

## NOUVELLES CONTRIBUTIONS A L'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE LA PROPOLIS

Adelina DEREVICI, A. POPESCO, N. POPESCO

*Laboratoire central du Contrôle des Aliments,  
Cimpul Mosilor 5, Bucarest (Roumanie)*

---

### SOMMAIRE

L'étude des propriétés biologiques de la propolis a été faite à partir de l'extrait alcoolique pour lequel on a calculé le pourcentage du poids de résidu sec et déterminé l'action inhibitrice sur la culture de *Pasteurella avis*, exprimée en milligrammes de résidu sec par millilitre du milieu.

Sur les souris et les cobayes, nous avons établi une tolérance de 1,12 g de résidu sec par kg de poids vif. Sur les cobayes, on constate une action favorable sur l'évolution des brûlures.

La propolis se répand dans tout l'organisme, on la trouve sous forme granulaire dans certains organes des souris ou dans les hémocytes des abeilles.

---

### INTRODUCTION

La propolis, produit apicole complexe, contient des résines, des baumes, des huiles essentielles, de la cire et du pollen.

La fraction active de la propolis séparée par VILLANUEVA et *al.* (1963) est la galangine (3, 5, 7 trihydroxyflavone) ; elle fait partie du groupe des flavonoïdes présents dans de nombreux végétaux sous forme de glucosides et non à l'état libre.

Dans ce travail, nous présentons les résultats de nos recherches sur l'action d'un extrait alcoolique de propolis sur la souris, le cobaye et les abeilles.

Nous avons étudié :

— Sur la souris : la tolérance et les aspects histo-pathologiques de certains organes ;

— sur le cobaye : la tolérance et l'effet sur l'évolution de certaines brûlures expérimentales traitées à l'extrait alcoolique et à l'onguent de propolis ;

— sur les abeilles : 1° la tolérance et l'action sur l'infection produite en les alimentant avec du pollen infesté d'*Aspergillus niger* et de *Mucor mucedo* ; 2° l'effet sur la formule de l'hémolymphe.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Les expériences ont été faites avec un extrait alcoolique de propolis, préparé en faisant macérer pendant 4 à 5 jours, à l'abri de la lumière, des petits fragments de propolis dans de l'alcool éthylique à 85°.

1° On détermine la quantité de résidu sec pour 100 ml, puis on évalue le pouvoir antibiotique par rapport au résidu sec contenu dans la dilution limite, qui détermine l'inhibition totale de la culture de *Pasteurella avis* en bouillon ou gélose.

Dans des boîtes de Petri sur gélose ensemencées avec 5 gouttes de culture de bouillon de 24 heures on dispose des rondelles de papier-filtre humectées d'une émulsion aqueuse de propolis, en concentration 1/10, 1/15, 1/17, 1/20 en utilisant comme témoin de l'alcool à 85°, en dilution à 1/10.

2° La tolérance des souris à l'égard de la propolis a été étudiée sur des lots de 6 souris de 20 g. qui ont reçu une émulsion aqueuse contenant différentes quantités d'extrait alcoolique ; on a préparé des dilutions à 1/10, 1/20, 1/40, 7/100, 15/100 qui ont été administrées par 0,5 ml, soit par injections sous-cutanées, soit en les introduisant dans l'estomac à l'aide d'une petite sonde. Les témoins ont reçu des solutions alcooliques correspondant à celles de l'émulsion de propolis.

À d'autres lots de 6 souris, on a administré par les mêmes voies, de l'émulsion de propolis à 30 p. 100, 40 p. 100 et 60 p. 100, préparée avec un extrait concentré par évaporation de l'alcool et contenant 14 g de résidu sec p. 100.

L'examen histopathologique a été exécuté sur des coupes d'organes de souris provenant de différents lots, ayant reçu de la propolis *per os* ou par voie sous-cutanée ou seulement une quantité d'alcool correspondant à celle de l'extrait alcoolique. On a utilisé l'inclusion dans de la paraffine et la coloration à l'hématoxyline éosine et au van Gieson.

3° La tolérance des cobayes à l'égard de la propolis a été étudiée sur des lots de 6 cobayes et 4 témoins auxquels on a administré de l'alcool dilué.

On a administré à la sonde une émulsion aqueuse préparée avec de l'extrait alcoolique de propolis.

