

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS –SETIF-1

THÈSE

Présentée à :

La Faculté de technologie
Département de Génie des Procédés
Pour l'obtention du Diplôme de

Doctorat en Sciences

Option : Génie des procédés pharmaceutiques

Par :

M^{me} SOLTANI EL-KHAMSA

THÈME

**Caractérisation et activités biologiques de
substances naturelles, cas de la propolis.**

Soutenue le 18 /10/2017 devant le Jury composé de :

Mme BAITICHE Milad	Professeur	Univ. F A Sétif 1	Présidente
Mr ZERROUG M. Mihoub	Professeur	Univ. F A Sétif 1	Directeur
Mr CHAREF Noureddine	Professeur	Univ. F A Sétif 1	Co-directeur
Mr GHERRAF Noureddine	Professeur	Univ. L B Oum El Bouaghi	Examineur
Mr ZELLAGUI Amar	Professeur	Univ. L B Oum El Bouaghi	Examineur
Mr AKKAL Salah	Professeur	Univ. F M Constantine 1	Examineur

Année : 2016 -2017

REMERCIEMENTS

Je remercie le bon DIEU tout puissant, maître tous des cieux et de la terre qui m'a permis de mener à bien ce travail.

*Cette étude a été réalisée au sein du **Laboratoire de biochimie appliquée**, faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Ferhat ABBAS SETIF-1 avec la collaboration du **Groupe Fish Innate Immune System**, Département de Biologie Cellulaire et Histologie, Faculté de Biologie, "Campus Mare Nostrum", Université de **Murcia, (Espagne)**.*

J'adresse mes vifs remerciements à mes Directeurs de thèse le Professeur Mohamed Mihoub Zerroug et le Professeur Noureddine Charef pour leur encadrement. Grâce à eux que j'ai progressé et acquis la rigueur nécessaire pour appréhender ce projet. Tout en étant toujours présents et disponibles, ils ont toujours su me laisser une grande liberté dans mon travail ce qui m'a permis de développer une réelle autonomie. Encore merci !

Je tiens à remercier Madame Samia Mezache-Aichour, Maitre de conférences A à l'Université Ferhat ABBAS SETIF-1, qui n'a pas cessé de me conseiller, de m'encourager et pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté en me fournissant la propolis de Sétif et de Ain Abbassa.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail :

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Madame Baitiche Milad, Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif-1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Qu'elle soit assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

Je suis heureuse de remercier sincèrement Monsieur AKKaL Salah, Professeur à l'Université Constantine 1, d'avoir bien voulu examiner cette thèse et de faire partie de mon jury.

Je tiens également à remercier Messieurs GHERRAF Noureddine et ZELLAGUI Amar, Professeurs à l'Université Oum-El-Bouaghi, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je ne peux pas oublier aussi nos collègues espagnoles, surtout Madame Maria Angeles Estéban, Professeur à la Faculté de Biologie de Murcie (Espagne) et son groupe (Rebecca, Francisco, Juan Pedro, Juana, Hector, Pepe et Patricia), qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire et m'ont beaucoup aidé.

DEDICACES

Je dédie affectueusement cette thèse :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.

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

A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A KHALED qui était toujours à mes côtés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements mon très cher mari.

