, A. Crittenden, C. Porter, and A. Mabulla, "Honey, Hadza, hunter-gatherers, and human evolution," *J Hum Evol*, vol. 71, pp. 119–128, Jun. 2014, doi: 10.1016/J.JHEVOL.2014.03.006.
- [25] I. Karatasios, A. Hein, N. S. Müller, P. Triantafyllides, and V. Kilikoglou, "Technological insights into the ancient ceramic beehive production of Agathonisi island, Greece," *Appl Clay Sci*, vol. 82, no. 1, pp. 37–43, Sep. 2013, doi: .1016/j.clay.2013.06.012.
- [26] Wyatt A. Mangum, "Frames and Their Forgotten Diversity: Part 2 – Their Spacing - American Bee Journal," *FRAMES AND THEIR FORGOTTEN DIVERSITY: PART 2 – THEIR*

- SPACING*, Mar. 2020. Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://americanbeejournal.com/frames-and-their-forgotten-diversity-part-2-their-spacing/>
- [27] S. Dötterl and N. J. Vereecken, "The chemical ecology and evolution of bee–flower interactions: a review and perspectivesThe present review is one in the special series of reviews on animal–plant interactions.," *https://doi.org/10.1139/Z10-031*, vol. 88, no. 7, pp. 668–697, 2010, doi: 10.1139/Z10-031.
- [28] "L'apiculture dans l'Antiquité - L'Alchimie des Bougies." Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <https://www.alchimiedesbougies.fr/blog/apiculture-dans-antiquite/>
- [29] R. Chasan *et al.*, "Bee products in the prehistoric southern levant: evidence from the lipid organic record," *R Soc Open Sci*, vol. 8, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1098/RSOS.210950.
- [30] L. Boukraâ, *Honey in traditional and modern medicine*. Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <https://www.routledge.com/Honey-in-Traditional-and-Modern-Medicine/Boukraa/p/book/9781138199279>
- [31] Oscar PFOUM, "A propos de l'Abeille égyptienne et des Textes des Sarcophages ," 2004.
- [32] M. B. HAMMAD, "BEES AND BEEKEEPING IN ANCIENT EGYPT," *Journal of Association of Arab Universities for Tourism and Hospitality*, vol. 15, no. 1, pp. 1–16, Jun. 2018, doi: 10.21608/JAAUTH.2018.47990.
- [33] J. B. Shah, "The History of Wound Care," *J Am Col Certif Wound Spec*, vol. 3, no. 3, pp. 65–66, Sep. 2011, doi: 10.1016/J.JCWS.2012.04.002.
- [34] F. R. Khan, Z. U. Abadin, and N. Rauf, "Honey: Nutritional and medicinal value," *Int J Clin Pract*, vol. 61, no. 10, pp. 1705–1707, Oct. 2007, doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01417.x.
- [35] T. Eteraf-Oskouei and M. Najafi, "Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review," *Iran J Basic Med Sci*, vol. 16, no. 6, p. 731, Jun. 2013, Accessed: Jul. 28, 2023. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC3758027/](https://pmc/articles/PMC3758027/)
- [36] A. Zumla and A. Lulat, "Honey--a remedy rediscovered," *J R Soc Med*, vol. 82, no. 7, pp. 384–385, 1989, doi: 10.1177/014107688908200704.
- [37] "Aurore | Propriétés et usage médical des produits de la ruche." Accessed: Aug. 20, 2022. [Online]. Available: <http://aurore.unilim.fr/ori-oai-search/notice/view/unilim-ori-40167>
- [38] B. Duran, "Les abeilles, la planète et le citoyen comprendre le déclin des pollinisateurs, agir pour la biodiversité," 2010.
- [39] C. Debuysscher and C. D. La, "La disparition des abeilles : quelles conséquences pour nous ?," p. 114, May 2018, Accessed: Feb. 23, 2023. [Online]. Available: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02007952>
- [40] J. devillers, "Invertébrés," 2017. Accessed: Feb. 23, 2023. [Online]. Available: <http://www.natagora.be/fileadmin/Natagora/Biodiversite/biodiversite-invertebres.pdf>
- [41] "Présenté par BALDY Aurélie," 2009.

- [42] H. Clément, “Le traité Rustica de l’apiculture : version luxe,” p. 560, Accessed: Nov. 24, 2023. [Online]. Available: https://issuu.com/feuillestagefleurus/docs/9782815318617_ext/s/13732300
- [43] N. J. Haddad *et al.*, “Draft genome sequence of the Algerian bee *Apis mellifera intermissa*,” *Genom Data*, vol. 4, pp. 24–25, Jun. 2015, doi: 10.1016/J.GDATA.2015.01.011.
- [44] C. Riva, “Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite *Varroa destructor* (Acari : Varroidae),” 2017.
- [45] P. Franck, L. Garnery, G. Celebrano, M. Solignac, and J. M. Cornuet, “Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*),” *Mol Ecol*, vol. 9, no. 7, pp. 907–921, Jul. 2000, doi: 10.1046/J.1365-294X.2000.00945.X.
- [46] A. Moujanni, A. K. Essamadi, A. Terrab, and A. Khalid Essamadi, “L’apiculture au Maroc: focus sur la production de miel L’apiculture au Maroc: focus sur la production de miel [Beekeeping in Morocco: focus on honey production],” *Int J Innov Appl Stud*, vol. 20, no. 1, pp. 52–78, 2017, Accessed: Aug. 22, 2022. [Online]. Available: <http://www.ijias.issr-journals.org/>
- [47] J.-M. Cornuet *et al.*, “ÉTUDE BIOMÉTRIQUE DE POPULATIONS D’ABEILLES MAROCAINES,” *Apidologie*, vol. 19, no. 4, pp. 355–366, 1988, Accessed: Nov. 24, 2023. [Online]. Available: <https://hal.science/hal-00890754>
- [48] A. Moujanni, A. K. Essamadi, A. Terrab, and A. Khalid Essamadi, “L’apiculture au Maroc: focus sur la production de miel L’apiculture au Maroc: focus sur la production de miel [Beekeeping in Morocco: focus on honey production],” *Int J Innov Appl Stud*, vol. 20, no. 1, pp. 52–78, 2017, Accessed: Nov. 24, 2023. [Online]. Available: <http://www.ijias.issr-journals.org/>
- [49] A. Durazzo *et al.*, “Bee Products: A Representation of Biodiversity, Sustainability, and Health,” *Life*, vol. 11, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/LIFE11090970.
- [50] Bulletin officiel Marocain, *Ar les caractéristiques physico-chimiques du miel et des autres produits de la ruche*. . 2017, p. 1326. Accessed: Mar. 03, 2023. [Online]. Available: www.onssa.gov.ma
- [51] CXS 12-19811 and Adoptée en 1981. Révisée en 1987 et 2001. Amendée en 2019, “CODEX ALIMENTARIUS : NORMES ALIMENTAIRES INTERNATIONALES.”
- [52] S. Bogdanov, “Determination of honey botanical origin: Problems and issues”, doi: 10.1051/apido:2004044.
- [53] F. Bonté and A. Desmoulière, “Le miel : origine et composition,” *Actualités Pharmaceutiques*, vol. 52, no. 531, pp. 18–21, Dec. 2013, doi:10.1016/J.ACTPHA.2013.10.004.
- [54] S. Koechler and S. K. Le Miel Dans, “Le miel dans la cicatrisation des plaies : un nouveau médicament ?”, Accessed: Mar. 05, 2023. [Online]. Available: <http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>
- [55] E. Boulangé and E. B. Le, “Le miel en application cutanée : usages médical et cosmétique”, Accessed: Mar. 09, 2023. [Online]. Available: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03727446>

- [56] X. Wang, Y. Chen, Y. Hu, J. Zhou, L. Chen, and X. Lu, "Systematic Review of the Characteristic Markers in Honey of Various Botanical, Geographic, and Entomological Origins," *ACS Food Science and Technology*, vol. 2, no. 2, pp. 206–220, Feb. 2022, doi: 10.1021/ACSFOODSCITECH.1C00422/ASSET/IMAGES/MEDIUM/FS1C00422_0003.GIF.
- [57] S. U. Khan *et al.*, "Honey: Single food stuff comprises many drugs," *Saudi J Biol Sci*, vol. 25, no. 2, p. 320, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.SJBS.2017.08.004.
- [58] F. Balas, "Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale: revue de la littérature", Accessed: Aug. 12, 2023. [Online]. Available: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01293955>
- [59] F. Potier and F. P. La, "La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique",
- [60] S. I. Anjum *et al.*, "Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review," *Saudi J Biol Sci*, vol. 26, no. 7, pp. 1695–1703, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.SJBS.2018.08.013.
- [61] A. K. Kuropatnicki, E. Szliszka, and W. Krol, "Historical aspects of propolis research in modern times," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/964149.
- [62] C. Dealey, "The Care of Wounds: A Guide for Nurses, Third Edition," *The Care of Wounds: A Guide for Nurses, Third Edition*, pp. 1–240, Feb. 2008, doi: 10.1002/9780470774946.
- [63] A. K. Kuropatnicki, E. Szliszka, and W. Krol, "Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2013, p. 11, 2013, doi: 10.1155/2013/964149.
- [64] D. Betayene and B. Écologiste, "Abeilles-Environnement-Développement DEBUTER EN APICULTURE
- [65] F. Potier and F. P. La, "La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique",
- [66] N. Cardinault, M. O. Cayeux, and P. Percie Du Sert, "La propolis : origine, composition et propriétés," *Phytotherapie*, vol. 10, no. 5, pp. 298–304, Oct. 2012, doi: 10.1007/S10298-012-0733-Y/METRICS.
- [67] P. Saelao, R. S. Borba, V. Ricigliano, M. Spivak, and M. Simone-Finstrom, "Honeybee microbiome is stabilized in the presence of propolis," *Biol Lett*, vol. 16, no. 5, May 2020, doi: 10.1098/RSBL.2020.0003.
- [68] M. Shanahan and M. Spivak, "Resin use by stingless bees: A review," *Insects*, vol. 12, no. 8, p. 719, Aug. 2021, doi: 10.3390/INSECTS12080719/S1.
- [69] C. Benedek and M. Veresné Bálint, "Characteristics and uses of propolis," *Elelmiszervizsgalati Kozlemenyeek*, vol. 68, no. 3, pp. 4028–4035, Sep. 2022, doi: 10.52091/EVIK-2022/3-4-ENG.
- [70] D. S. Farghaly, E. Nafea, K. Altammar, and H. M. E.-D. Kadada, "Antimicrobial Activity of some Honey bee products treated in Controlling the American Foulbrood, *Paenibacillus* larva,"

- Egypt J Chem*, vol. 66, no. 3, pp. 351–358, Mar. 2023, doi: 10.21608/EJCHEM.2022.132516.6040.
- [71] G. L. Bragança Castagnino, A. Meana, M. T. Cutuli de Simón, and L. F. Batista Pinto, “Propolis and its effects on bee diseases and pests: a systematic review,” <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2154474>, vol. 62, no. 1, pp. 171–184, 2022, doi: 10.1080/00218839.2022.2154474.
- [72] R. S. Borba, K. K. Klyczek, K. L. Mogen, and M. Spivak, “Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health,” *Journal of Experimental Biology*, vol. 218, no. 22, pp. 3689–3699, Nov. 2015,
- [73] M. Simone, J. D. Evans, and M. Spivak, “RESIN COLLECTION AND SOCIAL IMMUNITY IN HONEY BEES,” *Evolution (N Y)*, vol. 63, no. 11, pp. 3016–3022, Nov. 2009, doi: 10.1111/J.1558-5646.2009.00772.X.
- [74] M. Alvear, E. Santos, F. Cabezas, A. Pérez-Sanmartín, M. Lespinasse, and J. Veloz, “Geographic Area of Collection Determines the Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Three Extracts of Chilean Propolis,” *Plants*, vol. 10, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/PLANTS10081543.
- [75] B. König, “Plant Sources of Propolis,” 1985
- [76] S. F. Tosi, “physico chemical characteristics of propolis collected in,” *apiacta*, vol. 41, pp. 110–120, 2006.
- [77] V. Bankova *et al.*, “Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin,” *Apidologie*, vol. 23, no. 1, pp. 79–85, 1992, doi: 10.1051/APIDO:19920109.
- [78] X. Wang, H. Hu, Z. Luo, Y. Liu, and H. Zhang, “A plant origin of Chinese propolis: *Populus canadensis* Moench,” <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1373512>, vol. 57, no. 2, pp. 228–245, Mar. 2017, doi: 10.1080/00218839.2017.1373512.
- [79] A. Salatino, É. W. Teixeira, G. Negri, and D. Message, “Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 33–38, 2005, doi: 10.1093/ECAM/NEH060.
- [80] R. I. Cavalaro, R. G. da Cruz, S. Dupont, J. M. L. N. de Moura Bell, and T. M. F. de S. Vieira, “In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction,” *Food Chem X*, vol. 4, p. 100054, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.FOCHX.2019.100054.
- [81] P. Okińczyc *et al.*, “Phytochemical Profile, Plant Precursors and Some Properties of Georgian Propolis,” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 7714, vol. 27, no. 22, p. 7714, Nov. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27227714.
- [82] S. Bouchelaghem, “Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review,” *Saudi J Biol Sci*, vol. 29, no. 4, pp. 1936–1946, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.SJBS.2021.11.063.

- [83] C. S. Machado *et al.*, “Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/6057650.
- [84] A. Papachristoforou, E. Koutouvela, G. Menexes, K. Gardikis, and I. Mourtzinou, “Photometric Analysis of Propolis from the Island of Samothraki, Greece. The Discovery of Red Propolis,” *Chem Biodivers*, vol. 16, no. 7, p. e1900146, Jul. 2019, doi: 10.1002/CBDV.201900146.
- [85] A. L. Piccinelli, C. Lotti, L. Campone, O. Cuesta-Rubio, M. Campo Fernandez, and L. Rastrelli, “Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry,” *J Agric Food Chem*, vol. 59, no. 12, pp. 6484–6491, Jun. 2011, doi: 10.1021/JF201280Z.
- [86] E. K. Soltani, R. Cerezuela, N. Charef, S. Mezaache-Aichour, M. A. Esteban, and M. M. Zerroug, “Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses,” *Fish Shellfish Immunol*, vol. 62, pp. 57–67, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.FSI.2017.01.009.
- [87] N. El Menyiy, N. Al-Wali, A. El Ghouizi, S. El-Guendouz, K. Salom, and B. Lyoussi, “Potential therapeutic effect of Moroccan propolis in hyperglycemia, dyslipidemia, and hepatorenal dysfunction in diabetic rats,” *Iran J Basic Med Sci*, vol. 22, no. 11, p. 1331, 2019, doi: 10.22038/IJBMS.2019.33549.8004.
- [88] P. Ristivojević *et al.*, “Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities,” *LWT*, vol. 95, pp. 367–379, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.LWT.2018.04.063.
- [89] Y. W. Chen, S. R. Ye, C. Ting, and Y. H. Yu, “Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis,” *J Food Drug Anal*, vol. 26, no. 2, pp. 761–768, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.JFDA.2017.10.002.
- [90] M. C. Marcucci *et al.*, “Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities,” *J Ethnopharmacol*, vol. 74, no. 2, pp. 105–112, 2001, doi: 10.1016/S0378-8741(00)00326-3.
- [91] M. M. Tomazzoli *et al.*, “Botanical source investigation and evaluation of the effect of seasonality on Brazilian propolis from *Apis mellifera* L.,” *Sci Agric*, vol. 77, no. 6, p. e20180258, Jan. 2020, doi: 10.1590/1678-992X-2018-0258.
- [92] “Effect of the harvesting method on propolis production by the local honeybee *Apis mellifera intermissa* in Algeria.” Accessed: May 19, 2024. [Online]. Available: <https://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd33/6/3379sukum.html>
- [93] L. Saccardi, J. Schiebl, K. Weber, O. Schwarz, S. Gorb, and A. Kovalev, “Adhesive Behavior of Propolis on Different Substrates,” *Front Mech Eng*, vol. 7, p. 660517, May 2021, doi: 10.3389/FMECH.2021.660517/BIBTEX.
- [94] V. Bankova, “Chemical diversity of propolis and the problem of standardization,” *J Ethnopharmacol*, vol. 100, no. 1–2, pp. 114–117, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.JEP.2005.05.004.