L'action de l'extrait alcoolique et de l'onguent de propolis sur la cicatrisation des brûlures a été étudiée sur des cobayes de 250 grammes, chez lesquels on a provoqué des brûlures à l'aide d'une rondelle métallique (ayant un diamètre de 2,5 cm) sur chaque flanc, sur une zone préalablement épilée.

La plaie du flanc droit a été traitée, à chaque séance, d'abord à l'extrait alcoolique, puis à l'onguent de propolis 15 p. 100, tandis que la plaie témoin du flanc gauche a été badigeonnée à l'alcool ou avec un simple onguent.

Le traitement a été répété 5 jours de suite.

4° La tolérance des abeilles à l'égard de la propolis et l'action de cette dernière sur l'infection provoquée en administrant du pollen infesté de moisissures *Aspergillus niger* et *Mucor mucedo*, a été étudiée par nous sur des abeilles d'été, après la grande miellée, en août 1962.

Dans le but d'étudier d'autres aspects de l'organisme des abeilles d'été, nous avons étudié l'hémolymphe sur divers groupes d'abeilles.

Pour le prélèvement de l'hémolymphe, on a employé une pipette capillaire introduite dans la région thoracique, dans le vaisseau dorsal, éliminant ainsi le risque de contamination avec des cellules d'autres tissus.

Les frottis sont fixés à l'alcool méthylique, colorés 3 minutes au May-Grünwald, dilués dans l'eau distillée et 30 minutes au Giemsa. On a compté sur un frottis 500 éléments. Le prélèvement d'hémolymphe a été effectué le 3<sup>e</sup> et le 16<sup>e</sup> jour de l'expérience.

Pour établir la formule de l'hémolymphe, on a utilisé la classification indiquée par ROOSEBOOM (1937) : proleucocytes, macronucléocytes, cellules fusiformes, formes intermédiaires, cellules granulaires.

Afin de pouvoir exclure l'intervention des facteurs « âge » et « fatigue » des abeilles avec lesquelles on a travaillé en août 1963, on a répété ces expériences en avril 1964 avec des abeilles de la nouvelle génération, qui n'étaient pas fatiguées par la grande miellée d'été.

On a constitué des lots alimentés comme suit : un lot au miel simple, un second au miel + propolis et un troisième lot au miel + propolis + pollen infesté de moisissures.

RÉSULTATS

1° L'extrait préparé par nous contient 7 g de résidu sec pour 100 millilitres. Après 24 heures, à 37°, on constate une inhibition totale des cultures, sous l'action de la propolis en dilution à 1/10 et 1/15, une inhibition partielle pour la dilution à 1/17, très réduite pour la dilution à 1/20 et nulle pour le témoin alcool.

2° Dans les expériences sur les souris, on constate qu'il n'y a pas de mortalité (tabl. 1). On a établi une tolérance de 1,12 g/kilo. Les souris du lot qui a reçu *per os*

TABLEAU 1

*La tolérance des souris à l'égard de l'émulsion de propolis*

Nombre souris	Dilution propolis	Témoin alcool (%)	Voie d'inoculation à 0,5 ml.	Évolution après 7 jours
6	1/10		sous-cutanée	tous vivants
6	1/10		—	— —
6	1/40		—	— —
6	7/100	7	—	— —
6	15/100	15	—	— —
6	1/10		<i>per os</i>	— —
6	1/20		—	— —
6	1/40		—	— —
6	7/100	7	—	— —
6	15/100	15	—	— —

TABLEAU 2

*La tolérance des souris à l'égard de l'émulsion de propolis concentrée*

Nombre souris	Dilution propolis (%)	Témoin alcool (%)	Voie d'inoculation	num. = souris mortes dén. = souris en expér.
6	30		sous-cutanée	0/6
6	30		<i>per os</i>	0/6
6	40		sous-cutanée	6/6
6	40		<i>per os</i>	4/6
6		40	sous-cutanée	4/6
6		40	<i>per os</i>	5/6
6	60		sous-cutanée	2/6
6	60		<i>per os</i>	1/6
6		60	sous-cutanée	6/6
6		60	<i>per os</i>	6/6

0,5 ml. de dilution à 30 p. 100 (1,12 g/kg) survivent. Dans le lot de souris auxquelles on a administré par les mêmes moyens 0,5 ml de dilution à 40 p. 100 (1,40 g/kg) 4/6 des souris meurent ainsi que 5/6 des témoins ; on constate une mortalité de 6/6 tant chez les animaux qui ont reçu des injections sous cutanées que chez les témoins.