A mes adorables enfants qui comble notre bonheur

WAIL et ABEDELMOUEMEN

A mes frères et mes sœurs

A mes oncles et mes tantes

A tous mes amis qui sont m'encourager pour compléter cette thèse

ملخص

تم تحضير مستخلصات مائية وإيثانولية من العكبر (AEP و EEP) جمعت من أربعة مواقع في منطقة سطيف بالجزائر، وتمت دراسة تركيبها الكيميائي باستخدام كروماتوغرافيا غازية مزوجة بمطياف الكتلة (GC/MS) ونشاطيتها البيولوجية. تم التعرف على 20 إلى 28 مركبا ومن 30 إلى 35 مركبا في المستخلصات المائية والإيثانولية على التوالي. تمتلك جميع عينات العكبر نشاطية ضد تأكسدية قوية نسبيا والتي ترتبط بالمحتوى الفينولي والفلافونويدي للمستخلصات. مجموع محتويات الفلافونويد وعديدات الفينول من مستخلصات عينات العكبر، كانت في حدود $3,047 \pm 0.004 - 132,952 \pm 0,016$ مغ/غ و $96,833 \pm 0,027 - 600 \pm 0,017$ مغ/غ مستخرج الحام من العكبر على التوالي. علاوة على ذلك، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من مستخلصات العكبر ضد اثنين من البكتيريا الممرضة للأسماك وأخرى غير ممرضة. أبدت المستخلصات الإيثانولية نشاطية ضد بكتيرية جد عالية ضد *Shewanella putrefaciens* ومتوسطة ضد *Photobacterium damsela* ومنخفضة جدا ضد *Vibrio harveyi* بينما أبدت المستخلصات المائية نشاطية ضد بكتيرية ضعيفة. بالإضافة إلى ذلك تم محجريا اختبار تأثير العكبر ضد نشاط الكريات البيضاء لسمكة Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*)، حيث سجل انخفاض كبير في حيوية الخلايا الدموية البيضاء عند استعمال المستخلصات الإيثانولية والمستخلصين المائيين لكل من عيني بابلور وعين عباسية عند استخدامها بتركيز 100 و 200 ميكروغرام / مل. علاوة على ذلك، سجلت آثار مثبطة كبيرة على نشاط انفجار الكريات البيضاء التنفسي. كان هذا التأثير مرتبطا بالجرعة في جميع الحالات إلا في حالة استعمال مستخلص عينة بوطالب. تشير النتائج المتحصل عليها أن بعض مستخلصات العكبر الجزائرية لها نشاط ضد مسببات الأمراض البكتيرية المهمة لسمكة (la dorade) كما كان لها نشاطية في تعديل أنشطة الكريات البيضاء محجريا، مما قد يجعل منها مصدرا لمضادات حيوية طبيعية جديدة و/ أو معدلات مناعة في الاستزراع المائي للأسماك.

الكلمات المفتاحية: العكبر الجزائري؛ تحليل GC-MS؛ محتوى البوليفينول؛ النشاط المضاد للأوكسدة؛ النشاط ضد بكتيري؛
Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*)؛ المناعة الفطرية .

Abstract

Aqueous and ethanolic extracts of propolis (AEP and EEP) samples collected from four locations of the Setif region, Algeria, were prepared and evaluated for the chemical composition by GC/MS and biological activities. 20 to 28 compounds and 30 to 35 compounds were identified in the aqueous and ethanolic extracts respectively. All propolis samples had relatively strong antioxidant activities, and were also correlated with the total polyphenol and flavonoid contents. Total flavonoid and polyphenol contents of extracts of propolis samples, were in the range of $3,047\pm 0,004$ – $132,952\pm 0,016$ mg/g and $96,833\pm 0,027$ – $600\pm 0,017$ mg/g crude extract of propolis, respectively. Furthermore, the antimicrobial activity of the propolis extracts against two marine pathogenic and one non pathogenic bacteria was evaluated. The bactericidal activity of ethanolic extracts was very high against *Shewanella putrefaciens*, average against *Photobacterium damsela* and very low against *Vibrio harveyi*. The lowest bactericidal activity was always found for the aqueous extracts. Finally, the *in vitro* effects of propolis on gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) leucocyte activities were measured. Both the ethanolic and two aqueous extracts (from Babor and Ain-Abbassa) provoked a significant decrease in cell viability when used at concentrations of 100 and 200 μ g/mL. Furthermore, significant inhibitory effects were recorded on leucocyte respiratory burst activity. This effect was dose-dependent in all cases except for Boutaleb extracts sample. Our findings suggest that some of Algerian propolis extracts have bactericidal activity against important bacterial pathogens in seabream and significantly modulate *in vitro* leucocyte activities, confirming their potential as a source of new natural biocides and/or immunomodulators in aquaculture practice.

Keywords: Algerian propolis; GC–MS analysis; Polyphenol content; Antioxidant activity; bactericidal activity; Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*); Innate immunity.