- [95] Z. Cui-ping *et al.*, “Development of high-performance liquid chromatographic for quality and authenticity control of Chinese propolis,” *J Food Sci*, vol. 79, no. 7, 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12510.
- [96] W. Maciejewicz, M. Daniewski, K. Bal, and W. Markowski, “GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis,” *Chromatographia*, vol. 53, no. 5–6, pp. 343–346, 2001, doi: 10.1007/BF02490438.
- [97] M. C. Fernández *et al.*, “GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples,” *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 21, pp. 9927–9932, Nov. 2008, doi: 10.1021/JF801870F.
- [98] O. Cuesta-Rubio, A. L. Piccinelli, M. C. Fernandez, I. M. Hernández, A. Rosado, and L. Rastrelli, “Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis,” *J Agric Food Chem*, vol. 55, no. 18, pp. 7502–7509, Sep. 2007, doi: 10.1021/jf071296w.
- [99] V. Bankova, “Chemical diversity of propolis and the problem of standardization,” *J Ethnopharmacol*, vol. 100, no. 1–2, pp. 114–117, Aug. 2005, doi: 10.1016/J.JEP.2005.05.004.
- [100] V. Bankova, R. Christov, S. Popov, O. Pureb, and G. Bocari, “Volatile Constituents of Propolis,” *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, vol. 49, no. 1–2, pp. 6–10, Feb. 1994, doi: 10.1515/ZNC-1994-1-202/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [101] V. Bankova, M. Popova, and B. Trusheva, “Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review,” *Chem Cent J*, vol. 8, no. 1, p. 28, May 2014, doi: 10.1186/1752-153X-8-28.
- [102] S. Huang, C. P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li, and F. L. Hu, “Recent advances in the chemical composition of propolis,” *Molecules*, vol. 19, no. 12, pp. 19610–19632, Dec. 2014, doi: 10.3390/MOLECULES191219610.
- [103] A. Kurek-Górecka *et al.*, “Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions,” *Plants*, vol. 11, no. 9, May 2022, doi: 10.3390/PLANTS11091203.
- [104] Z. Ahangari, M. Naseri, and F. Vatandoost, “Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics,” *Iran Endod J*, vol. 13, no. 3, p. 285, Jun. 2018, doi: 10.22037/IEJ.V13I3.20994.
- [105] S. I. Anjum *et al.*, “Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review,” *Saudi J Biol Sci*, vol. 26, no. 7, pp. 1695–1703, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.SJBS.2018.08.013.
- [106] A. Rebiai *et al.*, “FATTY ACID COMPOSITION OF ALGERIAN PROPOLIS,” *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, vol. 9, no. 3, pp. 1656–1671, Sep. 2017, doi: 10.4314/JFAS.V9I3.26.
- [107] M. P. Popova *et al.*, “Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin,” *Apidologie*, vol. 38, no. 3, pp. 306–311, May 2007, doi: 10.1051/APIDO:2007013.

- [108] Y. K. Park, S. M. Alencar, and C. L. Aguiar, “Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis,” *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 9, pp. 2502–2506, Apr. 2002, doi: 10.1021/JF011432B.
- [109] Sylvie. Meyer, Catherine. Reeb, and Robin. Bosdeveix, “Botanique : biologie et physiologie végétales,” 2004.
- [110] J. Triolo, *Miels, ruchers et plantes endémiques dans les forêts publiques*. Saint-Denis: Office national des forêts. Direction régionale de La Réunion, 2009
- [111] R. Mărgăoan *et al.*, “Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits,” *Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 568*, vol. 8, no. 12, p. 568, Nov. 2019, doi: 10.3390/ANTIOX8120568.
- [112] Y. Zhang, F. Yang, M. A. Jamali, and Z. Peng, “Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Oxidation in Rape (*Brassica campestris* L.) Bee Pollen Added to Salami during Processing,” *Molecules 2016, Vol. 21, Page 1439*, vol. 21, no. 11, p. 1439, Oct. 2016, doi: 10.3390/MOLECULES21111439.
- [113] B. Denisow and M. Denisow-Pietrzyk, “Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review,” *J Sci Food Agric*, vol. 96, no. 13, pp. 4303–4309, Oct. 2016, doi: 10.1002/JSFA.7729.
- [114] P. S. Hsu, T. H. Wu, M. Y. Huang, D. Y. Wang, and M. C. Wu, “Nutritive value of 11 bee pollen samples from major floral sources in taiwan,” *Foods*, vol. 10, no. 9, p. 2229, Sep. 2021, doi: 10.3390/FOODS10092229/S1.
- [115] Stephan Schmitzer **p**oposal for a new OECD guideline for the testing of chemicals on adult honey bees (<i>Apis mellifera</i> L.) in a 10 day chronic feeding test in the laboratory and results of the recent ring test 2014
- [116] Claude Dufour, “Les carences nutritionnelles des abeilles (*Apis mellifera* L.) en condition de pollinisation du bleuets à feuilles étroites (*Vaccinium angustifolium* Ait.) et de la canneberge (*Vaccinium macrocarpon* Ait.),” quebec canada, 2019. Accessed: Mar. 27, 2023. [Online]. Available: <https://corpus.ulaval.ca/server/api/core/bitstreams/5de05a5e-b2aa-4df4-96d2-1b77f5b6e1e6/content>
- [117] W. Liang Qian, Z. Khan, D. G. Watson, and J. Fearnley, “Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 21, pp. 78–83, 2008, doi: 10.1016/j.jfca.2007.07.001.
- [118] S. Prdun, L. Svečnjak, M. Valentić, Z. Marijanović, and I. Jerković, “Characterization of bee pollen: Physico-chemical properties, headspace composition and ftir spectral profiles,” *Foods*, vol. 10, no. 9, p. 2103, Sep. 2021, doi: 10.3390/FOODS10092103/S1.
- [119] V. Liolios, C. Tananaki, A. Papaioannou, D. Kanelis, M. A. Rodopoulou, and N. Argana, “Mineral content in monofloral bee pollen: investigation of the effect of the botanical and geographical origin,” *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 13, no. 3, pp. 1674–1682, Sep. 2019, doi: 10.1007/S11694-019-00084-W/METRICS.

- [120] Z. Wang, P. Ren, Y. Wu, and Q. He, “Recent advances in analytical techniques for the detection of adulteration and authenticity of bee products – A review,” <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1871081>, vol. 38, no. 4, pp. 533–549, 2021, doi: 10.1080/19440049.2020.1871081.
- [121] H. Bayir and A. Aygun, “Heavy metal in honey bees, honey and pollen produced in different locations of Konya province in Turkey,” 2022, doi: 10.21203/rs.3.rs-1302296/v1.
- [122] K. Komosinska-Vassev, P. Olczyk, J. Kaźmierczak, L. Mencner, and K. Olczyk, “Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application,” *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/297425.
- [123] P. C. Stevenson, S. W. Nicolson, and G. A. Wright, “Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions,” *Funct Ecol*, vol. 31, no. 1, pp. 65–75, Jan. 2017, doi: 10.1111/1365-2435.12761/SUPPINFO.
- [124] L. L. Richardson *et al.*, “Secondary metabolites in floral nectar reduce parasite infections in bumblebees,” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 282, no. 1803, Mar. 2015, doi: 10.1098/RSPB.2014.2471.
- [125] S. Bogdanov, “Quality and Standards of Pollen and Beeswax”.
- [126] M. G. R. Campos *et al.*, “Pollen composition and standardisation of analytical methods,” *J Apic Res*, vol. 47, no. 2, pp. 154–161, 2008, doi: 10.1080/00218839.2008.11101443.
- [127] M. P. Popova *et al.*, “Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin,” *Apidologie*, vol. 38, no. 3, pp. 306–311, May 2007, doi: 10.1051/APIDO:2007013/METRICS.
- [128] E. Porcher and C. Fontaine, “Paysages, pollinisateurs et niveaux de pollinisation”, Accessed: Nov. 27, 2023. [Online]. Available: <http://spipoll.org>
- [129] A. Sanyal, A. Ghosh, C. Roy, I. Mazumder, and P. Marrazzo, “Revolutionizing the Use of Honeybee Products in Healthcare: A Focused Review on Using Bee Pollen as a Potential Adjunct Material for Biomaterial Functionalization,” *Journal of Functional Biomaterials* 2023, Vol. 14, Page 352, vol. 14, no. 7, p. 352, Jul. 2023, doi: 10.3390/JFB14070352.
- [130] Yves Donadieu, *Aide-mémoire d’apithérapie Comment traiter 64 maux courants par les produits de la ruche ?* - , Santeractive. 2006. Accessed: Apr. 04, 2023. [Online]. Available: <https://www.fnac.com/a1923151/Yves-Donadieu-Aide-memoire-d-apitherapie>
- [131] D. Jean Nicolaÿ, “livre acheté = 1 ruche parrainée et 40 000 abeilles protégées”.
- [132] “Apitherapy: Benefits, Uses, Side Effects, and Risks.” Accessed: Apr. 07, 2023. [Online]. Available: <https://www.healthline.com/health/apitherapy>
- [133] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, and A. Crozier, “Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases,” *Antioxid Redox Signal*, vol. 18, no. 14, pp. 1818–1892, May 2013, doi: 10.1089/ARS.2012.4581/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE41.JPEG.

- [134] M. Martinello, F. Mutinelli, I. Zooprofilattico, and S. Delle Venezie, "Antioxidant Activity in Bee Products: A Review," *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 71, vol. 10, no. 1, p. 71, Jan. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10010071.
- [135] M. Dell'anno *et al.*, "Antioxidant Activity, Metabolism, and Bioavailability of Polyphenols in the Diet of Animals," *Antioxidants* 2023, Vol. 12, Page 1141, vol. 12, no. 6, p. 1141, May 2023, doi: 10.3390/ANTIOX12061141.
- [136] M. Rudrapal *et al.*, "Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action," *Front Pharmacol*, vol. 13, Feb. 2022, doi: 10.3389/FPHAR.2022.806470.
- [137] T. Hussain, B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M. C. B. Tossou, and N. Rahu, "Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/7432797.
- [138] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, "Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death," *Free Radicals in Biology and Medicine*, pp. 199–283, Oct. 2015, doi: 10.1093/ACPROF:OSO/9780198717478.003.0005.
- [139] J. Fujii, T. Homma, and T. Osaki, "Superoxide Radicals in the Execution of Cell Death," *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 501, vol. 11, no. 3, p. 501, Mar. 2022, doi: 10.3390/ANTIOX11030501.
- [140] D. Harman, "About 'origin and evolution of the free radical theory of aging: A brief personal history, 1954-2009,'" *Biogerontology*, vol. 10, no. 6, p. 783, Dec. 2009, doi: 10.1007/S10522-009-9253-Z/METRICS.
- [141] D. HARMAN, "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry," *J Gerontol*, vol. 11, no. 3, pp. 298–300, 1956, doi: 10.1093/GERONJ/11.3.298.
- [142] H. Sies, C. Berndt, and D. P. Jones, "Oxidative Stress," *Annu Rev Biochem*, vol. 86, pp. 715–748, Jun. 2017, doi: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-045037.
- [143] B. Gruyer and B. Vergès, "Association tabac et diabète de type 2 : preuves et mécanismes physiopathologiques," *Médecine des Maladies Métaboliques*, vol. 14, no. 2, pp. 148–151, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.MMM.2019.12.001.
- [144] K. H. Al-Gubory, "Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development," *Reprod Biomed Online*, vol. 29, no. 1, pp. 17–31, Jul. 2014, doi: 10.1016/J.RBMO.2014.03.002.
- [145] S. S. Dries, B. S. Seibert, M. F. Bastiani, R. Linden, and M. S. Perassolo, "Evaluation of oxidative stress biomarkers and liver and renal functional parameters in patients during treatment a mental health unit to treat alcohol dependence," <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1780251>, vol. 45, no. 2, pp. 861–867, 2020, doi: 10.1080/01480545.2020.1780251.
- [146] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 30, no. 1, pp. 11–26, Jan. 2015, doi: 10.1007/S12291-014-0446-0/METRICS.

- [147] T. L. Merry and M. Ristow, “Mitohormesis in exercise training,” *Free Radic Biol Med*, vol. 98, pp. 123–130, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.11.032.
- [148] J. Liu, B. Castejon-Vega, M. D. Cordero, and A. Sanz, “How the Disruption of Mitochondrial Redox Signalling Contributes to Ageing,” *Antioxidants 2023, Vol. 12, Page 831*, vol. 12, no. 4, p. 831, Mar. 2023, doi: 10.3390/ANTIOX12040831.
- [149] S. Di Meo, T. T. Reed, P. Venditti, and V. M. Victor, “Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1245049.
- [150] R. J. Mailloux, “An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production,” *Antioxidants 2020, Vol. 9, Page 472*, vol. 9, no. 6, p. 472, Jun. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9060472.
- [151] F. Magnani and A. Mattevi, “Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases,” *Curr Opin Struct Biol*, vol. 59, pp. 91–97, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.SBI.2019.03.001.
- [152] F. Collin, “Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases,” *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 2407*, vol. 20, no. 10, p. 2407, May 2019, doi: 10.3390/IJMS20102407.
- [153] D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, “Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release,” *Physiol Rev*, vol. 94, no. 3, p. 909, Jul. 2014, doi: 10.1152/PHYSREV.00026.2013.
- [154] A. K. Aranda-Rivera, A. Cruz-Gregorio, Y. L. Arancibia-Hernández, E. Y. Hernández-Cruz, and J. Pedraza-Chaverri, “RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts,” *Oxygen 2022, Vol. 2, Pages 437-478*, vol. 2, no. 4, pp. 437–478, Oct. 2022, doi: 10.3390/OXYGEN2040030.
- [155] E. Cadenas and K. J. A. Davies, “Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging,” *Free Radic Biol Med*, vol. 29, no. 3–4, pp. 222–230, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00317-8.
- [156] B. Sjöberg, “Oxydation des protéines par les espèces réactives de l’oxygène : l’importance de l’environnement protéique”, Accessed: Dec. 07, 2023. [Online]. Available: <https://theses.hal.science/tel-01024104>
- [157] A. Rezaire, “Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa),” <http://www.theses.fr>, Dec. 2012, Accessed: Dec. 08, 2023. [Online]. Available: <http://www.theses.fr/2012AGUY0573>
- [158] A. Ayala, M. F. Muñoz, and S. Argüelles, “Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/360438.
- [159] A. M. Firsov *et al.*, “Deuterated polyunsaturated fatty acids inhibit photoirradiation-induced lipid peroxidation in lipid bilayers,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 229, p. 112425, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.JPHOTOBIOB.2022.112425.

- [160] L. Pazarín-Villaseñor *et al.*, “Oxidation State in Peritoneal Dialysis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus,” *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 2669, vol. 24, no. 3, p. 2669, Jan. 2023, doi: 10.3390/IJMS24032669.
- [161] J. Lee, D. Shin, and J. L. Roh, “Lipid metabolism alterations and ferroptosis in cancer: Paving the way for solving cancer resistance,” *Eur J Pharmacol*, vol. 941, p. 175497, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2023.175497.
- [162] C. P. Gonzalez-Hunt, M. Wadhwa, and L. H. Sanders, “DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes,” *Curr Opin Toxicol*, vol. 7, pp. 87–94, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.COTOX.2017.11.001.
- [163] T. B. Kryston, A. B. Georgiev, P. Pissis, and A. G. Georgakilas, “Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis,” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 711, no. 1–2, pp. 193–201, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.MRFMMM.2010.12.016.
- [164] Y. W. Kow and A. Dare, “Detection of Abasic Sites and Oxidative DNA Base Damage Using an ELISA-like Assay,” *Methods*, vol. 22, no. 2, pp. 164–169, Oct. 2000, doi: 10.1006/METH.2000.1057.
- [165] L. H. Sanders *et al.*, “Mitochondrial DNA damage: Molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson’s disease,” *Neurobiol Dis*, vol. 70, pp. 214–223, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.NBD.2014.06.014.
- [166] J. U. Dahl, M. J. Gray, and U. Jakob, “Protein Quality Control Under Oxidative Stress Conditions,” *J Mol Biol*, vol. 427, no. 7, p. 1549, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.JMB.2015.02.014.
- [167] W. Zhang, S. Xiao, and D. U. Ahn, “Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 53, no. 11, pp. 1191–1201, Jan. 2013, doi: 10.1080/10408398.2011.577540.
- [168] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, “Flavonoids: an overview,” *J Nutr Sci*, vol. 5, pp. 1–15, Jan. 2016, doi: 10.1017/JNS.2016.41.
- [169] C. P. Bondonno *et al.*, “Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. 2”.
- [170] B. Kaurinovic, D. Vastag, B. Kaurinovic, and D. Vastag, “Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants,” *Antioxidants*, Feb. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.83731.
- [171] J. Y. Chen, R. Y. Hu, and H. C. Chou, “Quercetin-induced cardioprotection against doxorubicin cytotoxicity,” *J Biomed Sci*, vol. 20, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2013, doi: 10.1186/1423-0127-20-95/FIGURES/6.
- [172] B. Prasad, S. Mallick, A. C. Bharati, and S. Singh, “Flavonoids: Chemistry, biosynthesis, isolation, and biological function,” *Handbook of Biomolecules*, pp. 467–488, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-91684-4.00002-5.
- [173] F. A. Abdul Latif, W. S. Wan Ghazali, S. M. Mohamad, and L. K. Lee, “High fiber multigrain supplementation improved disease activity score, circulating inflammatory and

oxidative stress biomarkers in rheumatoid arthritis (RA) patients: A randomized human clinical trial,” *J Funct Foods*, vol. 100, p. 105392, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.JFF.2022.105392.

[174] İ. Gulcin and S. H. Alwasel, “Metal Ions, Metal Chelators and Metal Chelating Assay as Antioxidant Method,” *Processes* 2022, Vol. 10, Page 132, vol. 10, no. 1, p. 132, Jan. 2022, doi: 10.3390/PR10010132.

[175] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. B. Mathew, and K. N. Beeregowda, “Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals,” *Interdiscip Toxicol*, vol. 7, no. 2, p. 60, Jun. 2014, doi: 10.2478/INTOX-2014-0009.

[176] J. Lakey-Beitia, A. M. Burillo, G. La Penna, M. L. Hegde, and K. S. Rao, “Polyphenols as Potential Metal Chelation Compounds Against Alzheimer’s Disease,” *J Alzheimers Dis*, vol. 82, no. Suppl 1, p. S335, 2021, doi: 10.3233/JAD-200185.

[177] Y. Zhou, S. Zhang, and X. Fan, “Role of Polyphenols as Antioxidant Supplementation in Ischemic Stroke,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/5471347.