Dans le lot qui a reçu *per os* une concentration de 60 p. 100 (2,10 g/kilo) 1/6 des souris meurent et 6/6 des témoins ; parmi les animaux qui ont reçu des injections sous-cutanées 2/6 meurent, ainsi que 6/6 des témoins recevant l'alcool pur (tabl. 2). Ces chiffres représentent la moyenne d'expériences effectuées en double.

À l'examen microscopique du foie, on constate une dégénérescence grasseuse et un certain degré d'hyperémie (fig. 1). Dans les coupes provenant d'animaux ayant reçu de la propolis on remarque aussi la présence de granules noirs dans les cellules du parenchyme hépatique, surtout à proximité des grands vaisseaux, ainsi que dans les cellules macrophages à l'intérieur de certains vaisseaux (fig. 2).

Les reins ne révèlent pas de processus de dégénérescence ; on y remarque une infiltration glomérulaire que nous trouvons également chez les témoins, qui présentent en outre de l'hyperémie (fig. 3). Dans la rate, la pulpe blanche apparaît hyperplasiée dans certaines sections. On signale une action mégacariocytaire (fig. 4). Dans le parenchyme, on constate dans de rares cellules la présence de certains granules fins, opaques, noirs. Sur les coupes colorées à l'hématoxyline éosine, elles ont le même aspect que les dépôts du foie. Dans le poumon, nous trouvons en dehors de l'hyperémie, un épaississement de la paroi alvéolaire (fig. 5), par rapport au témoin. Les coupes d'estomac ne présentent pas de lésions (fig. 6).

De ces constatations, il résulte que la propolis se répand dans l'organisme entier, à partir du point d'introduction ; les autres aspects histopathologiques ne diffèrent pas beaucoup de ceux des témoins.

3° Chez les cobayes, les brûlures effectuées présentent sous l'influence de la propolis une épithélisation plus accélérée ; comparativement au témoin la cicatrisation était complète le 15<sup>e</sup> jour, la peau ayant un aspect presque normal ; par contre, la plaie témoin était incomplètement fermée, présentant un aspect irrégulier et bourgeonnant.

4° Chez les abeilles, les résultats ont précisé qu'une émulsion de propolis à une concentration de 20 p. 100 dans du miel provoque des phénomènes d'intoxication et la mort des abeilles en 5-6 jours ; en l'ajoutant à un mélange miel-pollen, elle n'a pas empêché l'apparition de mycoses.

Les mycoses apparaissent dans le lot qui reçoit du miel + pollen ou du miel + pollen + propolis (1).

Les abeilles présentaient, en dehors des manifestations cliniques, des modifications histopathologiques caractéristiques (2), le développement des hyphes (fig. 7) et des sporanges. On a constaté une certaine inhibition de la vitalité des spores car malgré leur présence abondante dans le contenu intestinal, on n'a pas pu les cultiver sur milieu Ceapek dans le lot qui a reçu miel + pollen + propolis.

On constate une résistance plus forte chez les abeilles de printemps que chez

(1) L'examen mycologique a été fait par le Dr RIPEANU, à la section de Mycologie du Laboratoire central du Contrôle des Aliments, Bucarest.

(2) Les sections histologiques ont été exécutées par M<sup>me</sup> A. SUCIU, assistante à la Faculté de Biologie, Bucarest.

les abeilles d'été : chez les premières, les manifestations cliniques surviennent au bout de quelques semaines seulement.

De ces constatations, il résulte que l'âge, l'état physiologique et la saison exercent une influence sur les réactions des abeilles.

Le tableau 3 synthétise les résultats des frottis effectués le 3<sup>e</sup> et le 16<sup>e</sup> jour des expériences de printemps, en ce qui concerne la formule de l'hémolymphe.