Résumé

Des extraits aqueux et éthanoliques d'échantillons de propolis (AEP et EEP) récoltés dans quatre localités de la région de Sétif, en Algérie, ont été préparés et évalués pour leurs compositions chimiques par GC/MS et activités biologiques. 20- à 28 et 30 à 35 composés ont été respectivement identifiés dans les extraits aqueux et éthanoliques. Tous les échantillons de propolis ont montré des activités antioxydantes relativement fortes, qui étaient également corrélés avec le contenu total en polyphénols et en flavonoïdes. Les teneurs totales en flavonoïdes et en polyphénol des extraits d'échantillons de propolis se situaient dans la gamme de $3,047 \pm 0,004$ - $132,952 \pm 0,016$ mg/g et $96,833 \pm 0,027$ - $600 \pm 0,017$ mg/g d'extrait brut de propolis, respectivement. L'activité bactéricide des extraits éthanoliques était très élevée contre *Shewanella putrefaciens* (non pathogène), alors qu'elle était moyenne contre *Photobacterium damsela* et très faible contre *Vibrio harveyi* deux bactéries pathogènes marines. La plus faible activité bactéricide était toujours celle trouvée pour les extraits aqueux. Enfin, les effets *in vitro* de la propolis sur les activités des leucocytes de la dorade dorée (*Sparus aurata* L.) ont été étudiés. Les extraits éthanoliques et deux extraits aqueux (de Babor et de Ain-Abbassa) ont provoqué une diminution significative de la viabilité cellulaire lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations de 100 et 200 µg / mL. En outre, des effets inhibiteurs significatifs ont été enregistrés sur l'activité du Burst respiratoire des leucocytes. Cet effet était dose-dépendante dans tous les cas sauf dans le cas de l'échantillon de Boutaleb. Les résultats obtenus suggèrent que certains des extraits de propolis algériennes ont une activité bactéricide contre d'importants agents pathogènes bactériens de la dorade et des activités de leucocytes *in vitro* significativement modulables, confirmant leur potentiel en tant que source de nouveaux biocides naturels et / ou immunomodulateurs dans la pratique de l'aquaculture.

Mots-clés: Propolis algérienne; Analyse GC-MS; Teneur en polyphénol; Activité antioxydante; Activité bactéricide; Dorade dorée (*Sparus aurata* L.) ; Immunité innée.

Sommaire

Sommaire	i
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	ix
Introduction générale	1

Partie théorique

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Histoire de la propolis	4
I.2. Caractéristiques, origines et composition chimique de la propolis	5
I.2.1. Composés principaux de la propolis	5
I.2.2. Autres composés de la propolis	10
I.3. Propriétés thérapeutiques de la propolis	10
I.3.1. Activité antimicrobienne de la Propolis	11
I.3.1.1. Activité antibactérienne	11
I.3.1.2. Activité antifongique	13
I.3.1.3. Activité antivirale	13
I.3.1.4. Activité antiparasitaire	14
I.3.2. Activité antioxydante et hépatoprotectrice	14
I.3.2.1. Activité antioxydante	14
I.3.2.2. Activité hépatoprotectrice	15
I.3.3. Effets immunomodulateurs	15
a- Action sur les macrophages	15
b- Action sur les lymphocytes et la production d'anticorps	15
I.3.4. Effets antitumoraux et antiradiation	16
I.3.5. Activité anti-inflammatoire	17
I.3.6. Activité anti-ulcéreuse	18
I.3.7. Autres activités	18

Partie expérimentale

Chapitre II : Etude de la composition chimique de la propolis

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Préparation des échantillons de propolis	19
Produits chimiques	19
Récolte de la propolis	19
Extraction	19
Préparation des extraits éthanolique de propolis (BE, SE, AbE, BoE)	19
Préparation des extraits aqueux de propolis (BA, SA, AbA, BoA)	20
II.1.2. Analyse chimique	20
II.1.2.1. Analyse GC-MS	20
a. Principe	20
b. Chromatographie en phase gazeuse:	21
c. La spectrométrie de masse	21
Mode opératoire	22