[178] J. K. Kim and H. D. Jang, “Nrf2-Mediated HO-1 Induction Coupled with the ERK Signaling Pathway Contributes to Indirect Antioxidant Capacity of Caffeic Acid Phenethyl Ester in HepG2 Cells,” *International Journal of Molecular Sciences* 2014, Vol. 15, Pages 12149-12165, vol. 15, no. 7, pp. 12149–12165, Jul. 2014, doi: 10.3390/IJMS150712149.

[179] H. Kim *et al.*, “Caffeic acid phenethyl ester activation of Nrf2 pathway is enhanced under oxidative state: structural analysis and potential as a pathologically targeted therapeutic agent in treatment of colonic inflammation,” *Free Radic Biol Med*, vol. 65, pp. 552–562, 2013, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.07.015.

[180] H. Imtara *et al.*, “Chemical Analysis and Cytotoxic and Cytostatic Effects of Twelve Honey Samples Collected from Different Regions in Morocco and Palestine,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/8768210.

[181] K. Henderson, T. Aldhirgham, P. S. Nigam, and R. Owusu-Apenten, “Evaluation of Manuka Honey Estrogen Activity Using the MCF-7 Cell Proliferation Assay,” *J Adv Biol Biotechnol*, vol. 10, no. 3, pp. 1–11, Dec. 2016, doi: 10.9734/JABB/2016/29887.

[182] B. Kaya and A. Yıldırım, “Determination of the antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of the honey phenolic extract of five different regions of Bingöl province,” *J Food Sci Technol*, vol. 58, no. 6, pp. 2420–2430, Jun. 2021, doi: 10.1007/S13197-020-04783-X/METRICS.

[183] N. H. Othman, “Honey and cancer: sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review,” *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/410406.

[184] S. Afrin *et al.*, “Strawberry-Tree Honey Induces Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells and Increases ROS Generation: A Comparison with Manuka Honey,” *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.3390/IJMS18030613.

[185] S. Samarghandian, J. T. Afshari, and S. Davoodi, “Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma,” *Pharmacogn Mag*, vol. 7, no. 25, pp. 46–52, Jan. 2011, doi: 10.4103/0973-1296.75901.

- [186] A. N. Fauzi, M. N. Norazmi, and N. S. Yaacob, "Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines," *Food Chem Toxicol*, vol. 49, no. 4, pp. 871–878, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.FCT.2010.12.010.
- [187] M. Waheed *et al.*, "Honey and cancer: A mechanistic review," *Clin Nutr*, vol. 38, no. 6, pp. 2499–2503, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.CLNU.2018.12.019.
- [188] Y. A. Elnakady *et al.*, "Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Feb. 2017, doi: 10.1038/srep41453.
- [189] H. Nouredine *et al.*, "Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of Lebanese propolis," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 95, pp. 298–307, Nov. 2017, doi: 10.1016/J.BIOPHA.2017.08.067.
- [190] S. Demir *et al.*, "Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line," *Nutr Cancer*, vol. 68, no. 1, pp. 165–172, Jan. 2016, doi: 10.1080/01635581.2016.1115096.
- [191] S. Touzani *et al.*, "In Vitro Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties," *Biomed Res Int*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4836378.
- [192] K. Celińska-Janowicz *et al.*, "Constituents of propolis: Chrysin, caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid induce PRODH/POX-dependent apoptosis in human tongue squamous cell carcinoma cell (CAL-27)," *Front Pharmacol*, vol. 9, no. APR, p. 350584, Apr. 2018, doi: 10.3389/FPHAR.2018.00336/BIBTEX.
- [193] Y. A. Elnakady *et al.*, "Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia," *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Feb. 2017, doi: 10.1038/srep41453.
- [194] U. Czyżewska, K. Siemionow, I. Zareba, and W. Milyk, "Proapoptotic Activity of Propolis and Their Components on Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line (CAL-27)," *PLoS One*, vol. 11, no. 6, p. e0157091, Jun. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0157091.
- [195] Y. Zou *et al.*, "The botanical origin and antioxidant, anti-BACE1 and antiproliferative properties of bee pollen from different regions of South Korea," *BMC Complement Med Ther*, vol. 20, no. 1, p. 236, Jul. 2020, doi: 10.1186/S12906-020-03023-1.
- [196] T. Saisavoey, P. Sangtanoo, P. Srimongkol, O. Reamtong, and A. Karnchanatat, "Hydrolysates from bee pollen could induced apoptosis in human bronchogenic carcinoma cells (ChaGo-K-1)," *J Food Sci Technol*, vol. 58, no. 2, pp. 752–763, Feb. 2021, doi: 10.1007/S13197-020-04592-2/METRICS.
- [197] L. Sun, Y. Guo, Y. Zhang, and Y. Zhuang, "Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 mouse melanoma cells," *Front Pharmacol*, vol. 8, no. MAR, p. 257509, Mar. 2017, doi: 10.3389/FPHAR.2017.00104/BIBTEX.

- [198] C. Leiva-Sabadini, S. Alvarez, N. P. Barrera, C. M. A. P. Schuh, and S. Aguayo, "Antibacterial Effect of Honey-Derived Exosomes Containing Antimicrobial Peptides Against Oral Streptococci," *Int J Nanomedicine*, vol. 16, p. 4891, 2021, doi: 10.2147/IJN.S315040.
- [199] C. Stefanis *et al.*, "Honey's Antioxidant and Antimicrobial Properties: A Bibliometric Study," *Antioxidants*, vol. 12, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.3390/ANTIOX12020414.
- [200] A. G. Hegazi and F. K. Abd El Hady, "Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands," *Z Naturforsch C J Biosci*, vol. 57, no. 3–4, pp. 395–402, 2002, doi: 10.1515/ZNC-2002-3-432.
- [201] O. Erkmen and M. M. Özcan, "Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms," *J Med Food*, vol. 11, no. 3, pp. 587–592, Sep. 2008, doi: 10.1089/JMF.2007.0038.
- [202] M. Guiserix and M. G. Mécanismes D', "Mécanismes d'émergence des maladies infectieuses : étude par la modélisation du rôle de la protection de groupe, dans des populations hôtes homogènes ou structurées spatialement", Accessed: Dec. 08, 2023. [Online]. Available: <https://theses.hal.science/tel-00705295>
- [203] S. Abbara, "La résistance dans les infections bactériennes : apport de l'entrepôt de données de santé de l'AP-HP", Accessed: Dec. 08, 2023. [Online]. Available: <https://theses.hal.science/tel-04070620>
- [204] W. C. Reygaert, "An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria," *AIMS Microbiol*, vol. 4, no. 3, p. 482, 2018, doi: 10.3934/MICROBIOL.2018.3.482.
- [205] S. T. Chancey, D. Zähler, and D. S. Stephens, "Acquired inducible antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria," *Future Microbiol*, vol. 7, no. 8, pp. 959–978, Aug. 2012, doi: 10.2217/FMB.12.63.
- [206] M. Ratajczak, D. Kaminska, E. Matuszewska, E. Hołderna-Kedzia, J. Rogacki, and J. Matysiak, "Promising antimicrobial properties of bioactive compounds from different honeybee products," *Molecules*, vol. 26, no. 13, Jul. 2021, doi: 10.3390/molecules26134007.
- [207] A. N. Koç, S. Silici, F. Kasap, H. T. Hörmet-Öz, H. Mavus-Buldu, and B. D. Ercal, "Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp.," <https://home.liebertpub.com/jmf>, vol. 14, no. 1–2, pp. 128–134, Jan. 2011, doi: 10.1089/JMF.2009.0296.
- [208] T. Kontogiannis, T. G. Dimitriou, N. A. Didaras, and D. Mossialos, "Antiviral Activity of Bee Products," *Curr Pharm Des*, vol. 28, no. 35, pp. 2867–2878, Sep. 2022, doi: 10.2174/1381612828666220928110103.
- [209] S. Bogdanov, "Antiviral properties of the bee products: a review", Accessed: Dec. 03, 2023. [Online]. Available: www.bee-hexagon.net,
- [210] T. Aksoy, E. Sivcan, F. Doğan, S. Çetin, and T. M. Yar, "[Investigation of Anti-leishmanial Effects of Bee Products (Honey, Propolis) on *Leishmania tropica* Promastigotes]," *Mikrobiyol Bul*, vol. 54, no. 3, pp. 479–489, 2020, doi: 10.5578/MB.69632.

- [211] Y. Couquet, A. Desmoulière, and M. L. Rigal, “Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel,” *Actualites Pharmaceutiques*, vol. 52, no. 531, pp. 22–25, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.ACTPHA.2013.10.005.
- [212] M. A. Hashemipour, Z. Tavakolineghad, S. A. M. Arabzadeh, Z. Iranmanesh, and S. A. H. G. Nassab, “Antiviral Activities of Honey, Royal Jelly, and Acyclovir Against HSV-1,” *Wounds*, vol. 26, no. 2, pp. 47–54, Feb. 2014, Accessed: Dec. 03, 2023. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/25860226>
- [213] F. Nainu *et al.*, “Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties,” *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 822, vol. 10, no. 7, p. 822, Jul. 2021, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS10070822.
- [214] A. Shahzad and R. J. Cohrs, “In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles,” *Transl Biomed*, vol. 3, no. 2, 2015, doi: 10.3823/434.
- [215] I. Przybyłek and T. M. Karpiński, “Antibacterial Properties of Propolis,” *Molecules*, vol. 24, no. 11, 2019, doi: 10.3390/MOLECULES24112047.
- [216] N. Zabaoui *et al.*, “Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product,” *Chem Phys Lipids*, vol. 207, pp. 214–222, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2017.04.005.
- [217] M. Amoros, E. Lurton, J. Boustie, L. Girre, F. Sauvager, and M. Cormier, “Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate,” *J Nat Prod*, vol. 57, no. 5, pp. 644–647, May 1994, doi: 10.1021/NP50107A013.
- [218] A. M. Ali and H. Kunugi, “Propolis, Bee Honey, and Their Components Protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review of In Silico, In Vitro, and Clinical Studies,” *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 1232, vol. 26, no. 5, p. 1232, Feb. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26051232.
- [219] R. Bridi, E. Atala, P. N. Pizarro, and G. Montenegro, “Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity,” *J Nat Prod*, vol. 82, no. 3, pp. 559–565, Mar. 2019, doi: 10.1021/ACS.JNATPROD.8B00945/SUPPL_FILE/NP8B00945_SI_001.PDF.
- [220] E. Abdelsalam, H. S. Foda, M. S. Abdel-Aziz, and F. K. Abd El-Hady, “Antioxidant and Antimicrobial activities of Egyptian Bee Pollen”.
- [221] I. K. Lee *et al.*, “Characterization of Neuraminidase Inhibitors in Korean Papaver rhoeas Bee Pollen Contributing to Anti-Influenza Activities in Vitro,” *Planta Med*, vol. 82, no. 6, pp. 524–529, Apr. 2016, doi: 10.1055/S-0041-111631/ID/RZ1015-1/BIB.
- [222] S. Y. Lyu, J. Y. Rhim, and W. B. Park, “Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro,” *Arch Pharm Res*, vol. 28, no. 11, pp. 1293–1301, 2005, doi: 10.1007/BF02978215/METRICS.

- [223] R. A. Nader, R. Mackieh, R. Wehbe, D. El Obeid, J. M. Sabatier, and Z. Fajloun, "Beehive Products as Antibacterial Agents: A Review," *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 717, vol. 10, no. 6, p. 717, Jun. 2021, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS10060717.
- [224] V. Cosi and G. Gadermaier, "The Role of Defensins as Pollen and Food Allergens," *Curr Allergy Asthma Rep*, vol. 23, no. 6, pp. 277–285, Jun. 2023, doi: 10.1007/S11882-023-01080-3/FIGURES/2.
- [225] P. H. S. Kwakman and S. A. J. Zaat, "Antibacterial components of honey," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 1, pp. 48–55, Jan. 2012, doi: 10.1002/IUB.578.
- [226] J. Irish, D. A. Carter, S. E. Blair, and T. A. Heard, "Antibacterial activity of honey from the Australian stingless bee *Trigona carbonaria*," *Int J Antimicrob Agents*, vol. 32, no. 1, pp. 89–90, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.02.012.
- [227] P. I. Oteiza, A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen, and C. G. Fraga, "Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface?," *Clin Dev Immunol*, vol. 12, no. 1, pp. 19–25, Mar. 2005, doi: 10.1080/10446670410001722168.
- [228] S. Kumar and A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview," *ScientificWorldJournal*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/162750.
- [229] A. Renzetti, J. W. Betts, K. Fukumoto, and R. N. Rutherford, "Antibacterial green tea catechins from a molecular perspective: mechanisms of action and structure–activity relationships," *Food Funct*, vol. 11, no. 11, pp. 9370–9396, Nov. 2020, doi: 10.1039/D0FO02054K.
- [230] M. Zhang *et al.*, "Recent advances on the regulation of bacterial biofilm formation by herbal medicines," *Front Microbiol*, vol. 13, p. 1039297, Nov. 2022, doi: 10.3389/FMICB.2022.1039297/BIBTEX.
- [231] J. E. Paczkowski *et al.*, "Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors," *J Biol Chem*, vol. 292, no. 10, pp. 4064–4076, Mar. 2017, doi: 10.1074/JBC.M116.770552.
- [232] S. Maheshwari, V. Kumar, G. Bhadauria, and A. Mishra, "Immunomodulatory potential of phytochemicals and other bioactive compounds of fruits: A review," *Food Front*, vol. 3, no. 2, pp. 221–238, Jun. 2022, doi: 10.1002/FFT2.129.
- [233] M. Thierig, J. Raupbach, D. Wolf, T. Mascher, K. Subramanian, and T. Henle, "3-Phenyllactic Acid and Polyphenols Are Substances Enhancing the Antibacterial Effect of Methylglyoxal in Manuka Honey," *Foods*, vol. 12, no. 5, p. 1098, Mar. 2023, doi: 10.3390/FOODS12051098/S1.
- [234] K. Hayashi, A. Fukushima, M. Hayashi-Nishino, and K. Nishino, "Effect of methylglyoxal on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*," *Front Microbiol*, vol. 5, no. APR, p. 53078, Apr. 2014, doi: 10.3389/FMICB.2014.00180/BIBTEX.
- [235] V. C. Nolan, J. Harrison, and J. A. G. Cox, "Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey," *Antibiotics* 2019, Vol. 8, Page 251, vol. 8, no. 4, p. 251, Dec. 2019, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS8040251.

- [236] M. Ratajczak, D. Kaminska, E. Matuszewska, E. Holderna-Kedzia, J. Rogacki, and J. Matysiak, "Promising Antimicrobial Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products," *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4007, vol. 26, no. 13, p. 4007, Jun. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26134007.
- [237] F. Zulhendri *et al.*, "Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review," *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1360, vol. 10, no. 6, p. 1360, Jun. 2021, doi: 10.3390/FOODS10061360.
- [238] H. R. El-Seedi *et al.*, "Insights into the Role of Natural Products in the Control of the Honey Bee Gut Parasite (*Nosema* spp.)," *Animals*, vol. 12, no. 21, Nov. 2022, doi: 10.3390/ANI12213062.
- [239] M. Akbar Bahar *et al.*, "Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties," vol. 10, p. 822, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10070822.
- [240] R. P. Dutra *et al.*, "Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 29, no. 3, pp. 287–293, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.BJP.2019.02.009.
- [241] F. Nainu *et al.*, "Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties," *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 822, vol. 10, no. 7, p. 822, Jul. 2021, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS10070822.
- [242] HAMDY Nadia, "Identification des facteurs prédictifs de l'éducation des patients diabétiques et de leur entourage."
- [243] Florence Boyer, "Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses," 2016. Accessed: May 26, 2024. [Online]. Available: https://theses.hal.science/tel-01379536/file/2016lare0003_FBoyer_A.pdf
- [244] H. R. El-Seedi *et al.*, "Honey Bee Products: Preclinical and Clinical Studies of Their Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties," *Front Nutr*, vol. 8, Jan. 2022, doi: 10.3389/FNUT.2021.761267.
- [245] W. A. Weis *et al.*, "An overview about apitherapy and its clinical applications," *Phytomedicine Plus*, vol. 2, no. 2, p. 100239, May 2022, doi: 10.1016/J.PHYPLU.2022.100239.
- [246] S. Tangvarasittichai, "Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus," *World J Diabetes*, vol. 6, no. 3, p. 456, Apr. 2015, doi: 10.4239/WJD.V6.I3.456.
- [247] A. D. Association, "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus," *Diabetes Care*, vol. 32, no. Suppl 1, p. S62, Jan. 2009, doi: 10.2337/DC09-S062.
- [248] F. A. Alassaf, M. H. M. Jasim, M. Alfahad, M. E. Qazzaz, M. N. Abed, and I. A. J. Thanoon, "Effects of Bee Propolis on FBG, HbA1c, and Insulin Resistance in Healthy Volunteers," *Turk J Pharm Sci*, vol. 18, no. 4, p. 405, 2021, doi: 10.4274/TJPS.GALENOS.2020.50024.