TABLEAU 3

*Hémolymphe de divers lots d'abeilles*

Types d'hémocytes	Miel		Miel + propolis		Miel + propolis + pollen	
	3 <sup>e</sup> jour	16 <sup>e</sup> jour	3 <sup>e</sup> jour	16 <sup>e</sup> jour	3 <sup>e</sup> jour	16 <sup>e</sup> jour
Proleucocytes . . . . .	60,0	1,0	62,4	2,0	27,4	
Macronucléocytes . . . . .	23,4	72,0	20,6	67,0	54,4	
Formes intermédiaires . . . . .	7,0	4,0	10,0	3,0	2,0	
Formes fusiformes . . . . .	7,6	23,0	3,0	25,0	13,2	
Formes granulaires . . . . .	2,0	—	2,0	—	1,0	
Formes avec propolis . . . . .	—	—	2,0	3,0	2,0	

Le lot d'abeilles qui reçoit du miel + propolis présente une hémolymphe similaire à celle du témoin, on observe seulement la présence de granules de propolis.

La formule de l'hémolymphe chez les abeilles qui reçoivent du miel + propolis + pollen infesté de moisissures est différente. Le rapport proleucocyte/macronucléocyte est inversé ; des cellules contenant des granules de propolis sont présentes.

L'examen des prélèvements après 16 jours d'expérience, précise de même une inversion du rapport proleucocyte/macronucléocyte chez les deux premiers lots d'abeilles : le nombre des macronucléocytes atteint 72 p. 100 pour le lot qui reçoit du miel et 67 p. 100 pour le lot qui reçoit aussi de la propolis. Les proleucocytes ont presque disparu et le pourcentage des fusiformes a augmenté. Dans les deux lots, cet aspect caractérisé par la présence d'un nombre élevé de macronucléocytes et de cellules fusiformes, constaté dès le 3<sup>e</sup> jour dans l'hémolymphe des abeilles soumises à l'infection des moisissures, apparaît plus tardivement.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Nos recherches sur la tolérance des souris, des cobayes et des abeilles à l'extrait alcoolique de propolis s'appuient sur l'étude de la mortalité et des aspects histopathologiques des organes chez les souris.

Chez les souris et les cobayes on a constaté une tolérance de 1,12 g de résidu sec par kilo.

Sur la souris, nous avons démontré que les doses dépassant la limite de tolérance entraînent une certaine mortalité qui n'est pas directement proportionnelle à la concentration en résidu sec de la dose administrée. Ce fait peut avoir une re-

lation avec l'intervention dans les phénomènes d'oxydo-réduction signalée par SWAIN (1962), pour les flavonoïdes, groupe auquel s'intègre la fraction active de la propolis, la galangine.

Des recherches de BAIXAS (1962), il ressort que les flavonoïdes sont actifs grâce à leurs propriétés chélatrices, leur molécule possédant des fonctions orthodiphénoliques, capables de fixer des cations bivalents du milieu ; il en résulte des dérivés très solubles, non toxiques. MASQUELIER (1961) signale aussi des propriétés communes à la vitamine P.

Le composant complexe des flavonoïdes détermine d'après l'opinion de RAVINA (1961) de multiples réactions dans l'organisme, fait qui semble ressortir aussi de nos expériences.

Ainsi, nous avons constaté que la propolis a une action favorable sur les brûlures provoquées sur cobayes : l'accélération de la guérison, aspect normal de la peau.

Cet effet peut avoir un rapport avec certaines propriétés conjonctivo-trophiques des flavonoïdes, signalées par BABIN *et al.* (1961), BAIXAS (1962).

LÉGER *et al.* (1960) expliquent l'action protectrice et régénératrice des flavonoïdes sur le tissu conjonctif par son enrichissement en collagène jeune et en fibres élastiques ; cette action interviendrait aussi dans le cas des brûlures.

De nos expériences sur la souris, il ressort qu'à la suite de l'administration par voie intragastrique ou par voie sous-cutanée, la propolis diffuse dans l'organisme entier ; dans une étape initiale, on la trouve sous forme de granules dans certains organes des souris ou dans les hémocytes des abeilles.

La présence des granules de propolis dans les hémocytes, illustre un moyen de propagation dans l'organisme de ce produit qui peut être utilisé ultérieurement dans des composants complexes.