L'identification des composés	22
II.1.2.2. Dosage des polyphénols totaux	22
Principe	22
Mode opératoire	23
Préparation de la gamme d'étalonnage	23
Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	23
II.1.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux	23
Principe	24
Préparation de la gamme d'étalonnage	24
Courbe d'étalonnage de la quercetine	25
II.2. Résultats et discussion	
II.2.1. Etude de taux d'extraction	26
II.2.2. Composition chimique	27
II.2.2.1. Analyse par GC/MS	27
II.2.2.2. Teneur en polyphénols totaux	37
II.2.2.3. Teneurs en flavonoïdes totaux	40
Chapitre III : Etude de l'activité biologique de la propolis	
III.1. Matériel et méthodes	
Matériels utilisés	43
Souches bactériennes	43
Animaux	43
Milieux de culture	43
Produits chimiques	43
III.1.1. Activité antioxydante	44
III.1.1.1. Test au DPPH	44
Principe	44
Mode opératoire	44
III.1.1.2. Test de blanchissement du β -carotène	45
Principe	45
Mode opératoire	46
III.1.2. Activité anti bactérienne des extraits de propolis	46
III.1.3. Effets <i>in vitro</i> des extraits de la propolis sur les réponses immunitaires innées de la dorade	47
III.1.3.1. Préparations des solutions des extraits et mesure de l'Osmolalité	47
III.1.3.2. Conception expérimentale et échantillonnage	47
III.1.3.3. Effet des extraits de propolis sur la viabilité des leucocytes	47
Marquage au PI (Iodure de Propidium)	48
III.1.3.4. Burst Respiratoire et Activité de la peroxydase leucocytaire	48
Principe	48
III.1.3.4.1. Burst Respiratoire	49
Principe	49
Mode opératoire	50
III.1.3.4.2. Activité de la peroxydase leucocytaire	50

Principe	50
Mode opératoire	51
III.1.3.5. Analyses statistiques	51
III.2. Résultats et Discussion	
III.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire	52
III.2.1.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH	52
III.2.1.2. Test de blanchissement du β -carotène (the bleaching test)	54
III.2.2. Activité bactéricide	58
III.2.3. Effets <i>in vitro</i> des extraits de la propolis sur les réponses immunitaires innées de la dorade	63
Discussions générales	69
Conclusion	73
Références bibliographiques	75
Annexes	101
Travaux publiés	123

Liste des abréviations

AAR: Activité antioxydante relative.

ADH: Antidiuretic hormone

ADN: Acide désoxyribonucléique

BHT : Hydroxy butyl toluene

CAPE : Caffeic acid phenethyl estern

CMI: Concentration minimal inhibitrice

Con A : Concanavaline A

CTAB: Cetyl trimethyl ammonium bromide

DMSO: Diméthyl-sulfoxyde

DPPH: 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl

EAP: Extrait aqueux de la propolis

EEP: Extrait éthanolique de la propolis

EI: Impact électronique

FCS: Fœtal calf serum

FSC: Forward scatter (size)

HBSS: Hanks' Balanced Salts

HK: Head Kidney

HRP: Horse Radish Peroxidase

IFN-: Interferon

LPS: lipopolysaccharide

mOs: milliosmole

MPO: Myeloperoxidase

NADPH-oxydase: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase

NCC: Non-specific cytotoxic cells

NF-kappa B: Nuclear factor-kappa B

NK: Natural Killer

PI: Propidium iodide

PMA: Phorbol miristate acetate

QSI: Quorum Sensing Inhibitor

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SSC: Side scatter (granularity)