- [249] O. Bobiş, D. S. Dezmirean, and A. R. Moise, “Honey and Diabetes: The Importance of Natural Simple Sugars in Diet for Preventing and Treating Different Type of Diabetes,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/4757893.
- [250] O. Belmehdi *et al.*, “Recent Advances in the Chemical Composition and Biological Activities of Propolis,” <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2089164>, 2022, doi: 10.1080/87559129.2022.2089164.
- [251] S. Tsalamandris *et al.*, “The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives,” *European Cardiology Review*, vol. 14, no. 1, p. 50, 2019, doi: 10.15420/ECR.2018.33.1.
- [252] X. Yi *et al.*, “Flavonoids improve type 2 diabetes mellitus and its complications: a review,” *Front Nutr*, vol. 10, p. 1192131, May 2023, doi: 10.3389/FNUT.2023.1192131/BIBTEX.
- [253] N. Z. Ramli, K. Y. Chin, K. A. Zarkasi, and F. Ahmad, “A Review on the Protective Effects of Honey against Metabolic Syndrome,” *Nutrients 2018, Vol. 10, Page 1009*, vol. 10, no. 8, p. 1009, Aug. 2018, doi: 10.3390/NU10081009.
- [254] N. Samadi, H. Mozaffari-Khosravi, M. Rahmanian, and M. Askarishahi, “Effects of bee propolis supplementation on glycemic control, lipid profile and insulin resistance indices in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind clinical trial,” *J Integr Med*, vol. 15, no. 2, pp. 124–134, Mar. 2017, doi: 10.1016/S2095-4964(17)60315-7.
- [255] H. Laaroussi *et al.*, “Effect of antioxidant-rich propolis and bee pollen extracts against D-glucose induced type 2 diabetes in rats,” *Food Research International*, vol. 138, pp. 963–9969, 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109802.
- [256] M. Á. Martín and S. Ramos, “Dietary Flavonoids and Insulin Signaling in Diabetes and Obesity,” *Cells*, vol. 10, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/CELLS10061474.
- [257] M. Zhou, W. H. Konigsberg, C. Hao, Y. Pan, J. Sun, and X. Wang, “Bioactivity and mechanisms of flavonoids in decreasing insulin resistance,” <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2199168>, vol. 38, no. 1, p. 2199168, Dec. 2023, doi: 10.1080/14756366.2023.2199168.
- [258] H. R. El-Seedi *et al.*, “Honey Bee Products: Preclinical and Clinical Studies of Their Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties,” *Front Nutr*, vol. 8, p. 761267, Jan. 2022, doi: 10.3389/FNUT.2021.761267/BIBTEX.
- [259] L. Chen *et al.*, “Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 6, p. 7204, Jan. 2018, doi: 10.18632/ONCOTARGET.23208.
- [260] S. Kany, J. T. Vollrath, and B. Relja, “Cytokines in Inflammatory Disease,” *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 6008*, vol. 20, no. 23, p. 6008, Nov. 2019, doi: 10.3390/IJMS20236008.
- [261] M. A. M. Fadzil, S. Mustar, and A. A. Rashed, “The Potential Use of Honey as a Neuroprotective Agent for the Management of Neurodegenerative Diseases,” *Nutrients*, vol. 15, no. 7, Apr. 2023, doi: 10.3390/NU15071558.

- [262] R. Zhong *et al.*, “Anti-inflammatory activity of flavonols via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophages,” *Curr Res Food Sci*, vol. 5, p. 1176, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.CRFS.2022.07.007.
- [263] A. J. O. Lopes *et al.*, “Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: in silico, in vitro, and in vivo Studies,” *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 103, vol. 9, no. 2, p. 103, Jan. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9020103.
- [264] R. B. H. Idrus, N. Q. A. V. Sainik, A. Nordin, A. Bin Saim, and N. Sulaiman, “Cardioprotective Effects of Honey and Its Constituent: An Evidence-Based Review of Laboratory Studies and Clinical Trials,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, no. 10, May 2020, doi: 10.3390/IJERPH17103613.
- [265] B. Olas, “Bee Products as Interesting Natural Agents for the Prevention and Treatment of Common Cardiovascular Diseases,” *Nutrients*, vol. 14, no. 11, Jun. 2022, doi: 10.3390/NU14112267.
- [266] Z. Selamoglu Talas, “Propolis reduces oxidative stress in l-NAME-induced hypertension rats,” *Cell Biochem Funct*, vol. 32, no. 2, pp. 150–154, 2014, doi: 10.1002/CBF.2986.
- [267] H. Tashkandi, “Honey in wound healing: An updated review,” *Open Life Sci*, vol. 16, no. 1, p. 1091, Jan. 2021, doi: 10.1515/BIOL-2021-0084.
- [268] J. Yang *et al.*, “Research Progress on Therapeutic Effect and Mechanism of Propolis on Wound Healing,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/5798941.
- [269] A. Rzepecka-Stojko *et al.*, “Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity,” *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 21732-21749, vol. 20, no. 12, pp. 21732–21749, Dec. 2015, doi: 10.3390/MOLECULES201219800.
- [270] D. Lin *et al.*, “An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes,” *Molecules*, vol. 21, no. 10, Oct. 2016, doi: 10.3390/MOLECULES21101374.
- [271] O. Al Naser, “Effet des conditions environnementales sur les caractéristiques morpho-physiologiques et la teneur en métabolites secondaires chez *Inula montana*: une plante de la médecine traditionnelle Provençale”, Accessed: Dec. 03, 2023. [Online]. Available: <https://theses.hal.science/tel-01914978>
- [272] R. Gutiérrez-Escobar, M. J. Aliaño-González, and E. Cantos-Villar, “Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review,” *Molecules*, vol. 26, no. 3, Feb. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26030718.
- [273] T. Sawicki, M. Starowicz, L. Kłębukowska, and P. Hanus, “The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products,” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1301, vol. 27, no. 4, p. 1301, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27041301.
- [274] A. L. Becerril-sánchez, B. Quintero-salazar, O. Dublán-garcía, and H. B. Escalona-buendía, “Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical

- origin, and color,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 11, p. 1700, Nov. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10111700/S1.
- [275] B. Olas, “Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans?,” *Nutrients*, vol. 12, no. 2, Feb. 2020, doi: 10.3390/NU12020283.
- [276] N. F. Santos-Sánchez *et al.*, “Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds,” *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, Jan. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.83815.
- [277] L. P. de Souza, K. Garbowicz, Y. Brotman, T. Tohge, and A. R. Fernie, “The Acetate Pathway Supports Flavonoid and Lipid Biosynthesis in Arabidopsis,” *Plant Physiol*, vol. 182, no. 2, p. 857, Feb. 2020, doi: 10.1104/PP.19.00683.
- [278] H. H. Al Mamari and H. H. Al Mamari, “Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis,” Jul. 2021, doi: 10.5772/INTECHOPEN.98958.
- [279] J.-Jacques. Macheix, Annie. Fleuriet, and Christian. Jay-Allemand, “Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d’importance économique,” p. 192, 2005, Accessed: Dec. 07, 2023. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Les_compos%C3%A9s_ph%C3%A9noliques_des_v%C3%A9g%C3%A9taux.html?hl=fr&id=i9vvtEn8EcUC
- [280] H. Tijjani, M. H. Zangoma, Z. S. Mohammed, S. M. Obidola, C. Egbuna, and S. I. Abdulai, “Polyphenols: Classifications, Biosynthesis and Bioactivities,” *Functional Foods and Nutraceuticals*, pp. 389–414, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-42319-3_19.
- [281] oscar Laguna, “(PDF) Valorisation des composés phénoliques des tourteaux de colza et tournesol: du fractionnement des matières premières vers la synthèse de molécules multifonctionnelles.” Accessed: Dec. 19, 2023. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/333473900_Valorisation_des_composes_phenoliques_des_tourteaux_de_colza_et_tournesol_du_fractionnement_des_mati%C3%A9res_premi%C3%A8res_vers_la_synth%C3%A8se_de_mol%C3%A9cules_multifonctionnelles
- [282] Y. Zhang, P. Cai, G. Cheng, and Y. Zhang, “A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity,” *Nat Prod Commun*, vol. 17, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1177/1934578X211069721/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1934578X211069721-FIG1.JPEG.
- [283] J. Ponphaiboon, W. Krongrawa, W. W. Aung, N. Chinatankul, S. Limmatvapirat, and C. Limmatvapirat, “Advances in Natural Product Extraction Techniques, Electrospun Fiber Fabrication, and the Integration of Experimental Design: A Comprehensive Review,” *Molecules*, vol. 28, no. 13, Jul. 2023, doi: 10.3390/MOLECULES28135163.
- [284] I. Williams, S. Lee, A. Apriceno, R. P. Sear, and G. Battaglia, “Diffusioosmotic and convective flows induced by a nonelectrolyte concentration gradient,” *Proc Natl Acad Sci U S A*,

- vol. 117, no. 41, pp. 25263–25271, Oct. 2020, doi: 10.1073/PNAS.2009072117/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [285] H. Zhang *et al.*, “The Effect of Different Extraction Methods on Extraction Yield, Physicochemical Properties, and Volatile Compounds from Field Muskmelon Seed Oil,” *Foods* 2022, Vol. 11, Page 721, vol. 11, no. 5, p. 721, Feb. 2022, doi: 10.3390/FOODS11050721.
- [286] F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier, and M. Abert-Vian, “Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review,” *Ultrason Sonochem*, vol. 34, pp. 540–560, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2016.06.035.
- [287] B. Khadhraoui, V. Ummat, B. K. Tiwari, A. S. Fabiano-Tixier, and F. Chemat, “Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products,” *Ultrason Sonochem*, vol. 76, p. 105625, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2021.105625.
- [288] L. Panzella, F. Moccia, R. Nasti, S. Marzorati, L. Verotta, and A. Napolitano, “Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies,” *Front Nutr*, vol. 7, p. 538169, May 2020, doi: 10.3389/FNUT.2020.00060/BIBTEX.
- [289] P. C. Veggi, J. Martinez, and M. A. A. Meireles, “Fundamentals of microwave extraction,” *Food Engineering Series*, pp. 15–52, 2013, doi: 10.1007/978-1-4614-4830-3_2/COVER.
- [290] M. Letellier and H. Budzinski, “Microwave assisted extraction of organic compounds,” *Analisis*, vol. 27, no. 3, pp. 259–271, 1999, doi: 10.1051/ANALUSIS:1999116.
- [291] A. I. Talmaciu, I. Volf, and V. I. Popa, “A Comparative Analysis of the ‘Green’ Techniques Applied for Polyphenols Extraction from Bioresources,” *Chem Biodivers*, vol. 12, no. 11, pp. 1635–1651, Nov. 2015, doi: 10.1002/CBDV.201400415.
- [292] E. Ibáñez, J. A. Mendiola, and M. Castro-Puyana, “Supercritical Fluid Extraction,” *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 227–233, Sep. 2015, doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00675-9.
- [293] S. A. O. Santos, J. J. Villaverde, C. M. Silva, C. P. Neto, and A. J. D. Silvestre, “Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark,” *J Supercrit Fluids*, vol. 71, pp. 71–79, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.SUPFLU.2012.07.004.
- [294] B. Díaz-Reinoso, A. Moure, H. Domínguez, and J. C. Parajó, “Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity,” *J Agric Food Chem*, vol. 54, no. 7, pp. 2441–2469, Apr. 2006, doi: 10.1021/JF052858J.
- [295] R. Murga, R. Ruiz, S. Beltran, and J. L. Cabezas, “Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol,” *J Agric Food Chem*, vol. 48, no. 8, pp. 3408–3412, 2000, doi: 10.1021/JF9912506.

- [296] S. A. Radzali, M. Markom, and N. Md Saleh, "Parameter Effects and Optimisation in Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds from *Labisia pumila*," *Separations* 2022, Vol. 9, Page 385, vol. 9, no. 12, p. 385, Nov. 2022, doi: 10.3390/SEPARATIONS9120385.
- [297] M. Nemati, M. R. Afshar Mogaddam, M. A. Farazajdeh, M. Tuzen, and J. Khandaghi, "In-situ formation/decomposition of deep eutectic solvent during solidification of floating organic droplet-liquid-liquid microextraction method for the extraction of some antibiotics from honey prior to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J Chromatogr A*, vol. 1660, p. 462653, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.CHROMA.2021.462653.
- [298] C. S. Funari *et al.*, "Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis," *Food Research International*, vol. 125, p. 108559, Nov. 2019, doi: 10.1016/J.FOODRES.2019.108559.
- [299] U. Alpat, T. Nar, S. Karasu, and O. Sagdic, "Optimization of propolis extraction with natural deep eutectic solvents using central composite design," *Phytochem Lett*, vol. 58, pp. 49–59, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.PHYTOL.2023.09.013.
- [300] J. Wang, L. Zhou, Z. Wang, Y. Tao, L. Chen, and W. Zhang, "Effects of Natural Deep Eutectic Solvent on the Extraction Efficiency and Antioxidant Activities of *Toona Sinensis* Seed Polyphenols: Composition and Mechanism", doi: 10.2139/SSRN.4534155.
- [301] A. Abdu Hussen, "High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review," *Annals of Advances in Chemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 010–020, Jun. 2022, doi: 10.29328/JOURNAL.AAC.1001026.
- [302] Z. Can, O. Yildiz, H. Sahin, E. Akyuz Turumtay, S. Silici, and S. Kolayli, "An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles," *Food Chem*, vol. 180, pp. 133–141, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.024.
- [303] Y. Kara, Z. Can, and S. Kolaylı, "Applicability of Phenolic Profile Analysis Method Developed with RP-HPLC-PDA to some Bee Product," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 65, p. e22210384, Sep. 2022, doi: 10.1590/1678-4324-2022210384.
- [304] W. S. Ayoub *et al.*, "Exploiting the polyphenolic potential of honey in the prevention of chronic diseases," *Food Chemistry Advances*, vol. 3, p. 100373, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.FOCHA.2023.100373.
- [305] K. Georgieva *et al.*, "Phytochemical analysis of Vietnamese propolis produced by the stingless bee *Lisotrigona cacciae*," *PLoS One*, vol. 14, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0216074.
- [306] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Et-Touys, F. Lagrouh, N. Dakka, and Y. Bakri, "Analyse phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des échantillons du miel marocain," *Phytothérapie* 2017, pp. 1–5, Apr. 2017, doi: 10.1007/S10298-017-1122-3.
- [307] A. L. Becerril-sánchez, B. Quintero-salazar, O. Dublán-garcía, and H. B. Escalona-buendía, "Phenolic compounds in honey and their relationship with antioxidant activity, botanical origin, and color," *Antioxidants*, vol. 10, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10111700/S1.

- [308] D. Hernanz, M. J. Jara-Palacios, J. L. Santos, A. Gómez Pajuelo, F. J. Heredia, and A. Terrab, “The profile of phenolic compounds by HPLC-MS in Spanish oak (*Quercus*) honeydew honey and their relationships with color and antioxidant activity,” *LWT*, vol. 180, p. 114724, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.LWT.2023.114724.
- [309] E. Boulangé and E. B. Le, “Le miel en application cutanée: usages médical et cosmétique”, Accessed: Dec. 24, 2023. [Online]. Available: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03727446>
- [310] Ü. Altuntaş, İ. Güzel, and B. Özçelik, “Phenolic Constituents, Antioxidant and Antimicrobial Activity and Clustering Analysis of Propolis Samples Based on PCA from Different Regions of Anatolia,” *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 1121, vol. 28, no. 3, p. 1121, Jan. 2023, doi: 10.3390/MOLECULES28031121.
- [311] F. Giampieri *et al.*, “Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds,” *J Agric Food Chem*, vol. 70, no. 23, pp. 6833–6848, Jun. 2022, doi: 10.1021/ACS.JAFC.1C05822.
- [312] S. Boisard *et al.*, “Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis,” *J Agric Food Chem*, vol. 62, no. 6, pp. 1344–1351, Feb. 2014, doi: 10.1021/JF4053397/SUPPL_FILE/JF4053397_SI_001.PDF.
- [313] S. Touzani *et al.*, “In Vitro Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties,” *Biomed Res Int*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4836378.
- [314] C. Breton, F. Médail, and A. Bervillé, “*Olea europaea* subsp. *maroccana*: cette sous-espèce est-elle justifiée?”, *Le Journal de Botanique*, vol. 30, no. 1, pp. 19–25, 2005, doi: 10.3406/JOBOT.2005.1999.
- [315] A. Sánchez-Bautista, J. Coy, P. García-Shimizu, and J. C. Rodríguez, “From CLSI to EUCAST guidelines in the interpretation of antimicrobial susceptibility: What is the effect in our setting?”, *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)*, vol. 36, no. 4, pp. 229–232, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.EIMCE.2018.02.012.
- [316] K. Pobiega, K. Kraśniewska, D. Derewiaka, and M. Gniewosz, “Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods,” *J Food Sci Technol*, vol. 56, no. 12, pp. 5386–5395, Dec. 2019, doi: 10.1007/S13197-019-04009-9/TABLES/3.
- [317] A. Rzepecka-Stojko *et al.*, “Protective Effect of Polyphenol-Rich Extract from Bee Pollen in a High-Fat Diet,” *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 805, vol. 23, no. 4, p. 805, Mar. 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23040805.
- [318] O. I. Ogidi, P. C. Adigwe, U. E. Enenebeaku, and M. N. Ayebaboagha, “Determination of antimicrobial susceptibility of ethanol, methanol, and acetate extracts of processed honey,” *Journal of Apitherapy*, vol. 7, no. 1, pp. 1–5, Oct. 2019, doi: 10.5455/ja.20190812081333.