Les abeilles auxquelles on administre de la propolis présentent après 3 jours une formule de l'hémolymphe analogue à celle des témoins ; le 16<sup>e</sup> jour, on constate la prédominance des macronucléocytes et des cellules fusiformes.

Des aspects semblables avaient été signalés dans les prélèvements effectués le 3<sup>e</sup> jour chez les abeilles soumises également à une infection par mycose. Il semblerait que ces modifications représentent une réponse commune à différents agents infectieux ou bien elles seraient déterminées par les nouvelles conditions de vie en captivité prolongée.

La tolérance envers l'extrait de propolis additionné de miel dans la proportion de 20 p. 100, plus grande chez les abeilles de printemps que chez les abeilles d'été, plus âgées et fatiguées par la grande miellée, démontre l'importance de l'état physiologique sur les réactions de l'organisme.

## CONCLUSIONS

1<sup>o</sup> A partir de l'extrait alcoolique de propolis, on a déterminé :

a) le pourcentage de résidu sec (7 g dans l'extrait utilisé) ;

b) le pouvoir antibiotique en établissant la dilution limite et la quantité de résidu sec par ml nécessaires à l'inhibition totale de la culture en bouillon de *Pas-*

*teurella avis*. La dilution limite a été de 1/15 et le poids du résidu sec établi par nous a été de 0,460 mg/ml.

2° Les expériences sur la souris et les cobayes ont établi une tolérance de 1,12 g résidu sec par kg de poids vif ; la propolis administrée *per os* est plus active.

3° L'extrait alcoolique et l'onguent de propolis ont accéléré la cicatrisation des brûlures expérimentales des cobayes.

4° La tolérance à l'égard de la propolis diluée à 20 p. 100 dans du miel est plus grande chez les abeilles de printemps (les jeunes abeilles non encore fatiguées par la grande miellée prédominant) que chez les abeilles d'été (vieilles abeilles, fatiguées par la grande miellée).

*Reçu pour publication en novembre 1965.*

## SUMMARY

### NEW CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF PROPOLIS

A study of the biological properties of propolis has been conducted on the basis of the alcoholic extract, for which the percentage of the weight of the dry residue has been calculated and the inhibitive effect on the culture of *Pasteurella avis* determined, which is expressed in mg of dry residue per ml of medium.

The investigation concerned the tolerance of mice and guinea-pigs (1.12 g per kg live weight). At the same time, a 20 per cent emulsion of propolis was administered in honey to the bees. The summer bees died after 5-6 days, but the spring bees resisted for 20-21 days. This indicates the importance of age, physiological condition, etc.

Propolis diffuses in the organism from the point of introduction ; granular deposits were found in certain mouse organs (liver, spleen, stomach) and in the macronucleocytes of the bees. For the selections made on the 3rd and 16th day of the experiment, the appearance of the controls, except for the presence of granules of propolis in the macronucleocytes. Later modifications supervene in the two groups in the same way, determining a percentage of hæmocytcs similar to that found in the bees infected by moulds.

Propolis accelerates epithelial growth over experimental burns on guineapigs and returns the skin to its normal appearance. This protective and regenerative effect on the conjunctival tissue belongs to the whole group of flavonoids, of which galangine, the active constituent of propolis, is a member.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BABIN R., BEAUVIEUX J., BIRABEN J., COUSTOU F., DELMON J., LÉGER H., 1961. Action des complexes magnésiens flavoniques. *Thérapie*, **16**, 70-77.
- BAIXAS F., 1962. Comment traiter certaines tumeurs fréquentes en gastro-entérologie. *Gaz. Méd. Fr.*, **8**, 9-14.
- LÉGER H., BABIN R., BEAUVIEUX J., COUSTOU F., 1960. L'action de certains dérivés flavoniques et de leurs chélates sur l'armature élastique des artères. *Thérapie*, **15**, 1085-1095.
- MASQUELIER M. J., 1961. Acquisitions récentes sur le facteur vitaminique P. *J. Méd. Bordeaux*, **138**, 213-218.
- RAVINA A., 1961. Rapports hôte-tumeur et médication de terrain en cancérologie. *Presse Méd.*, **69**, 421-424.
- ROOSEBOOM M., 1937. *Contribution à l'étude de la cytologie du sang de certains insectes*. Thèse doctorat, Leyden.
- SWAIN T., 1962. *The chemistry of flavonoid compounds*. Pergamon Press, London, 531-538.
- VILLANUEVA V. R., BOGDANOVSKY D., BARBIER M., GONNET M., LAVIE P., 1963. Sur l'isolement et l'identification de la 3, 5, 7, trihydroxyflavone (Galangine) partir de la propolis. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 292-302.