TMB: Tetra Methyl Benzyl

TSA: Trypticase Soy Agar

TSB: Trypticase Soy Broth

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure 1 : Les abeilles réduisent l'entrée de la ruche par la propolis	04
Figure 2: Schéma de montage d'un appareil GC/MS	20
Figure 3: Réaction du Chlorure d'aluminium et des Flavonoïdes	24
Figure 4 : Structure plane de l'acide cinnamique, l'acide benzoïque et de l'acide succinique	28
Figure 5 : L'éther de glycérol	30
Figure 6: Dérivées d'antraquinone, 1 (1,7-dihydroxy-3-méthyl-9,10-antraquinone), 2 (Phomarin, 1,6-dihydroxy-3-méthyl-9,10-antraquinone), 3 (Pachybasin, 1-hydroxy-3-méthyl-9,10-antraquinone), 4 (1,7-dihydroxy-3-hydroxyméthyl-9,10-antraquinone), 5 (Dendryol E), 6 (Dendryol F).	30
Figure 7 : Les alcaloïdes	32
Figure 8 : Structure des composés spécifiques dans BE.	33
Figure 9 : Structure des composés spécifiques dans SE.	33
Figure 10 : Structure des composés spécifiques dans AbE.	34
Figure 11 : Structure des composés spécifiques dans BoE.	34
Figure 12 : Structure des composés spécifiques dans BA.	34
Figure 13 : Structure des composés spécifiques dans AbA.	35
Figure 14 : Structure des composés spécifiques dans BoA.	35
Figure 15 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	37
Figure 16: Teneurs en polyphénols des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3)	39

- Figure 17:** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux. 40
- Figure 18:** Teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3) 41
- Figure 19 :** Réduction du radical libre DPPH* en DPPH. 44
- Figure 20 :** Réactions oxydatives du burst respiratoire des phagocytes téléostéens. 49
Les chiffres correspondent aux enzymes suivantes: **1**, la NADPH oxydase; **2**, le superoxyde dismutase; **3**, la catalase; **4**, de la peroxydase; **5**, la myéloperoxydase. (Bayne et Levy, 1991).
- Figure 21 :** Mécanisme de chimiluminescence du Luminol (Clark, 1937). 50
- Figure 22 :** Valeurs d'IC50 des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques. Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo) et d'antioxydants standards (BHT, rutine, quercétine et acide galique). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3). 52
- Figure 23:** La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo) et d'antioxydant standards (BHT). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3) 54
- Figure 24 :** L'activité antioxydante relative de blanchissement du β -carotène en présence des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo), le méthanol (MEOH), l'eau (H₂O) et le BHT pendant 24h. Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3). 57
- Figure 25 :** Activité bactéricide des extraits de propolis (BE, SE, AbE, BoE, BA, SA, AbA, BoA) contre *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* et 59

Shewanella putrefaciens. Les barres représentent la moyenne \pm SD (N = 3). ** indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif (0% d'activité bactéricide, $P \leq 0,01$).

Figure 26: Viabilité [pourcentage (%) de cellules vivantes] de leucocytes HK à partir de spécimens de dorade (*S. aurata*) après incubation sans (contrôle, barres blanches) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis (barres grises claires: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, barres gris foncé: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, barres noires: 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) A : dorade et B : loup. Les barres représentent la moyenne \pm SD (N=3). Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport au groupe témoin ($P \leq 0,01$). 65

Figure 27 : Activité de la peroxydase des leucocytes HK à partir de spécimens de dorade (*S. aurata*) après incubation sans (contrôle, blancs) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis (barres grises claires: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, barres gris foncé: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, barres noires: 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Les barres représentent la moyenne \pm SD (N=3). Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport au groupe témoin ($P \leq 0,01$). 67

Figure 28 : Activité de rupture respiratoire des leucocytes HK des échantillons de dorade (*S. aurata*) après incubation sans (contrôle, blancs) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis (barres gris clair: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, barres noires: 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Les barres représentent la moyenne \pm SD (N=3). Les astérisques indiquent des différences significatives de respect par rapport au groupe témoin ($P \leq 0,01$). 68

Liste des tableaux

Tableau 1: Composés caractéristiques de la propolis de différentes origines géographiques et de la source végétale respective	07
Tableau 2: Effets de la propolis contre les micro-organismes pathogènes et virus	12
Tableau 3 : Dilutions de la solution mère de l'acide gallique pour tracer la courbe d'étalonnage.	23
Tableau 4 : Dilution de la solution mère de la quercetine pour tracer la courbe étalon	24
Tableau 5 : Le rendement des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3)	26
Tableau 6 : Acides aromatiques des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo).	29
Tableau 7 : Les alcaloïdes représentants dans les différents extraits de la propolis.	31
Tableau 8: Teneur en polyphénols des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3)	38
Tableau 9: la teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N=3)	41
Tableau 10: Influence de la région sur la teneur en flavonoïdes de la propolis d'abeille d'après (Kamazawa et al, 2004).	42
Tableau 11 : Valeurs d'IC ₅₀ des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de	53

diverses origines géographiques

Tableau 12 : L'activité antioxydante relative de blanchissement du β -carotène en présence des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques. **56**