- [319] S. Şahin, Z. İlbay, and İ. Kırbaşlar, “Study on Optimum Extraction Conditions for Olive Leaf Extracts Rich in Polyphenol and Flavonoid,” *Sep Sci Technol*, vol. 50, no. 8, pp. 1181–1189, May 2015, doi: 10.1080/01496395.2014.966203.
- [320] N. Yusof, M. S. A. Munaim, and R. Veloo Kutty, “Optimization of total phenolic compounds extracted from propolis by ultrasound- assisted extraction,” *Chem Eng Commun*, vol. 208, no. 4, pp. 564–572, 2021, doi: 10.1080/00986445.2020.1761799.
- [321] M. Oroian, F. Dranca, and F. Ursachi, “Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis,” *J Food Sci Technol*, vol. 57, no. 1, p. 70, Jan. 2020, doi: 10.1007/S13197-019-04031-X.
- [322] G. Papotti, D. Bertelli, L. Bortolotti, and M. Plessi, “Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods,” *J Agric Food Chem*, vol. 60, no. 11, pp. 2852–2862, Mar. 2012, doi: 10.1021/JF205179D.
- [323] P. Ferreira-Santos *et al.*, “Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycocyanin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis*,” *LWT*, vol. 128, p. 109491, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.LWT.2020.109491.
- [324] E. F. Hartree, “Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response,” *Anal Biochem*, vol. 48, no. 2, pp. 422–427, 1972, doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2.
- [325] I. B. S. Cunha *et al.*, “Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts,” *J Braz Chem Soc*, vol. 15, no. 6, pp. 964–970, 2004, doi: 10.1590/S0103-50532004000600026.
- [326] L. B. de Caland, E. L. C. Silveira, and M. Tubino, “Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium cations in biodiesel by ion chromatography,” *Anal Chim Acta*, vol. 718, pp. 116–120, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.ACA.2011.12.062.
- [327] M. Pérez, I. Dominguez-López, and R. M. Lamuela-Raventós, “The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern,” *J Agric Food Chem*, vol. 71, no. 46, pp. 17543–17553, Nov. 2023, doi: 10.1021/ACS.JAFC.3C04022/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF3C04022_0008.GIF.
- [328] D. Pauliuc, F. Dranca, and M. Oroian, “Antioxidant activity, total phenolic content, individual phenolics and physicochemical parameters suitability for Romanian honey authentication,” *Foods*, vol. 9, no. 3, 2020, doi: 10.3390/FOODS9030306.
- [329] F. Galeotti, F. Maccari, A. Fachini, and N. Volpi, “Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products,” *Foods*, vol. 7, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.3390/FOODS7030041.
- [330] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,” *Free Radic Biol Med*, vol. 26, no. 9–10, pp. 1231–1237, May 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

- [331] M. Martinello, F. Mutinelli, I. Zooprofilattico, and S. Delle Venezie, "Antioxidant Activity in Bee Products: A Review," *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 71, vol. 10, no. 1, p. 71, Jan. 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10010071.
- [332] K. A. Wojtunik-Kulesza, P. B. Drasar, and V. A. Khripach, "molecules Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes", doi: 10.3390/molecules25225267.
- [333] L. S. Chua, N. L. A. Rahaman, N. A. Adnan, and T. T. Eddie Tan, "Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components," *J Anal Methods Chem*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/313798.
- [334] A. M. Vivar-Quintana, M. I. González-Martín, I. Revilla, and E. V. Betances-Salcedo, "Determination and quantification of phenolic acids in raw propolis by reversed phase high performance liquid chromatography. Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy," *J Apic Res*, vol. 57, no. 5, pp. 648–656, Oct. 2018, doi: 10.1080/00218839.2018.1494915.
- [335] M. M. J. Arsène *et al.*, "Antifungal activity of silver nanoparticles prepared using Aloe vera extract against *Candida albicans*," *Vet World*, vol. 16, no. 1, p. 18, Jan. 2023, doi: 10.14202/VETWORLD.2023.18-26.
- [336] I. Nikolic *et al.*, "An Optimized Checkerboard Method for Phage-Antibiotic Synergy Detection," *Viruses*, vol. 14, no. 7, Jul. 2022, doi: 10.3390/V14071542/S1.
- [337] P. A. Kamble and M. Phadke, "Use of checkerboard assay to determine the synergy between essential oils extracted from leaves of *Aegle marmelos* (L.) Correa and nystatin against *Candida albicans*," *Ayu*, vol. 44, no. 1, p. 38, 2023, doi: 10.4103/AYU.AYU_397_21.
- [338] N. F. Garcia de Carvalho, D. N. Sato, F. R. Pavan, L. Ferrazoli, and E. Chimara, "Resazurin Microtiter Assay for Clarithromycin Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* Group," *J Clin Lab Anal*, vol. 30, no. 5, pp. 751–755, Sep. 2016, doi: 10.1002/JCLA.21933.
- [339] M. P. Udumula *et al.*, "High fructose and streptozotocin induced diabetic impairments are mitigated by Indirubin-3-hydrazone via downregulation of PKR pathway in Wistar rats," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-92345-2.
- [340] Z. Liu *et al.*, "Antidiabetic effects of malonyl ginsenosides from *Panax ginseng* on type 2 diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin," *J Ethnopharmacol*, vol. 145, no. 1, pp. 233–240, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.JEP.2012.10.058.
- [341] R. Hoseinzadeh Hesas, A. Arami-Niya, W. M. A. Wan Daud, and J. N. Sahu, "Preparation of granular activated carbon from oil palm shell by microwave-induced chemical activation: Optimisation using surface response methodology," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 91, no. 12, pp. 2447–2456, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.CHERD.2013.06.004.
- [342] A. R. Keshtkar, M. A. Moosavian, H. Sohbatzadeh, and M. Mofras, "La(III) and Ce(III) biosorption on sulfur functionalized marine brown algae *Cystoseira indica* by xanthation method: Response surface methodology, isotherm and kinetic study," *Groundw Sustain Dev*, vol. 8, pp. 144–155, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.GSD.2018.10.005.

- [343] K. Anwar, M. Said, M. Afizal, and M. Amin, "Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes," *Journal of Applied Science & Process Engineering*, vol. 2, no. 1, pp. 8–17, Apr. 2015, doi: 10.33736/JASPE.161.2015.
- [344] W. A. Jensen, "Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments 4th edition," *Journal of Quality Technology*, vol. 49, no. 2, pp. 186–188, Apr. 2017, doi: 10.1080/00224065.2017.11917988.
- [345] R. Prado, "Introduction to Design of Experiments," *Am Stat*, vol. 62, no. 4, pp. 362–362, Nov. 2008, doi: 10.1198/TAS.2008.S273.
- [346] M. Moriyama, N. Hayashi, C. Ohyabu, M. Mukai, S. Kawano, and S. Kumagai, "Performance evaluation and cross-reactivity from insulin analogs with the ARCHITECT insulin assay," *Clin Chem*, vol. 52, no. 7, pp. 1423–1426, Jul. 2006, doi: 10.1373/CLINCHEM.2005.065995.
- [347] V. Chandrashekar, "Hb A1c Separation by High Performance Liquid Chromatography in Hemoglobinopathies," *Scientifica (Cairo)*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/2698362.
- [348] K. Okita *et al.*, "Homeostasis model assessment of insulin resistance for evaluating insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes on insulin therapy," *Endocr J*, vol. 60, no. 3, pp. 283–290, 2013, doi: 10.1507/ENDOCRJ.EJ12-0320.
- [349] T. Amira *et al.*, "Application of factorial design to the study of the effect of drying conditions on α -tocopherol content in prickly pear seed oil," *Agriculture and Biotechnology*, vol. 19, no. 8, pp. 759–765, Accessed: Oct. 17, 2023. [Online]. Available: www.jnsiences.org
- [350] V. Watts, "13.5 Testing the Significance of the Overall Model," Sep. 01, 2022, *Fanshawe College Pressbooks*.
- [351] S. Bhattacharya, S. Sae-Tia, and B. C. Fries, "Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance," *Antibiotics 2020, Vol. 9, Page 312*, vol. 9, no. 6, p. 312, Jun. 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9060312.
- [352] Y. Lee, E. Puumala, N. Robbins, and L. E. Cowen, "Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond," *Chem Rev*, vol. 121, no. 6, p. 3390, Mar. 2021, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.0C00199.
- [353] M. E. E. D. Ibrahim and R. M. Alqurashi, "Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts," *Int J Food Microbiol*, vol. 361, p. 109463, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2021.109463.
- [354] N. Pujirahayu, H. Ritonga, and Z. Uslinawaty, "PROPERTIES AND FLAVONOIDS CONTENT IN PROPOLIS OF SOME EXTRACTION METHOD OF RAW PROPOLIS Original Article," 2014.
- [355] L. Saccardi, J. Schiebl, K. Weber, O. Schwarz, S. Gorb, and A. Kovalev, "Adhesive Behavior of Propolis on Different Substrates," *Front Mech Eng*, vol. 7, p. 32, May 2021, doi: 10.3389/FMECH.2021.660517/BIBTEX.

- [356] J. S. Bonvehí and F. J. O. Bermejo, "Element content of propolis collected from different areas of South Spain," *Environ Monit Assess*, vol. 185, no. 7, pp. 6035–6047, Jul. 2013, doi: 10.1007/S10661-012-3004-3.
- [357] S. Touzani *et al.*, "Determination of Phenolic Compounds in Various Propolis Samples Collected from an African and an Asian Region and Their Impact on Antioxidant and Antibacterial Activities," *Molecules*, vol. 26, no. 15, Aug. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26154589.
- [358] N. El Menyiy, M. Bakour, A. El Ghouizi, S. El Guendouz, and B. Lyoussi, "Influence of Geographic Origin and Plant Source on Physicochemical Properties, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of Moroccan Propolis," *Int J Food Sci*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/5570224.
- [359] G. Grassi, G. Capasso, E. Gambacorta, and A. M. Perna, "Chemical and Functional Characterization of Propolis Collected from Different Areas of South Italy," *Foods*, vol. 12, no. 18, p. 3481, Sep. 2023, doi: 10.3390/FOODS12183481.
- [360] G. G. De Lima, R. O. De Souza, A. D. Bozzi, M. A. Poplawska, D. M. Devine, and M. J. D. Nugent, "Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels," *J Pharm Sci*, vol. 105, no. 3, pp. 1248–1257, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.XPHS.2015.12.027.
- [361] H. Laaroussi *et al.*, "Unraveling the chemical composition, antioxidant, α -amylase and α -glucosidase inhibition of Moroccan propolis," *Food Biosci*, vol. 42, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.fbio.2021.101160.
- [362] D. Devequi-Nunes *et al.*, "Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction," *PLoS One*, vol. 13, no. 12, p. e0207676, Dec. 2018, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0207676.
- [363] B. A. S. Machado *et al.*, "Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil," *PLoS One*, vol. 11, no. 1, p. e0145954, Jan. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0145954.
- [364] D. Kasote, V. Bankova, and A. M. Viljoen, "Propolis: chemical diversity and challenges in quality control," *Phytochemistry Reviews* 2022 21:6, vol. 21, no. 6, pp. 1887–1911, May 2022, doi: 10.1007/S11101-022-09816-1.
- [365] V. R. Pasupuleti, L. Sammugam, N. Ramesh, and S. H. Gan, "Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/1259510.
- [366] N. A. Abdullah, N. Zulkiflee, S. N. Z. Zaini, H. Taha, F. Hashim, and A. Usman, "Phytochemicals, mineral contents, antioxidants, and antimicrobial activities of propolis produced by Brunei stingless bees *Geniotrigona thoracica*, *Heterotrigona itama*, and *Tetrigona binghami*," *Saudi J Biol Sci*, vol. 27, no. 11, pp. 2902–2911, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.SJBS.2020.09.014.
- [367] M. Dogan, S. Silici, R. Saraymen, and I. O. Ilhan, "Element content of propolis from different regions of Turkey," *Acta Aliment*, vol. 35, no. 1, pp. 127–130, Feb. 2006, doi: 10.1556/AALIM.35.2006.1.14.

- [368] O. Bobiş, “Plants: Sources of Diversity in Propolis Properties,” *Plants* 2022, Vol. 11, Page 2298, vol. 11, no. 17, p. 2298, Sep. 2022, doi: 10.3390/PLANTS11172298.
- [369] “Moroccan Propolis: Unraveling the Phytochemical Diversity, Chemical Composition, and Antioxidant Potential Across Two Seasons,” *Tropical Journal of Natural Product Research*, vol. 7, no. 9, Oct. 2023, doi: 10.26538/TJNPR/V7I9.19.
- [370] E. K. Soltani *et al.*, “Polyphenol Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous Algerian Propolis Extracts,” *Phytothérapie*, vol. 19, no. 5–6, pp. 408–415, Oct. 2021, doi: 10.3166/PHYTO-2021-0282.
- [371] M. Stanciuskaite, M. Marksa, M. Liaudanskas, L. Ivanauskas, M. Ivaskiene, and K. Ramanauskiene, “Extracts of Poplar Buds (*Populus balsamifera* L., *Populus nigra* L.) and Lithuanian Propolis: Comparison of Their Composition and Biological Activities,” *Plants (Basel)*, vol. 10, no. 5, May 2021, doi: 10.3390/PLANTS10050828.
- [372] W. Gargouri, S. M. Osés, M. A. Fernández-Muiño, M. T. Sancho, and N. Kechaou, “Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis,” *LWT*, vol. 111, pp. 328–336, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.LWT.2019.05.044.
- [373] X. Wang *et al.*, “Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea,” *BMC Complement Altern Med*, vol. 16, no. 1, Feb. 2016, doi: 10.1186/S12906-016-1043-Y.
- [374] M. S. Hernández Zarate *et al.*, “Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico,” *Food Science and Technology*, vol. 38, no. 2, pp. 210–215, Apr. 2018, doi: 10.1590/FST.29916.
- [375] T. Ozdal, G. Sari-Kaplan, E. Mutlu-Altundag, D. Boyacioglu, and E. Capanoglu, “Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line,” *J Apic Res*, vol. 57, no. 5, pp. 627–638, Oct. 2018, doi: 10.1080/00218839.2018.1494888.
- [376] A. Bouaroura, N. Segueni, J. G. Diaz, C. Bensouici, S. Akkal, and S. Rhouati, “Preliminary analysis of the chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of Algerian propolis,” *Nat Prod Res*, vol. 34, no. 22, pp. 3257–3261, Nov. 2020, doi: 10.1080/14786419.2018.1556658.
- [377] M. Milek *et al.*, “The Study of Chemical Profile and Antioxidant Properties of Poplar-Type Polish Propolis Considering Local Flora Diversity in Relation to Antibacterial and Anticancer Activities in Human Breast Cancer Cells,” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 725, vol. 27, no. 3, p. 725, Jan. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27030725.
- [378] S. Touzani *et al.*, “Determination of Phenolic Compounds in Various Propolis Samples Collected from an African and an Asian Region and Their Impact on Antioxidant and Antibacterial Activities,” *Molecules*, vol. 26, no. 15, Aug. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26154589.
- [379] M. I. Stavropoulou *et al.*, “NMR metabolic profiling of Greek propolis samples: Comparative evaluation of their phytochemical compositions and investigation of their anti-ageing

- and antioxidant properties,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 194, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.JPBA.2020.113814.
- [380] K. Pobiega, A. M. Kot, J. L. Przybył, A. Synowiec, and M. Gniewosz, “Comparison of the Chemical Composition and Antioxidant Properties of Propolis from Urban Apiaries,” *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 6744, vol. 28, no. 18, p. 6744, Sep. 2023, doi: 10.3390/MOLECULES28186744.
- [381] P. P. Wieczorek *et al.*, “Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis as a Source for the Development of New Pharmaceutical Products,” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1600, vol. 27, no. 5, p. 1600, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27051600.
- [382] D. S. Dezmirean, C. Pașca, A. R. Moise, and O. Bobiș, “Plant Sources Responsible for the Chemical Composition and Main Bioactive Properties of Poplar-Type Propolis,” *Plants (Basel)*, vol. 10, no. 1, pp. 1–20, Jan. 2020, doi: 10.3390/PLANTS10010022.
- [383] D. Kasote, V. Bankova, and A. M. Viljoen, “Propolis: chemical diversity and challenges in quality control,” *Phytochemistry Reviews* 2022 21:6, vol. 21, no. 6, pp. 1887–1911, May 2022, doi: 10.1007/S11101-022-09816-1.
- [384] P. P. Wieczorek *et al.*, “Chemical Variability and Pharmacological Potential of Propolis as a Source for the Development of New Pharmaceutical Products,” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1600, vol. 27, no. 5, p. 1600, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27051600.
- [385] A. Özkök, M. Keskin, A. E. Tanuğur Samancı, E. Yorulmaz Önder, and Ç. Takma, “Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis,” *Appl Biol Chem*, vol. 64, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S13765-021-00608-3.
- [386] P. Okinczyc *et al.*, “Profile of Polyphenolic and Essential Oil Composition of Polish Propolis, Black Poplar and Aspens Buds,” *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 1262, vol. 23, no. 6, p. 1262, May 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23061262.
- [387] E. N. Quiroga, D. A. Sampietro, J. R. Soberón, M. A. Sgariglia, and M. A. Vattuone, “Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles,” *J Appl Microbiol*, vol. 101, no. 1, pp. 103–110, 2006, doi: 10.1111/J.1365-2672.2006.02904.X.
- [388] M. C. Fernández-Calderón *et al.*, “Antifungal and anti-biofilm activity of a new Spanish extract of propolis against *Candida glabrata*,” *BMC Complement Med Ther*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12906-021-03323-0.
- [389] N. Yusof, M. S. A. Munaim, and R. Veloo Kutty, “Optimization of total phenolic compounds extracted from propolis by ultrasound- assisted extraction,” *Chem Eng Commun*, vol. 208, no. 4, pp. 564–572, 2021, doi: 10.1080/00986445.2020.1761799.
- [390] R. I. Cavalaro, R. G. da Cruz, S. Dupont, J. M. L. N. de Moura Bell, and T. M. F. de S. Vieira, “In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction,” *Food Chem X*, vol. 4, p. 100054, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.FOCHX.2019.100054.