FIG. 1. — *Foie de souris qui a reçu de la propolis*

On constate de l'hyperémie et la présence de granules de propolis dans le voisinage des grands vaisseaux.  
(Col. H.E. × 500.)

FIG. 2. — *Foie de souris qui a reçu de la propolis*

On remarque des granules de propolis dans les macrophages à l'intérieur d'un grand vaisseau.  
(Col. H.E. × 500.)

FIG. 3. — *Rein de souris témoin avec infiltration glomérulaire et hyperémie*  
(Col. H.E. × 500.)

FIG. 4. — *Rate de souris qui a reçu de la propolis*

On constate une réaction mégacariocytaire. (Col. H.E. × 300.)

FIG. 5. — *Poumon de souris qui a reçu de la propolis*

Hyperémie et épaissement de la paroi alvéolaire. (Col. H.E. × 500.)

FIG. 6. — *Estomac de souris ayant reçu de la propolis.*

Pas de lésions. (Col. H.E. × 300.)

FIG. 7. — *Sporanges et hyphes de moisissures développées chez les abeilles.*

(Col. hématoxyline ferrique × 500.)



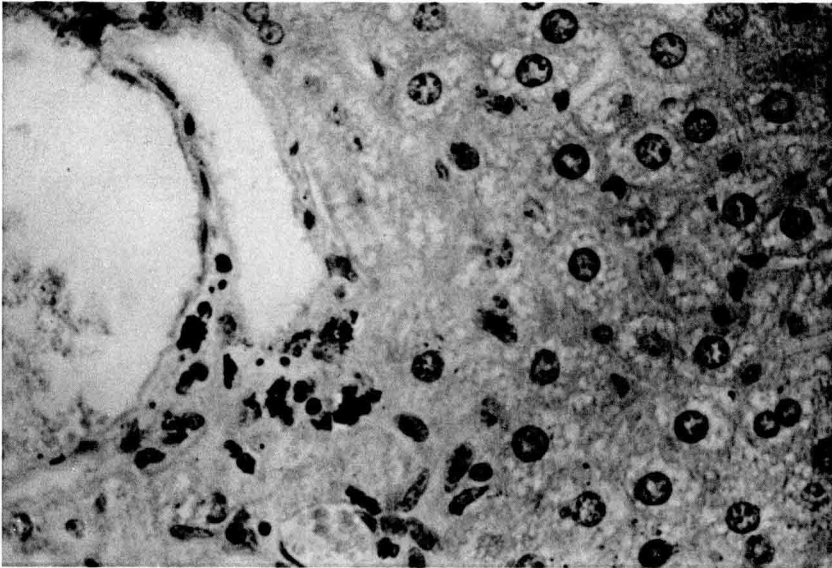


Fig. 2

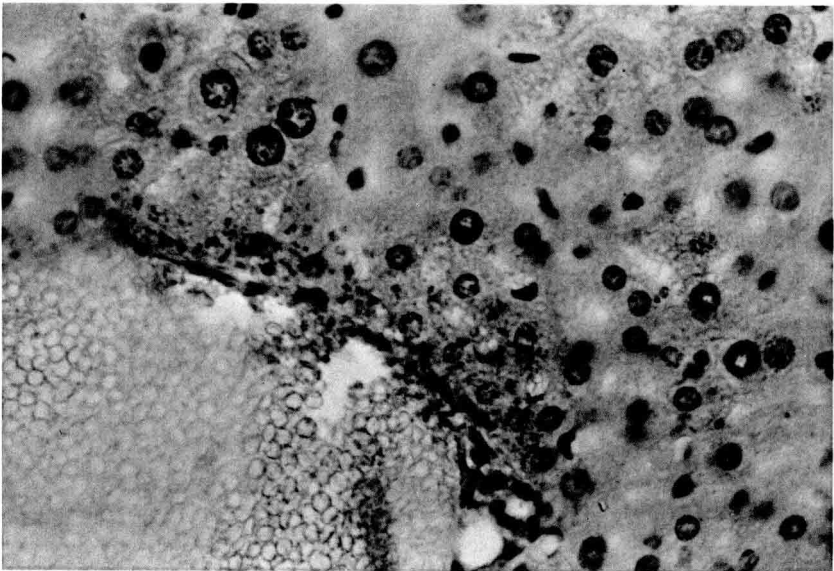


Fig. 1



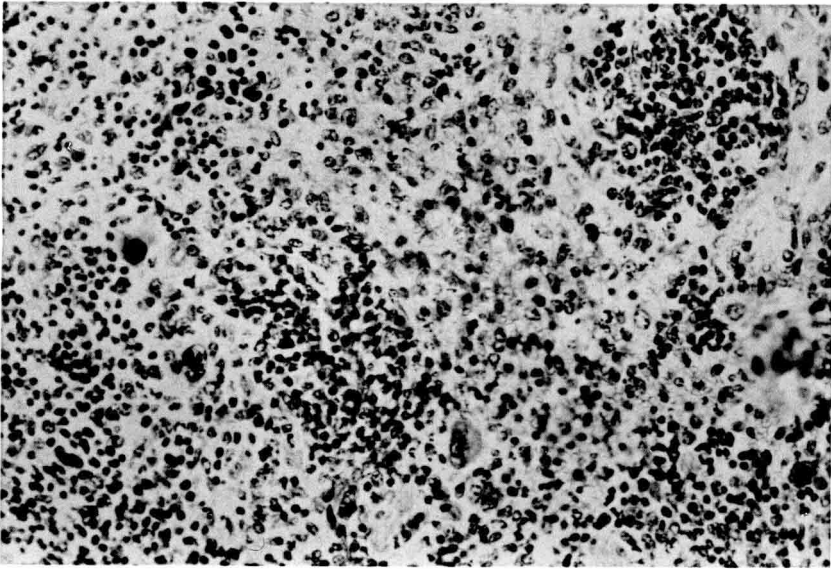


Fig. 4

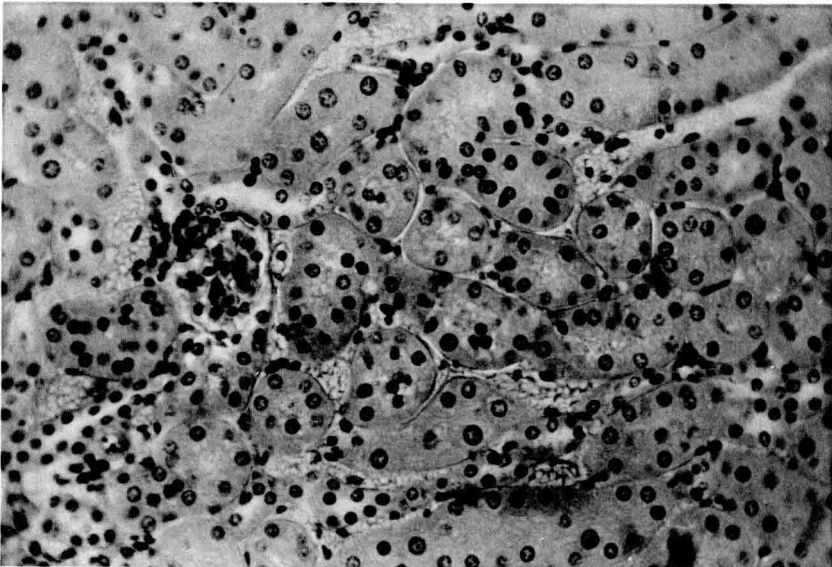


Fig. 3



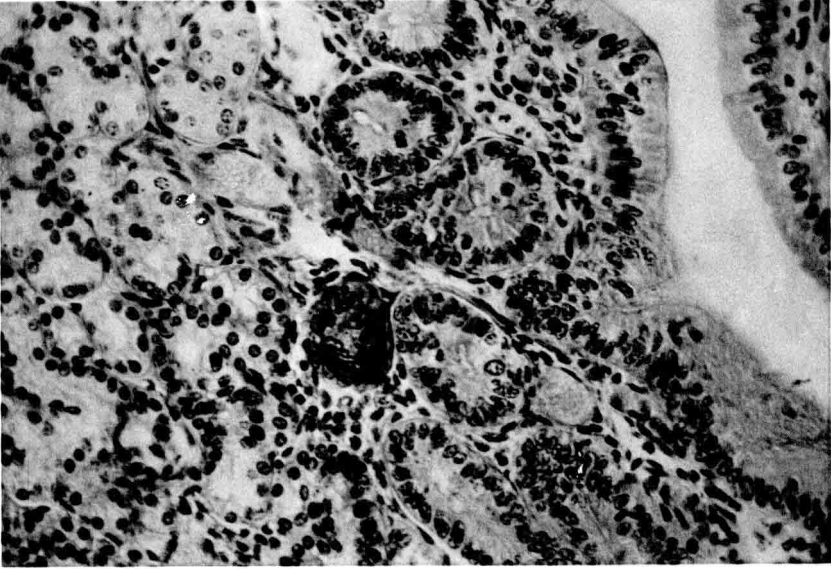


Fig. 6

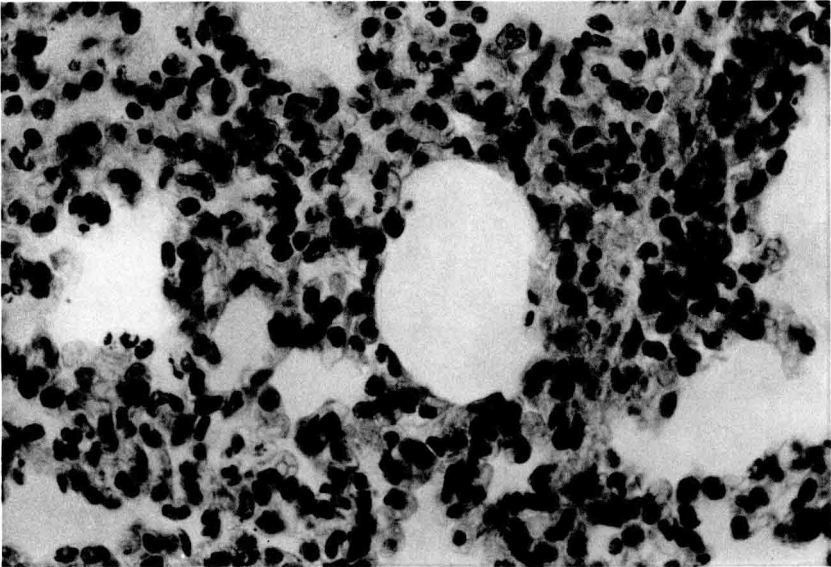


Fig. 5



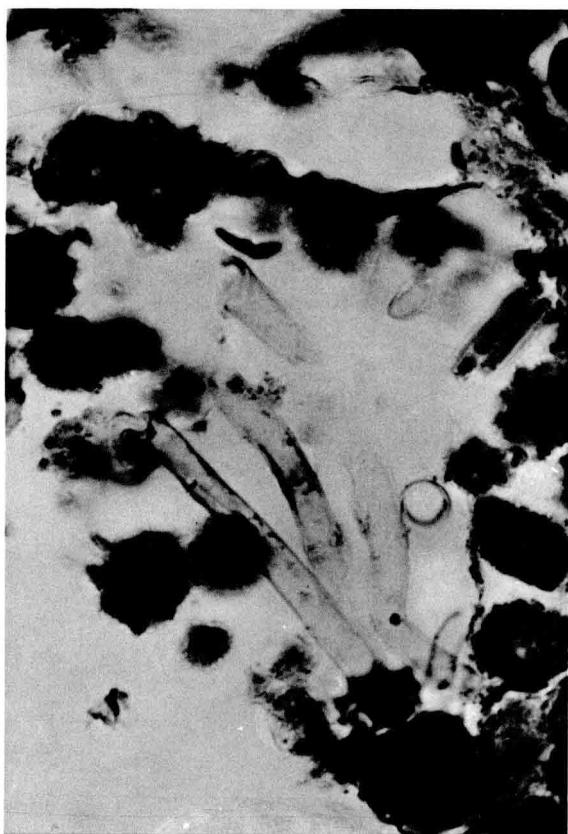


Fig. 7