Tableau 13 : Les valeurs d'osmolalité du milieu de culture RPMI et des extraits de la propolis par l'eau distillée (BA, SA, AbA, BoA) et par l'éthanol (BE, SE, AbE, BoE) à différentes concentrations. **63**

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons): En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin. Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années. En effet, la recherche scientifique a tendance à se focaliser sur l'exploration de ces substances qui constituent une alternative prometteuse aux anciennes substances d'origine synthétique. Face à cette situation préoccupante, d'énormes efforts sont consentis dans le domaine de la recherche médicale en vue de trouver de nouvelles molécules naturelles actives efficaces et non toxique (Sforcin *et* Bankova, 2011).

Les produits de la ruche sont depuis des millénaires exploités par l'homme. Ils sont issus de substances naturelles, produits par les abeilles. Leurs utilisations assurent un bon marché et représentent un revenu d'appoint pour l'apiculteur. Parmi ces produits, la propolis est définie comme un remède naturel utilisé depuis l'antiquité, et aussi est une résine végétale. Elle est collectée par les abeilles et a une odeur balsamique et une couleur variable selon ses origines végétales. En effet, la propolis ou colle d'abeille est un mélange complexe de plusieurs composés organiques, et inorganiques, utilisée par l'abeille comme colle, enduit et antibiotique (Bogdanov, 2016).

Dans le monde entier, de nombreuses études sont consacrées à la propolis, source importante de composés phénoliques, notamment les flavonoïdes; divers substances de propolis récoltées de différentes régions du monde ont été identifiées; dont les acides phénoliques, les flavones, les flavonols et les flavanones marquent leur présence permanente (éléments standards de la propolis). En outre, les activités antimicrobiennes de la propolis ont généralement été attribuées aux flavonoïdes, bien que d'autres composants présents dans les propolis puissent également présenter des actions inhibitrices contre les microorganismes (Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2006).

En plus de son activité antimicrobienne, d'autres propriétés biologiques et pharmacologiques ont également été attribuées à la propolis, y compris les activités

anti-inflammatoires, antitumorales, cytotoxiques, hépatoprotectives, antioxydantes, hémato-stimulantes et immunomodulatrices (Banskota *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2004; Orsolic *et Basic*, 2005; Sforcin, 2007).

L'aquaculture est le secteur de la production alimentaire le plus rapide dans le monde (Subasinghe, 2005). Dans les grandes installations de production, où les animaux aquatiques sont exposés à des conditions de stress, des problèmes liés à la maladie se produisent souvent, ce qui entraîne de graves pertes économiques. Les tentatives visant à prévenir ou à contrôler au moins ces maladies ont également conduit à une augmentation substantielle de l'utilisation des produits vétérinaires et de la pratique (FAO, 2004), y compris les agents chimiothérapeutiques et un nombre limité de vaccins. Cependant, l'utilisation d'antibiotiques a été sérieusement critiquée pour les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques qui peuvent se développer. En outre, l'oxytétracycline peut réduire l'immunité naturelle des poissons, ce qui augmente le risque d'infection par des agents pathogènes non bactériens tels que les virus, les champignons et les parasites. Dans ce contexte, les vaccins sont habituellement administrés par injection plutôt que par complément alimentaire ou par immersion. Au cours de la dernière décennie, la recherche sur les immuno-stimulants chez les poissons a augmenté en raison de la large gamme de parasites, de champignons, de virus et, en particulier, de bactéries qui affectent la production de poisson (Anderson *et al.*, 1992). Les immunostimulants renforcent principalement la réponse immunitaire non spécifique des poissons et sont généralement des composants structuraux des parois cellulaires des algues, de bactéries ou de levures, l'accent sur l'augmentation des produits naturels (Clark *et al.*, 2000).