- [391] Q. D. Do *et al.*, “Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*,” *J Food Drug Anal*, vol. 22, no. 3, pp. 296–302, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.JFDA.2013.11.001.
- [392] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, “Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review,” *Chinese Medicine (United Kingdom)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–26, Apr. 2018, doi: 10.1186/S13020-018-0177-X/FIGURES/4.
- [393] T. Dhanani, S. Shah, N. A. Gajbhiye, and S. Kumar, “Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. S1193–S1199, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.ARABJC.2013.02.015.
- [394] M. Peanparkdee, J. Patrawart, and S. Iwamoto, “Effect of extraction conditions on phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity of bran extracts from Thai rice cultivars,” *J Cereal Sci*, vol. 86, pp. 86–91, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.JCS.2019.01.011.
- [395] A. Mokrani and K. Madani, “Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit,” *Sep Purif Technol*, vol. 162, pp. 68–76, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.SEPPUR.2016.01.043.
- [396] C. Sun, Z. Wu, Z. Wang, and H. Zhang, “Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts,” *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/595393.
- [397] R. I. Cavalaro, L. F. de F. Fabricio, and T. M. F. de S. Vieira, “Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants from *Baccharis dracunculifolia* and Green Propolis,” *Processes 2020*, Vol. 8, Page 1530, vol. 8, no. 12, p. 1530, Nov. 2020, doi: 10.3390/PR8121530.
- [398] M. Gallo, L. Ferrara, and D. Naviglio, “Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective,” *Foods 2018*, Vol. 7, Page 164, vol. 7, no. 10, p. 164, Oct. 2018, doi: 10.3390/FOODS7100164.
- [399] R. Esmaeilzadeh Kenari, F. Mohsenzadeh, and Z. R. Amiri, “Antioxidant activity and total phenolic compounds of Dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods,” *Food Sci Nutr*, vol. 2, no. 4, pp. 426–435, Jul. 2014, doi: 10.1002/FSN3.118.
- [400] F. Dranca and M. Oroian, “Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel,” *Ultrason Sonochem*, vol. 31, pp. 637–646, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2015.11.008.
- [401] A. Hagar, M. Ibrahim, and N. F. A. Rani, “PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OPTIMIZATION OF TRIGONA HONEY AND PROPOLIS USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY,” *INTERNATIONAL JOURNAL OF ALLIED HEALTH SCIENCES*, vol. 5, no. 1, pp. 2142–2142, Apr. 2021, Accessed: Oct. 29, 2021. [Online]. Available: <https://journals.iium.edu.my/ijahs/index.php/IJAHs/article/view/579>
- [402] K. Ramanauskiene, A. M. Inkeniene, V. Petrikaite, and V. Briedis, “Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/842985.

- [403] Q. Ding *et al.*, “Chinese Propolis: Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison,” *Food Sci Nutr*, vol. 9, no. 1, pp. 313–330, Jan. 2021, doi: 10.1002/FSN3.1997.
- [404] S. N. A. Syed Salleh, N. A. Mohd Hanapiah, H. Ahmad, W. L. Wan Johari, N. H. Osman, and M. R. Mamat, “Determination of Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity and GC-MS Analysis of Malaysian Stingless Bee Propolis Water Extracts,” *Scientifica (Cairo)*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/3789351.
- [405] K. L. Yeo, C. P. Leo, and D. J. C. Chan, “Ultrasonic Enhancement on Propolis Extraction at Varied pH and Alcohol Content,” *J Food Process Eng*, vol. 38, no. 6, pp. 562–570, Dec. 2015, doi: 10.1111/JFPE.12186.
- [406] V. Marinković, “A novel desirability function for multi-response optimization and its application in chemical engineering,” *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, vol. 26, no. 3, pp. 309–319, 2020, doi: 10.2298/CICEQ190715007M.
- [407] W. N. H. W. Zainal, N. A. A. M. Azian, S. S. Albar, and A. S. Rusli, “Effects of extraction method, solvent and time on the bioactive compounds and antioxidant activity of *Tetrigona apicalis* Malaysian propolis,” <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1930958>, 2021, doi: 10.1080/00218839.2021.1930958.
- [408] M. Woźniak, L. Mrówczyńska, A. Waśkiewicz, T. Rogoziński, and I. Ratajczak, “Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Propolis Extracts From Poland:,” <https://doi.org/10.1177/1934578X19849777>, vol. 14, no. 5, pp. 1–7, May 2019, doi: 10.1177/1934578X19849777.
- [409] M. Oroian, F. Ursachi, and F. Dranca, “Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis,” *Ultrason Sonochem*, vol. 64, p. 105021, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2020.105021.
- [410] M. G. Shehata, F. T. Ahmad, A. N. Badr, S. H. Masry, and S. A. El-Sohaimy, “Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions,” *Annals of Agricultural Sciences*, vol. 65, no. 2, pp. 209–217, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.AOAS.2020.12.001.
- [411] D. J. Bhuyan *et al.*, “Broad-spectrum pharmacological activity of Australian propolis and metabolomic-driven identification of marker metabolites of propolis samples from three continents,” *Food Funct*, vol. 12, no. 6, pp. 2498–2519, Mar. 2021, doi: 10.1039/D1FO00127B.
- [412] H. Laaroussi *et al.*, “Protective Effect of Honey and Propolis against Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Hepatorenal Damages,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/9719906.
- [413] M. Ratajczak, D. Kaminska, E. Matuszewska, E. Hołderna-Kedzia, J. Rogacki, and J. Matysiak, “Promising Antimicrobial Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products,” *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4007, vol. 26, no. 13, p. 4007, Jun. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26134007.
- [414] N. A. Didaras, K. Karatasou, T. G. Dimitriou, G. D. Amoutzias, and D. Mossialos, “Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future

- Perspectives,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 11, pp. 1–29, Nov. 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9110811.
- [415] R. A. Nader, R. Mackieh, R. Wehbe, D. El Obeid, J. M. Sabatier, and Z. Fajloun, “Beehive Products as Antibacterial Agents: A Review,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS10060717.
- [416] F. Prestinaci, P. Pezzotti, and A. Pantosti, “Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon,” *Pathog Glob Health*, vol. 109, no. 7, p. 309, Oct. 2015, doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
- [417] N. Abdullah and N. L. Chin, “Simplex-centroid mixture formulation for optimised composting of kitchen waste,” *Bioresour Technol*, vol. 101, no. 21, pp. 8205–8210, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2010.05.068.
- [418] S. Oussaid *et al.*, “Optimization of the extraction of phenolic compounds from *Scirpus holoschoenus* using a simplex centroid design for antioxidant and antibacterial applications,” *LWT*, vol. 86, pp. 635–642, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.LWT.2017.08.064.
- [419] R. Mukherjee, A. Halder, S. Sansare, S. Naik, and B. Chaudhuri, “A Simplex Centroid Design to Quantify Triboelectric Charging in Pharmaceutical Mixtures,” *J Pharm Sci*, vol. 109, no. 5, pp. 1765–1771, May 2020, doi: 10.1016/J.XPHS.2020.02.001.
- [420] G. Cilia *et al.*, “Antibacterial Activity of Honey Samples from Ukraine,” *Vet Sci*, vol. 7, no. 4, pp. 1–14, Dec. 2020, doi: 10.3390/VETSCI7040181.
- [421] S. El-Guendouz *et al.*, “Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure,” *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/9759240.
- [422] V. A. Soares de Arruda *et al.*, “Brazilian bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity,” <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1840854>, vol. 60, no. 5, pp. 775–783, 2020, doi: 10.1080/00218839.2020.1840854.
- [423] Ş. Kıvrak and İ. Kıvrak, “Assessment of phenolic profile of Turkish honeys,” <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1188307>, vol. 20, no. 4, pp. 864–876, Apr. 2016, doi: 10.1080/10942912.2016.1188307.
- [424] S. Touzani *et al.*, “and Proteinuria via Hypoglycemic and Antioxidant Activity in Streptozotocin-Treated Rats,” *Cell Physiol Biochem*, vol. 56, pp. 66–81, 2022, doi: 10.33594/000000496.
- [425] E. Waś, T. Szczęsna, H. Rybak-Chmielewska, D. Teper, and K. Jaśkiewicz, “Application of hplc-dad technique for determination of phenolic compounds in bee pollen loads,” *J Apic Sci*, vol. 61, no. 1, pp. 153–162, Jun. 2017, doi: 10.1515/JAS-2017-0009.
- [426] M. Rajan, T. de Carvalho Batista, C. Santos de Oliveira, D. G. de Oliveira, and N. Narain, “Optimization of solvent extraction and HPLC-DAD method parameters for determination of phenolic compounds in various Brazilian propolis,” <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1996111>, 2021, doi: 10.1080/00218839.2021.1996111.

- [427] T. Sawicki, M. Starowicz, L. Kłębukowska, and P. Hanus, “The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products,” *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1301, vol. 27, no. 4, p. 1301, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27041301.
- [428] J. Kocot, M. Kielczykowska, D. Luchowska-Kocot, J. Kurzepa, and I. Musik, “Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/7074209.
- [429] Z. Kalaycıoğlu, H. Kaygusuz, S. Döker, S. Kolaylı, and F. B. Erım, “Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities,” *LWT*, vol. 84, pp. 402–408, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.LWT.2017.06.003.
- [430] R. El-Haskoury, W. Kriaa, B. Lyoussi, and M. Makni, “Ceratonia siliqua honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities,” *J Food Drug Anal*, vol. 26, no. 1, pp. 67–73, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.JFDA.2016.11.016.
- [431] Z. Can, O. Yildiz, H. Sahin, E. Akyuz Turumtay, S. Silici, and S. Kolayli, “An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles,” *Food Chem*, vol. 180, pp. 133–141, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.024.
- [432] E. Ulusoy and S. Kolayli, “Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee Pollen,” *J Food Biochem*, vol. 38, no. 1, pp. 73–82, Feb. 2014, doi: 10.1111/JFBC.12027.
- [433] X. Jiang *et al.*, “Grouping, Spectrum–Effect Relationship and Antioxidant Compounds of Chinese Propolis from Different Regions Using Multivariate Analyses and Off-Line Anti-DPPH Assay,” *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3243, vol. 25, no. 14, p. 3243, Jul. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25143243.
- [434] S. Mathew, T. E. Abraham, and Z. A. Zakaria, “Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions,” *J Food Sci Technol*, vol. 52, no. 9, p. 5790, Sep. 2015, doi: 10.1007/S13197-014-1704-0.
- [435] S. Smaoui *et al.*, “Statistical versus artificial intelligence -based modeling for the optimization of antifungal activity against *Fusarium oxysporum* using *Streptomyces* sp. strain TN71,” *J Mycol Med*, vol. 28, no. 3, pp. 551–560, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.MYCMED.2018.07.003.
- [436] S. Aazza, “Application of Multivariate Optimization for Phenolic Compounds and Antioxidants Extraction from Moroccan Cannabis sativa Waste,” *J Chem*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/9738656.
- [437] J. D. Reber, D. L. Eggett, and T. L. Parker, “Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries,” *Int J Food Sci Nutr*, vol. 62, no. 5, pp. 445–452, Aug. 2011, doi: 10.3109/09637486.2010.549115.
- [438] S. M. Osés, A. Pascual-Maté, M. A. Fernández-Muiño, T. M. López-Díaz, and M. T. Sancho, “Bioactive properties of honey with propolis,” *Food Chem*, vol. 196, pp. 1215–1223, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.10.050.

- [439] S. Wang, K. A. Meckling, M. F. Marcone, Y. Kakuda, and R. Tsao, “Synergistic, Additive, and Antagonistic Effects of Food Mixtures on Total Antioxidant Capacities,” *J Agric Food Chem*, vol. 59, no. 3, pp. 960–968, Feb. 2011, doi: 10.1021/JF1040977.
- [440] S. Baliyan *et al.*, “Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*,” *Molecules*, vol. 27, no. 4, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27041326.
- [441] Z. W. Ye, J. Zhang, D. M. Townsend, and K. D. Tew, “Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1850, no. 8, pp. 1607–1621, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2014.11.010.
- [442] T. Baj, A. Baryluk, and E. Sieniawska, “Application of mixture design for optimum antioxidant activity of mixtures of essential oils from *Ocimum basilicum* L., *Origanum majorana* L. and *Rosmarinus officinalis* L.,” *Ind Crops Prod*, vol. 115, pp. 52–61, May 2018, doi: 10.1016/J.INDCROP.2018.02.006.
- [443] N. F. Azahar, S. S. A. Gani, U. H. Zaidan, P. Bawon, and M. I. E. Halmi, “Optimization of the Antioxidant Activities of Mixtures of Melastomataceae Leaves Species (*M. malabathricum* Linn Smith, *M. decemfidum*, and *M. hirta*) Using a Simplex Centroid Design and Their Anti-Collagenase and Elastase Properties,” *Applied Sciences 2020, Vol. 10, Page 7002*, vol. 10, no. 19, p. 7002, Oct. 2020, doi: 10.3390/APP10197002.
- [444] J. Ouyang, F. Sun, W. Feng, Y. Xie, L. Ren, and Y. Chen, “Antimicrobial Activity of Galangin and Its Effects on Murein Hydrolases of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) Strain Mu50,” *Chemotherapy*, vol. 63, no. 1, pp. 20–28, Feb. 2018, doi: 10.1159/000481658.
- [445] M. Kępa *et al.*, “Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains,” *Biomed Res Int*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/7413504.
- [446] F. Kabir, S. Katayama, N. Tanji, and S. Nakamura, “Antimicrobial Effects of Chlorogenic Acid and Related Compounds,” *J Korean Soc Appl Biol Chem*, vol. 57, no. 3, pp. 359–365, 2014, doi: 10.1007/s13765-014-4056-6.
- [447] C. Habryka, R. Socha, and L. Juszczak, “Effect of Bee Pollen Addition on the Polyphenol Content, Antioxidant Activity, and Quality Parameters of Honey,” *Antioxidants*, vol. 10, no. 5, May 2021, doi: 10.3390/ANTIOX10050810.
- [448] C. Habryka, R. Socha, and L. Juszczak, “The Effect of Enriching Honey with Propolis on the Antioxidant Activity, Sensory Characteristics, and Quality Parameters,” *Molecules*, vol. 25, no. 5, Mar. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25051176.
- [449] M. Kacániová *et al.*, “The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia,” *Arch Biol Sci*, vol. 64, no. 3, pp. 927–934, 2012, doi: 10.2298/ABS1203927K.
- [450] L. Cornara, M. Biagi, J. Xiao, and B. Burlando, “Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products,” *Front Pharmacol*, vol. 8, no. JUN, p. 412, 2017, doi: 10.3389/FPHAR.2017.00412/BIBTEX.

- [451] H. Shi, H. Yang, X. Zhang, and L. Yu, "Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis," *J Agric Food Chem*, vol. 60, no. 50, pp. 12403–12410, Dec. 2012, doi: 10.1021/JF3042775/SUPPL_FILE/JF3042775_SI_001.PDF.
- [452] H. A. Kahraman *et al.*, "Ethanollic extract of Turkish bee pollen and propolis: phenolic composition, antiradical, antiproliferative and antibacterial activities," *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 36, no. 1, pp. 44–55, Dec. 2022, doi: 10.1080/13102818.2022.2045217.
- [453] S. El-Guendouz *et al.*, "Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/9759240.
- [454] O. Belmehdi *et al.*, "Chemical analysis, antibacterial, and antioxidant activities of flavonoid-rich extracts from four Moroccan propolis," *J Food Process Preserv*, vol. 45, no. 10, p. e15816, Oct. 2021, doi: 10.1111/JFPP.15816.
- [455] J. H. De Oliveira Reis *et al.*, "Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction," *PLoS One*, vol. 14, no. 7, p. e0219063, Jun. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0219063.
- [456] C. ; Zhang *et al.*, "Comparative Evaluation of the Phytochemical Profiles and Antioxidant Potentials of Olive Leaves from 32 Cultivars Grown in China," *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1292, vol. 27, no. 4, p. 1292, Feb. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27041292.
- [457] H. Laaroussi *et al.*, "Effect of antioxidant-rich propolis and bee pollen extracts against D-glucose induced type 2 diabetes in rats," *Food Research International*, vol. 138, p. 109802, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.FOODRES.2020.109802.
- [458] B. Bueno-Silva, A. Marsola, M. Ikegaki, S. M. Alencar, and P. L. Rosalen, "The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity," *Nat Prod Res*, vol. 31, no. 11, pp. 1318–1324, 2017, doi: 10.1080/14786419.2016.1239088.
- [459] A. Ragab El Barky, A. Abdel hamid Ezz, and T. Mostafa Mohammed, "The Potential Role of apigenin in Diabetes Mellitus," 2020, doi: 10.31579/2690-4861/032.
- [460] B. Salehi *et al.*, "The Therapeutic Potential of Apigenin," *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 1305, vol. 20, no. 6, p. 1305, Mar. 2019, doi: 10.3390/IJMS20061305.
- [461] J. K. Kim and S. U. Park, "Letter to the editor: RECENT STUDIES ON KAEMPFEROL AND ITS BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES," *EXCLI J*, vol. 19, pp. 627–634, 2020, doi: 10.17179/excli2020-2162.
- [462] J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, and M. Lopez-Lazaro, "A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 4, pp. 298–344, Apr. 2011, doi: 10.2174/138955711795305335.

- [463] J. Silva dos Santos, J. P. Gonçalves Cirino, P. de Oliveira Carvalho, and M. M. Ortega, "The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review," *Front Pharmacol*, vol. 11, p. 565700, Jan. 2021, doi: 10.3389/FPHAR.2020.565700/BIBTEX.
- [464] H. Torul, N. Küçükboyacı, U. Tamer, and Ç. Karasu, "Evaluation of phenolic compounds and protective effects of olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts on endothelial cells against hydrogen peroxide-induced toxicity," 2020, doi: 10.35333/jrp.2020.198.
- [465] J. Wainstein *et al.*, "Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats," <https://home.liebertpub.com/jmf>, vol. 15, no. 7, pp. 605–610, Jun. 2012, doi: 10.1089/JMF.2011.0243.
- [466] H. Abunab, W. L. Dator, and S. Hawamdeh, "Effect of olive leaf extract on glucose levels in diabetes-induced rats: A systematic review and meta-analysis," *J Diabetes*, vol. 9, no. 10, pp. 947–957, Oct. 2017, doi: 10.1111/1753-0407.12508.
- [467] K. Srinivasan, B. Viswanad, L. Asrat, C. L. Kaul, and P. Ramarao, "Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening," *Pharmacol Res*, vol. 52, no. 4, pp. 313–320, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.PHRS.2005.05.004.
- [468] M. Zhang, X. Y. Lv, J. Li, Z. G. Xu, and L. Chen, "The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model.," *Exp Diabetes Res*, vol. 2008, p. 704045, 2008, doi: 10.1155/2008/704045.
- [469] A. N. Wang, J. Carlos, G. M. Fraser, and J. J. McGuire, "Zucker Diabetic-Sprague Dawley (ZSDS) rat: Type 2 diabetes translational research model," *Exp Physiol*, vol. 107, no. 4, pp. 265–282, Apr. 2022, doi: 10.1113/EP089947.
- [470] I. G. Gvazava, O. S. Rogovaya, M. A. Borisov, E. A. Vorotelyak, and A. V. Vasiliev, "Pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus and Rodent Experimental Models," *Acta Naturae*, vol. 10, no. 1, p. 24, 2018, doi: 10.32607/20758251-2018-10-1-24-33.
- [471] H. Sun, X. Deng, F. Xiao, L. Chen, and H. Li, "Role of exercise training on insulin resistance and TNF- α in high-fat diet rats," *Front Med China*, vol. 3, no. 4, pp. 403–407, Dec. 2009, doi: 10.1007/S11684-009-0071-0/METRICS.
- [472] U. Risérus, W. C. Willett, and F. B. Hu, "Dietary fats and prevention of type 2 diabetes," *Prog Lipid Res*, vol. 48, no. 1, pp. 44–51, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2008.10.002.
- [473] E. Ravussin and S. R. Smith, "Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 967, pp. 363–378, 2002, doi: 10.1111/J.1749-6632.2002.TB04292.X.
- [474] X. Zhang *et al.*, "Bound Phenolics Ensure the Antihyperglycemic Effect of Rice Bran Dietary Fiber in db/ db Mice via Activating the Insulin Signaling Pathway in Skeletal Muscle and Altering Gut Microbiota," *J Agric Food Chem*, vol. 68, no. 15, pp. 4387–4398, Apr. 2020, doi: 10.1021/ACS.JAFC.0C00584/SUPPL_FILE/JF0C00584_SI_001.PDF.
- [475] S. Shetty and S. Kumari, "Fatty acids and their role in type-2 diabetes (Review)," *Exp Ther Med*, vol. 22, no. 1, May 2021, doi: 10.3892/ETM.2021.10138.

- [476] A. A. R. Al-Shudiefat, H. Alturk, H. J. Al-Ameer, M. Zihlif, and M. Alenazy, "Olive Leaf Extract of *Olea europaea* Reduces Blood Glucose Level through Inhibition of AS160 in Diabetic Rats," *Applied Sciences* 2023, Vol. 13, Page 5939, vol. 13, no. 10, p. 5939, May 2023, doi: 10.3390/APP13105939.
- [477] N. Al-Waili *et al.*, "Potential therapeutic effect of Moroccan propolis in hyperglycemia, dyslipidemia, and hepatorenal dysfunction in diabetic rats," *Iran J Basic Med Sci*, vol. 22, no. 11, pp. 1331–1339, Nov. 2019, doi: 10.22038/IJBMS.2019.33549.8004.
- [478] N. El Menyiy, N. Al-Wali, A. El Ghouizi, S. El-Guendouz, K. Salom, and B. Lyoussi, "Potential therapeutic effect of Moroccan propolis in hyperglycemia, dyslipidemia, and hepatorenal dysfunction in diabetic rats," *Iran J Basic Med Sci*, vol. 22, no. 11, p. 1331, 2019, doi: 10.22038/IJBMS.2019.33549.8004.
- [479] N. Rivera-Yañez, C. R. Rivera-Yañez, G. Pozo-Molina, C. F. Méndez-Catalá, A. R. Méndez-Cruz, and O. Nieto-Yañez, "Biomedical Properties of Propolis on Diverse Chronic Diseases and Its Potential Applications and Health Benefits," *Nutrients*, vol. 13, no. 1, pp. 1–31, Jan. 2021, doi: 10.3390/NU13010078.
- [480] N. Rivera-Yañez *et al.*, "Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/4360356.
- [481] R. Hossain *et al.*, "Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications," *Chinese Medicine* 2022 17:1, vol. 17, no. 1, . 1–60, Aug. 2022, doi: 10.1186/S13020-022-00651-2.
- [482] I. Akhlaghipour, A. Nasimi Shad, V. R. Askari, A. Maharati, and V. Baradaran Rahimi, "How caffeic acid and its derivatives combat diabetes and its complications: A systematic review," *J Funct Foods*, vol. 110, p. 105862, Nov. 2023, doi: 10.1016/J.JFF.2023.105862.
- [483] A. Da Porto *et al.*, "The Pivotal Role of Oleuropein in the Anti-Diabetic Action of the Mediterranean Diet: A Concise Review," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14010040.
- [484] P. K. Dikkala *et al.*, "Computational screening of phytochemicals for anti-diabetic drug discovery," *Phytochemistry, Computational Tools, and Databases in Drug Discovery*, pp. 285–311, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-90593-0.00009-5.
- [485] L. Micheli *et al.*, "Role of Hydroxytyrosol and Oleuropein in the Prevention of Aging and Related Disorders: Focus on Neurodegeneration, Skeletal Muscle Dysfunction and Gut Microbiota," *Nutrients* 2023, Vol. 15, Page 1767, vol. 15, no. 7, p. 1767, Apr. 2023, doi: 10.3390/NU15071767.

GELOSE CLED

1. Utilisation prévue

La gélose CLED est un milieu différentiel destiné à la détection qualitative et à l'isolement de microorganismes pathogènes dans des échantillons cliniques humains et d'autres échantillons.

La fonction de la gélose CLED est de soutenir le diagnostic, en particulier des patients atteints d'infections des voies urinaires. Les bacilles à Gram négatif tels que *Escherichia coli*, *Klebsiella* ou *Enterobacter*, ainsi que *Pseudomonas* et les bacilles aérobies apparentés, les entérocoques et staphylocoques à Gram positif peuvent se développer sur ce milieu. L'essaimage de *Proteus* est inhibé.

Tous les microorganismes sont des agents étiologiques courants des infections des voies urinaires, qu'il s'agisse d'infections nosocomiales ou communautaires. Cependant, le micro-organisme le plus commun isolé chez les patients atteints d'infections des voies urinaires est *Escherichia coli*. D'autres genres apparaissent un peu moins fréquemment, mais la fréquence de leur isolement augmente, en particulier dans les infections nosocomiales.

2. Principe de procédure

La digestion enzymatique de la caséine, de la gélose et de l'extrait de bœuf fournit des nutriments. Le lactose est une source d'énergie pour les bactéries qui sont capables de l'utiliser par un mécanisme fermentatif. La détection de la capacité de la bactérie à fermenter le lactose est permise par la présence de bleu de bromothymol dans le milieu, qui est un indicateur de pH. Les bactéries fermentant le lactose abaissent le pH du milieu et le font passer du turquoise au jaune. L'ajout de L-cystéine favorise la croissance des bactéries coliformes cystéine-dépendantes. La réduction des électrolytes dans le milieu inhibe l'essaimage de *Proteus*, permettant d'effectuer des tests urinaires quantitatifs à l'aide d'une anse calibrée.

3. Composition moyenne

En g/l d'eau distillée :	
Digeste enzymatique de la caséine	4,0 g
Digeste enzymatique de la gélatine	4,0 g
Extrait de bœuf	3,0 g
Lactose	10,0 g
L-cystéine	0,128 g
Bleu de bromothymol	0,02 g
Agar	15,0 g

pH 7,3± 0,2 à 25°C.

Aspect moyen - Clair, turquoise.

4. Préparation du milieu

Le milieu est prêt à l'emploi. Amener le milieu à température ambiante immédiatement avant utilisation.

5. Précautions

- Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement.
- Produit non automatisé.
- Le milieu contient des composants d'origine animale, qui peuvent être associés à la présence

d'agents pathogènes biologiques, et doit donc être manipulé conformément aux principes de manipulation des matières biologiques potentiellement infectieuses.

- Ne pas utiliser le milieu si celui-ci présente des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou d'autres signes de détérioration.
- Ne pas utiliser les boîtes endommagées.
- Ne pas utiliser les boîtes après la date d'expiration.
- La ré incubation de boîte préalablement inoculée n'est pas autorisée.
- Pour garantir des résultats de test corrects, suivre ces instructions.
- Si la manipulation du milieu diffère de celle décrite dans le présent manuel, le laboratoire est tenu de valider la procédure adoptée.

6. Stockage

Conserver les boîtes entre 2 et 12 °C jusqu'à la date de péremption. Conserver les boîtes dans leur emballage d'origine, en position inversée (côté gélose vers le haut), à l'abri des sources de lumière directe. Pour éviter la congélation de la gélose, ne pas conserver les boîtes près des parois du réfrigérateur. Pour éviter l'apparition de condensation d'eau sur le couvercle de la boîte, ne pas ouvrir le réfrigérateur plus souvent que nécessaire et ne pas stocker les boîtes dans un réfrigérateur trop rempli.

7. Type d'échantillons

Échantillons cliniques humains, y compris les échantillons d'urine et autres échantillons.

Prélever les échantillons conformément aux lignes directrices en vigueur. Conservez les échantillons jusqu'à leur livraison au laboratoire conformément à la politique de stockage du laboratoire. Conserver l'urine dans un réfrigérateur à 4 °C

°C). Inoculer les échantillons dès que possible après la livraison du matériel au laboratoire.

8. Procédure du test

1. Laisser le milieu revenir à température ambiante avant de procéder à l'inoculation.
2. Inoculer l'échantillon en l'étalant directement sur la surface de la gélose.
3. Si l'échantillon est prélevé sur un écouvillon, faire tourner doucement l'extrémité de l'écouvillon sur une petite surface de gélose juste autour des bords de la boîte, puis inoculer l'échantillon en utilisant la méthode des stries à l'aide d'une anse stérile.
4. Incuber les plaques inoculées à 35 2°C pendant 18 à 24 heures.
5. Examiner le résultat de la croissance après 18 à 24 heures d'incubation.

Suivre les directives en vigueur lors de l'analyse des échantillons d'urine.

Compter les colonies sur le milieu et interpréter les résultats obtenus conformément aux directives en vigueur.

I.1 Morphologie typique des colonies cultivées sur la gélose CLED :

Micro-organisme	Morphologie typique des colonies / couleur du milieu
<i>Escherichia coli</i>	Colonies jaunes opaques, coloration jaune du milieu
<i>Klebsiella, Enterobacter</i>	Jaune à bleu blanchâtre, colonies muqueuses, coloration jaune du milieu
<i>Proteus</i>	Colonies bleues transparentes, coloration turquoise du milieu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies vertes à surface mate et bords irréguliers, coloration turquoise du support
<i>Salmonella</i>	Colonies bleues et plates, coloration turquoise du milieu

ANNEXES : LISTE DES MILIEUX DE CULTURE BACTERIOLOGIQUES

<i>Enterococcus</i>	Petites colonies jaunes, coloration jaune du milieu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonies jaunes, coloration jaune du milieu
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colonies jaune pâle, plus opaques que <i>Staphylococcus aureus</i>

Pour l'identification définitive des micro-organismes en culture, des tests supplémentaires et/ou des tests d'identification doivent être effectués à l'aide d'autres méthodes utilisées en laboratoire.



Morphologie des colonies et schéma de croissance d'*Escherichia coli* sur gélose CLED

9. Contrôle qualité

Les propriétés nutritionnelles et de différenciation du milieu doivent être vérifiées avec des souches de référence donnant des réactions positives et négatives. Le test doit être effectué en utilisant des cultures pures de 18 à 24 heures de souches de référence donnant les réactions souhaitées. Utiliser les souches de référence suivantes pour effectuer le contrôle de qualité du milieu :

Souche de référence :	Intensité de la croissance :	Morphologie de la colonie :
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bonne croissance	Grand, jaune, opaque
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Bonne croissance	Petit, jaune
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Bonne croissance	Jaune
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Bonne croissance	Vert, mat avec des bords irréguliers

10. Limites de la méthode

- En raison de la variabilité de la valeur nutritionnelle du milieu, certaines souches peuvent mal se développer ou pas du tout sur la gélose CLED.
- Si la présence d'agents pathogènes tels que *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia*, *Ureaplasma* dans l'urine est suspectée, les cultures doivent être effectuées sur des milieux dédiés à la culture de ces micro-organismes.
- Bien que le milieu permette de différencier les micro-organismes en fonction de leur capacité à fermenter le lactose, des tests biochimiques et immunologiques supplémentaires sont

nécessaires pour une identification définitive.

GELOSE DE CHAPMAN AU MANNITOL

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose de Chapman au mannitol permet l'isolement sélectif, la recherche et le dénombrement des staphylocoques pathogènes dans les eaux filtrables telles que les eaux de piscine, de consommation humaine ou encore d'établissements de soins. Elle est également utilisée pour la recherche de *Staphylococcus aureus* selon la Pharmacopée et dans les produits cosmétiques.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans la Pharmacopée européenne et dans la norme NFEN ISO 22718 en Cosmétiques.

2 HISTORIQUE

Les expériences de Koch ont montré que les staphylocoques supportent les milieux hypersalés à 7,5 %. Chapman a confirmé ces premiers résultats en observant que les staphylocoques coagulant le plasma de lapin présentaient des colonies jaunes sur le milieu auquel il a donné son nom, alors que la plupart des autres bactéries étaient inhibées.

3 PRINCIPE

La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques.

La fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.

La mise en évidence des staphylocoques pathogènes devra être confirmée par la recherche de la coagulase

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales. Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 5,0 g
- Peptone pepsique de viande..... 5,0 g
- Extrait de viande..... 1,0 g
- Mannitol 10,0 g
- Chlorure de sodium 75,0 g
- Rouge de phénol..... 25,0 mg
- Agar agar bactériologique 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : $7,4 \pm 0,2$.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 111,0 g de milieu déshydraté (BK030) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles (Ø 55 mm ou 90 mm selon l'application) et laisser solidifier sur une surface froide.

✓ **Reconstitution :**
111,0 g/L

✓ **Stérilisation :**

6 MODE D'EMPLOI

Détection de *Staphylococcus aureus* (Pharmacopée, NF EN ISO 22718)

- Faire sécher les boîtes de 90 mm à l'étuve, couvercle entrouvert.
- A la surface du milieu préparé en boîtes, transférer 0,1 mL de l'inoculum.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 30-35 °C pendant 18 à 24 heures.

✓ **Ensemencement :**
0,1 mL en surface

✓ **Incubation :**

Contrôle des eaux par filtration sur membranes :

- Filtrer stérilement sur membrane, un volume déterminé de l'échantillon à tester.
- A la surface des boîtes préparées ou du milieu pré-coulé (BM148), non séchées, déposer la membrane en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à (36 ± 2) °C pendant (44 ± 4) heures.

✓ **Ensemencement :**
Filtration sur membrane

✓ **Incubation :**

7 LECTURE

Dénombrer les colonies caractéristiques.

Les staphylocoques pathogènes (dont *Staphylococcus aureus*) forment des colonies luxuriantes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol.

Les staphylocoques non pathogènes forment en général de petites colonies rouges qui ne modifient pas la teinte du milieu.

Quelques souches de *Staphylococcus epidermidis* sont capables de fermenter le mannitol.

Après 24 heures à 48 heures d'incubation, quelques souches d'entérocoques, de *Bacillus*, de *Micrococcus* et de *Serratia* peuvent cultiver.

Microorganismes		Croissance Rapport de productivité PR	Caractéristiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	00032	PR ³ 50 %	Colonies jaunes
<i>Staphylococcus aureus</i>	00034	PR ³ 50 %	Colonies jaunes
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	00036	Bonne,	Colonies roses
<i>Escherichia coli</i>	00013	Inhibée,	-

8 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

Milieu pré-coulé : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8 °C.

lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 37 °C (ensemencement en surface).

Staphylococcus aureus



jaune sur fond jaune entourée d'un halo jaune

Staphylococcus epidermidis



blanche sur fond rouge

MUELLER HINTON

La gélose Mueller Hinton II (selon EUCAST) est un milieu conçu pour tester la sensibilité aux médicaments selon les procédures EUCAST par la méthode de diffusion sur gélose et les mécanismes de résistance de bactéries aérobies non antibiotiques isolées à partir d'échantillons cliniques humains.