Compte tenu de toutes ces considérations, le présent travail a été conçu pour étudier la composition chimique, les propriétés antioxydantes, l'activité bactéricide et les effets sur les réponses immunitaires innées de la dorade (*Sparus aurata* L.) de huit extraits (éthanoliques et aqueux) de la propolis algérienne obtenus à partir de quatre sites dans la région de Sétif, et d'exploiter ses vertus. Elle a été motivée par :

- La volonté de valoriser un sous-produit de la ruche;
- La nécessité d'analyser un produit local, et d'établir sa carte d'identité en déterminant sa composition chimique;
- Avoir une connaissance des principaux éléments chimiques présents dans la propolis Algérienne, afin d'améliorer son utilisation;

- La mise à la disposition des populations d'un produit naturel, présentant une activité thérapeutique inestimable;

Notre document sera donc composé de trois chapitres, initié par une recherche bibliographique sur un abrégé de l'histoire et l'étymologie de la propolis d'abeille, ainsi que son utilisation au cours des siècles, la composition complexe de la propolis et ses activités biologiques, ainsi que les résultats de la composition chimique des différents travaux qui ont été réalisés dans ce sens.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier chapitre présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir:

- ✓ Étude des taux d'extraction par différents solvants organiques: éthanolique et aqueux;
- ✓ Détermination de la composition chimique des échantillons par GC/MS.
- ✓ Quantification de quelques familles de ses principaux composés tels que les polyphénols et les flavonoïdes.

Le deuxième chapitre élucide :

- ✓ Évaluation de son activité antioxydante par deux méthodes : test au DPPH et le test de blanchissement du β -carotène. Ainsi que l'estimation de la capacité des extraits de la propolis à piéger les radicaux libre ;
- ✓ Etude de l'activité antibactérienne des extraits de propolis contre deux bactéries marines pathogènes ;
- ✓ Effets *in vitro* des extraits de la propolis sur les réponses immunitaires innées de la dorade. Les leucocytes de la dorade de Gilthead (*Sparus aurata* L.) ont été utilisés comme modèle puisque la dorade est l'un des poissons les plus importants de l'aquaculture.

Enfin, les deux chapitres discutent les résultats obtenus dans cette étude.

Partie théorique

Chapitre I :
Etude bibliographique

La propolis, ou «colle d'abeille», est l'un des produits de la ruche, autre que le miel bien connue des apiculteurs. La propolis a montré son efficacité contre une variété de bactéries, de virus, de champignons et de moisissures. Elle s'est même avéré être un immunostimulant non spécifique (Castaldo *et* Capasso, 2002).

Le mot est dérivé du grec pro (avant) et polis (ville). La propolis est utilisée comme bouclier protecteur à l'entrée de la ruche (Figure 1). Elle est également utilisée pour combler les fissures dans la ruche, pour rattacher les coins des cadres aux rainures dans la ruche, et aussi pour polir les cellules du nid d'abeilles. Les cadavres des intrus qui ne peuvent être évacués tels que lézards, serpents et souris sont embaumés avec de la colle d'abeille, protégeant ainsi la colonie contre la flore désagréable et la flore bactérienne des cadavres en putréfaction (Ghisalberti *et al.*, 1978; Bankova *et al.*, 2000).



Figure 1 : Les abeilles réduisent l'entrée de la ruche par la propolis (<http://www.encyclopedie-universelle.net>).

I.1. Histoire de la propolis

Dès l'Antiquité, la propolis était employée comme moyen thérapeutique contre les affections de la peau, les plaies et les suppurations. Égyptiens, Grecs, Romains, Mayas utilisaient les produits issus de la ruche à des fins préventives, curatives et alimentaires. La propolis avait un rôle religieux dans l'Égypte ancienne (3200 à -1100 ans av JC), les Egyptiens utilisaient cette résine pour embaumer les morts, elle était réputée pour ses propriétés conservatrices et son arôme. On l'employait aisément lors de la momification (Crane, 1999). Les Grecs (700 à -600 ans av JC), ont observé que cette substance résineuse se situait à l'entrée de la ruche comme barrière de protection contre les prédateurs (Golder, 2004).