Le milieu est destiné à soutenir le processus de diagnostic en déterminant le profil de sensibilité / résistance aux antimicrobiens des bactéries isolées à partir d'échantillons cliniques prélevés sur des patients.

Les informations sur le profil de sensibilité aux médicaments antimicrobiens utilisés dans le traitement des infections et la détermination du mécanisme de résistance de l'agent pathogène détecté dans un échantillon clinique permettent de prendre la bonne décision individuelle pour le patient concernant le choix d'une antibiothérapie appropriée et efficace. La méthode de diffusion sur disque selon EUCAST est basée sur la méthode décrite par l'International Collaborative Study of Antimicrobial Sensceptibility Testing en 1972. En raison de sa simplicité d'exécution, cette méthode est la méthode la plus largement utilisée pour tester la sensibilité bactérienne aux médicaments dans les laboratoires médicaux. L'exécution correcte et normalisée du test selon la méthode EUCAST et l'obtention de résultats fiables nécessitent l'utilisation de cette méthode sans modification, y compris l'utilisation du milieu spécifié par EUCAST.

2 Principe de procédure

L'extrait de bœuf et l'hydrolysate acide de caséine sont des sources d'azote, de vitamines, de carbone et d'acides aminés. L'amidon de maïs absorbe les déchets métaboliques toxiques. La gélose agit comme un agent solidifiant.

Les tests de sensibilité aux micro-organismes aux médicaments doivent être effectués par la méthode de diffusion sur disque conformément aux recommandations actuelles de l'EUCAST.

La méthode de diffusion sur disque utilise le phénomène du gradient de concentration qui se forme dans un milieu solide lorsqu'un médicament antimicrobien se diffuse à partir d'un disque de papier buvard et inhibe la croissance des micro-organismes inoculés sur le milieu autour du périmètre du disque. Le diamètre de la zone de croissance inhibée est mesuré en millimètres, puis comparé à la valeur limite correspondante spécifiée dans les recommandations EUCAST pertinentes. Cette comparaison permet de classer le micro-organisme testé dans une catégorie appropriée de sensibilité aux médicaments antimicrobiens spécifiques utilisés dans le test. Afin de reconnaître divers mécanismes de résistance, plusieurs disques de buvard contenant des antibiotiques/médicaments antimicrobiens spécifiques sont disposés sur le milieu. Les formes et tailles caractéristiques des zones résultantes de croissance bactérienne inhibée permettent de déterminer la présence et le type de mécanisme de résistance de l'agent pathogène testé.

3. Composition du milieu

En g/l d'eau distillée:	
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Extrait de bœuf	2,0 g
Gélose	17,0 g

pH 7,3± 0,1 à 25°C.

Aspect du milieu : Milieu homogène, de couleur paille clair

4. Préparation du milieu

Le milieu est prêt à l'emploi. Porter le milieu à température ambiante immédiatement avant utilisation

5. Equipement requis, non fourni

Équipement et réactifs nécessaires au test (par exemple solution saline, écouvillons stériles, disques de buvard imbibés d'antibiotiques) et équipement de laboratoire de microbiologie standard, y compris un densitomètre bactériologique ou un étalon de densité, un incubateur et une règle ou un autre appareil pour mesurer les zones de croissance inhibée.

6. Précautions

- Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement.
- Produit non automatisé.
- Le milieu contient des composants d'origine animale, qui peuvent être contaminés par des agents pathogènes biologiques, et doit donc être manipulé conformément aux principes de manipulation des matières biologiques potentiellement infectieuses.
 - Ne pas utiliser le milieu si celui-ci présente des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou d'autres signes de détérioration.
 - Ne pas utiliser les boîtes endommagées.
 - Ne pas utiliser les boîtes après la date d'expiration.
 - La ré incubation de boîtes précédemment inoculées n'est pas autorisée.
 - Pour garantir des résultats de test corrects, suivez ces instructions.
 - Si la manipulation du milieu diffère de celle décrite dans cette présente notice, le laboratoire est tenu de valider la procédure adoptée.

7. Stockage

Conservez les boîtes entre 2 et 12 °C jusqu'à la date de péremption. Entreposer les boîtes de substrat dans leur emballage d'origine, en position inversée (côté gélose vers le haut), à l'abri des sources de lumière directe. Pour éviter le gel, ne stocker pas les boîtes près des murs du réfrigérateur. Pour éviter la condensation de l'eau sur le couvercle de la boîte, n'ouvrez pas le réfrigérateur plus que nécessaire et ne conservez pas les boîtes dans un réfrigérateur trop rempli.

8. Date d'expiration

Le milieu stocké à 2-12°C conserve ses propriétés jusqu'à 3 mois à compter de la date de production.

9. Types d'échantillons

Le matériel utilisé pour les tests est constitué de cultures pures, datant d'environ 16 à 24 heures, de souches bactériennes pathogènes isolées sur des milieux solides à partir de divers échantillons cliniques humains.

10. Procédure du test

Les procédures et directives EUCAST actuelles doivent être strictement respectées afin de garantir des résultats corrects et fiables des tests de sensibilité par diffusion sur disque.

1. Laisser le milieu revenir à température ambiante avant l'inoculation.
- 2 **Préparation d'inoculum.** Préparer une suspension de la souche testée à une densité de 0,5 sur l'échelle de McFarland en suspendant les colonies dans une solution saline. Prélever les colonies à l'aide d'une anse stérile ou d'un écouvillon sur un milieu non sélectif, après 18 à 24 heures de culture. Sélectionner quelques colonies morphologiquement similaires. Déterminer la densité de l'inoculum à l'aide d'un densitomètre bactériologique. La densité de la suspension peut également être déterminée en comparant macroscopiquement la densité de la suspension de la souche testée avec un étalon de densité McFarland de 0,5. Dans ce cas, la turbidité de la suspension de la souche testée par rapport à l'étalon de densité doit être comparée sur un fond blanc avec des bandes noires.

3 **Préparation de la pelouse bactérienne.** Plongez un coton-tige stérile dans la suspension préparée de la souche à tester. Pour les bactéries à Gram négatif, afin d'éviter une inoculation excessive, retirez l'excès de suspension de l'écouvillon en le pressant contre l'intérieur du tube. Pour les bactéries à Gram positif, il n'est pas nécessaire d'éliminer l'excédent. Les milieux peuvent être inoculés manuellement ou avec un inoculateur automatique. Répartir la suspension uniformément sur toute la surface de la gélose, en vous assurant qu'il n'y ait pas d'espaces entre chaque bande, ce qui est particulièrement important pour les bactéries à Gram positif.

4 **Appliquer les disques antibiotiques.** Appliquer des antibiotiques sur la surface de la gélose. Les disques doivent être appliqués sur le milieu dans les 15 minutes suivant l'inoculation. Appuyez légèrement sur les disques, qui doivent adhérer complètement à la surface de la gélose. Une fois appliqués, les disques ne doivent pas être déplacés, en raison de la diffusion rapide de l'antibiotique du disque dans le milieu. Le nombre de disques sur la boîte doit être limité, de sorte que les zones d'inhibition résultantes ne se chevauchent pas et que les antibiotiques individuels n'interagissent pas les uns avec les autres. Un maximum de 6 disques antibiotiques peut être appliqué sur une boîte de 90 mm de diamètre.

5 **Incubation.** Incuber les boîtes dans des conditions aérobies à température et pendant la durée spécifiée dans les procédures EUCAST en fonction du micro-organisme à tester. Les boîtes doivent être placées sur gélose côté vers le bas, afin d'éviter que des antibiotiques ne tombent de la surface de la gélose. L'incubation des boîtes doit commencer dans les 15 minutes suivant l'application des disques. Les boîtes ne doivent pas être incubées plus longtemps que recommandé.

11. Lecture et interprétation

Après incubation :

- Mesurer le diamètre des zones d'inhibition de croissance conformément aux procédures EUCAST actuelles à l'aide d'une règle ou d'un autre appareil de mesure. La mesure doit être exprimée en millimètres.
- Interpréter les mesures obtenues sur la base des procédures EUCAST en vigueur, en attribuant la catégorie de sensibilité appropriée à chaque médicament utilisé.

Lors de l'analyse des mécanismes de résistance d'un agent pathogène, la taille et la forme caractéristique des zones de croissance bactérienne inhibée doivent également être évaluées.

12. Contrôle qualité

Effectuer un contrôle de la qualité moyenne à une fréquence et d'une manière compatible avec les procédures EUCAST en vigueur pour le contrôle de la qualité de la méthode de diffusion du disque et des procédures de laboratoire.

Des souches de référence qui garantissent la cohérence des mesures conformément aux procédures EUCAST doivent être utilisées pour effectuer des tests de contrôle de la qualité.

SABOURAUD DEXTROSE + CHLORAMPHÉNICOL

1. Utilisation prévue

Détection et isolement d'espèces fongiques pathogènes dans des échantillons cliniques humains et d'autres échantillons.

La gélose Sabouraud Dextrose + Chloramphenicol/Champignon est un milieu sélectif conçu pour la détection qualitative et l'isolement des champignons pathogènes.

Le milieu est recommandé pour la culture d'échantillons contenant une flore bactérienne riche, tels que les expectorations et les prélèvements cutanés.

ANNEXES : LISTE DES MILIEUX DE CULTURE BACTERIOLOGIQUES

La fonction de la gélose Sabouraud Dextrose + Chloramphénicol/ Champignon est d'aider au diagnostic des patients présentant des symptômes indiquant une infection fongique potentielle.

2. Principe de procédure

Gélose Sabouraud Dextrose + Chloramphénicol

L'hydrolysate de caséine et du tissu animal fournit les nutriments nécessaires à la croissance. Le dextrose à des concentrations élevées est une source de carbone et d'énergie et a un effet positif sur la croissance des champignons. Des niveaux élevés de glucose inhibent la croissance de la plupart des bactéries. Le faible pH de 5,6 du milieu favorise la croissance fongique, tout en inhibant la croissance des bactéries présentes dans l'échantillon testé.

Le chloramphénicol est un agent sélectif qui réduit considérablement la croissance de la plupart des bactéries à Gram positif et à Gram négatif présentes dans l'échantillon testé.

Gélose pour la détection d'infections fongiques

L'hydrolysate du tourteau de soja fournit les nutriments nécessaires à la croissance. Le dextrose est une source de carbone et d'énergie. Le chloramphénicol, en tant qu'antibiotique à large spectre, inhibe la croissance de nombreuses bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Le cycloheximide est utilisé dans les milieux pour l'isolement de champignons pathogènes. Il inhibe la croissance de champignons non pathogènes tels que les moisissures saprophytes et les levures. Il est particulièrement utile dans l'isolement des dermatophytes. Le rouge de phénol est un indicateur de pH.

3. Composition du milieu

En g/l d'eau distillée:

<u>Gélose Sabouraud Dextrose + Chloramphénicol</u>		<u>Gélose pour la détection des infections fongiques</u>	
Hydrolysate de caséine	5,0 g	Hydrolysate du tourteau de soja	10,0 g
Hydrolysate de tissu animal	5,0 g	Dextrose	10,0 g
Dextrose	40,0 g	Cycloheximide	0,4 g
Chloramphénicol	0,05 g	Chloramphénicol	0,05 g
Agar	15,0 g	Agar	15,5 g
pH 5,6± 0,2 à 25°C.		Rouge de phénol	0,05 g
Aspect du milieu : Clair, paille		pH 6,9± 0,2 à 25°C.	
		Apparence du milieu : Clair, orange.	

4. Préparation du milieu

Le milieu est prêt à l'emploi. Amener le milieu à température ambiante immédiatement avant utilisation.

5. Equipement requis, non fourni

Équipement de laboratoire microbiologique standard nécessaire pour les tests, y compris un incubateur.

6. Précautions

- Le produit est destiné à un usage professionnel uniquement.

- Produit non automatisé.
- Le milieu contient des composants d'origine animale, qui peuvent être associés à la présence d'agents pathogènes biologiques, doit donc être manipulé conformément aux principes de manipulation de matériel biologique potentiellement infectieux.
- Ne pas utiliser de plaques si le milieu présente des signes de contamination microbienne, de décoloration, de dessèchement, de fissuration ou d'autres signes de détérioration.
- Ne pas utiliser de boîtes endommagées.
- Ne pas utiliser de boîtes après la date d'expiration.
- La réincubation des boîtes préalablement inoculées n'est pas autorisée.
- Pour garantir des résultats de test corrects, suivez ces instructions.
- Si la manipulation du milieu diffère de celle décrite dans le présent manuel, le laboratoire est tenu de valider la procédure adoptée.

7. Stockage

Conservez les boîtes entre 2 et 12 °C jusqu'à la date de péremption. Conserver les boîtes dans leur emballage d'origine, en position inversée (côté gélose vers le haut), à l'abri des sources de lumière directes. Pour éviter la congélation de la gélose, ne pas conserver les boîtes près des parois du réfrigérateur. Pour éviter l'apparition de condensation d'eau sur le couvercle de la boîte, ne pas ouvrir le réfrigérateur plus souvent que nécessaire et ne pas stocker les boîtes dans un réfrigérateur trop rempli.

8. Péremption

Le milieu conservé à une température comprise entre 2 et 12°C conserve ses propriétés jusqu'à 3 mois à compter de la date de production.

9. Type d'échantillons

Échantillons cliniques d'origine humaine et autres échantillons.

Les échantillons à analyser pour détecter la présence de dermatophytes sont des échantillons de cheveux, d'ongles et de peau, qui doivent être recueillis dans des boîtes de Pétri stériles. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant 72 heures maximum.

Les autres types d'échantillons cliniques destinés à la recherche d'autres champignons pathogènes doivent être collectés dans des récipients stériles et scellés, conformément aux directives relatives aux échantillons. Livrer les échantillons collectés au laboratoire dès que possible, de préférence dans les deux heures suivant la collecte. Si cela n'est pas possible, conserver les échantillons à 4°C pendant 24 heures au maximum jusqu'à leur livraison au laboratoire.

10. Procédure du test

1. Laisser le milieu revenir à température ambiante avant l'inoculation.
2. Inoculer l'échantillon en l'étalant directement sur la surface de la gélose.
3. Si l'échantillon est recueilli sur un écouvillon, faire tourner doucement l'extrémité de l'écouvillon sur une petite zone de gélose juste autour des bords de la boîte, puis inoculer l'échantillon en utilisant la méthode des stries à l'aide d'une anse stérile.
4. Incuber les boîtes inoculées à 25-30°C.
5. Examiner le résultat de la croissance après 48-168 heures d'incubation.

11. Lecture et interprétation

Après incubation, observer :

- La présence de colonies fongiques,
- La morphologie des colonies.

Morphologie typique des colonies bactériennes cultivées sur gélose Sabouraud Dextrose + milieu chloramphénicol

ANNEXES : LISTE DES MILIEUX DE CULTURE BACTERIOLOGIQUES

Micro-organisme	Morphologie typique de la colonie
<i>Candida</i>	Colonies régulières, grandes, convexes, lisses, rondes, crème
<i>Saccharomyces</i>	Colonies régulières, grandes, convexes, lisses, rondes, crème
<i>Trichophyton</i>	Colonies blanches à crème
<i>Microsporum</i>	Colonies plates blanches à crème avec une surface ressemblant à une faucille, avec une surface inférieure blanche à brune
<i>Aspergillus</i>	Mycélium blanc avec spores noires



Candida albicans spp.

ANNEXES : LISTE DES MILIEUX DE CULTURE BACTERIOLOGIQUES

Morphologie et schéma de croissance des colonies sur gélose Sabouraud Dextrose avec chloramphénicol.

Morphologie typique des colonies cultivées sur gélose Fungisel :

Micro-organisme	Morphologie typique de la colonie
<i>Candida</i>	Colonies régulières, grandes, convexes, lisses, rondes, crème à jaune clair
<i>Trichophyton</i>	Colonies blanches à crème, changement de couleur moyen de rose à rouge
<i>Aspergillus</i>	Pas de croissance
<i>Escherichia coli</i>	Pas de croissance
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de croissance

Gélose Sabouraud Dextrose + Chloramphénicol

Souche de référence :	Intensité de la croissance :	Morphologie des colonies :
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Bonne croissance	Crémeux, circulaire, lisse, convexe
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Pas de croissance	—

Gélose fongigène

Souche de référence :	Intensité de la croissance :	Morphologie des colonies :
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Bonne croissance	régulier, grand, convexe, lisse, circulaire, crémeux à jaune clair
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Bonne croissance	Mycélium blanc, changement de couleur moyen du rose au rouge
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Pas de croissance	-

D'autres souches de référence peuvent être utilisées conformément aux procédures et instructions du laboratoire. Les procédures de contrôle de la qualité doivent répondre aux exigences de la réglementation applicable et des lignes directrices/recommandations.

12. Limites de la méthode

- En raison de la variabilité des besoins nutritionnels, certaines souches peuvent mal se développer ou pas du tout sur la gélose Sabouraud Dextrose + gélose chloramphénicol / champignons.
- La gélose Sabouraud Dextrose + Chloramphénicol fournit une bonne croissance fongique, mais peut ne pas donner des résultats suffisants dans le développement des champignons.
- Le chloramphénicol, lorsqu'il est utilisé pour inhiber la croissance bactérienne, peut avoir un effet inhibiteur contre certains champignons.

pathogènes, tels que les champignons opportunistes qui causent des infections de type dermatophytose mais sont sensibles au chloramphénicol.

- Les échantillons à tester doivent être prélevés avant de commencer l'antibiothérapie.
- Ne pas utiliser le milieu pour les échantillons de sang.