Dans la Rome Antique, les soldats romains, eux, partaient au combat avec un morceau de propolis pour cicatriser leurs futures plaies. La propolis était réputée pour réduire les œdèmes, apaiser les douleurs nerveuses et guérissait les plaies cutanées ou encore les abcès (Ransome, 1937). Durant la même période, en Amérique du Sud, les Incas utilisaient la propolis comme antiseptique. Hippocrate recommandait la propolis pour la guérison des plaies et des ulcères (Viel *et Dore*, 2003).

Les Arabes connaissaient aussi la propolis. Avicenne a parlé de deux sortes de cire: la cire propre et la cire noire, cette dernière étant probablement la propolis. Il a dit: «par sa forte odeur, elle fait éternuer...» et «Elle a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement» (Crane, 1999; Fearnley, 2001).

Au XVIème siècle, elle servait à cicatriser les blessures de flèches. C'est surtout au XVIII et XIXème siècle que la propolis fut utilisée pour panser les plaies. Elle était très répandue sur les champs de batailles notamment lors de la guerre des Boers en Afrique du Sud pour soigner les soldats et accélérer le processus de cicatrisation. Elle était reconnue pour son action antiseptique, anesthésique et cicatrisante (Ransome, 1937; Fearnley, 2001).

I.2. Caractéristiques, origines et composition chimique de la propolis

La propolis est une matière lipophile, dure et cassante à froid, mais devient molle, souple, caoutchouteuse et très collante à chaud (Hausen *et al.*, 1987). Elle possède une odeur aromatique caractéristique et agréable et une couleur variant du jaune-vert, au rouge et au brun foncé en fonction de sa source et de l'âge de l'abeille (Marcucci, 1995; Bankova *et al.*, 2000).

I.2.1. Composés principaux de la propolis

La propolis est un mélange complexe composé de dérivés végétaux et de composés libérés par les abeilles. La proportion des différentes substances est variable et dépend du lieu et du moment de la collecte (Ghisalberti *et al.*, 1978), mais en général, la propolis brute se compose d'environ 50% de résines, 30% de cires, 10% d'huiles essentielles, 5% de pollen et 5% de divers composés organiques (Burdock, 1998; Park *et al.*, 2002; Pietta *et al.*, 2002).

La connaissance de la propolis a enregistré une évolution importante au fil du temps, en raison des études exhaustives concernant sa composition chimique et ses activités

biologiques. Dans les années 60, on a pensé que, malgré sa complexité, la composition chimique de la propolis était plus ou moins constante. Néanmoins, l'analyse d'un grand nombre d'échantillons provenant de différentes origines géographiques a révélé que la composition chimique de la propolis est très variable et difficile à standardiser. Cette composition dépend de différents facteurs tels que la végétation, la saison et les conditions environnementales du site de la collecte (Bankova, 2005; Sforcin *et* Bankova, 2011; Barlak *et al.*, 2011).

Marcucci (1995) et Bankova (2000) ont enregistré plus de 300 substances composant la propolis. Des rapports ultérieurs ont d'ailleurs montré la présence de composés jamais mentionnés auparavant (Khalil, 2006; Fokt *et al.*, 2010; Falcao *et al.*, 2010; Falcao *et al.*, 2013).

Généralement, les principaux constituants de la propolis sont la résine et les matières volatiles, qui sont des substances obtenues à partir d'une variété de processus botaniques dans différentes parties des plantes, et de la cire d'abeille (Bankova, 2005). Les composés typiques sont résumés dans le Tableau 1. Les sources de plantes varient entre les différentes parties du globe, conduisant à une panoplie de composés. Dans une revue sur la normalisation de la propolis, différents types de résine ont été proposés: propolis de peuplier, bouleau, vert, rouge, «Pacifique» et «Canarien» (Bankova, 2005; Fokt *et al.*, 2010).

Tableau 1: Composés caractéristiques de la propolis de différentes origines géographiques et de la source végétale respective

Origine géographique	Sources végétales	Constituants typiques (composants principaux)	Références
Méditerranéen Algérie	<i>Populus</i> spp., <i>Cistus</i> spp.	Pinocébrine, pinobanésine et son acétate, chrysrine, apigénine, pectolinarigénine, pilosine, ladanéine, galangine, naringénine, tectochrysrine, méthoxychrysrine, esters prényliques des acides caféiques, acides feruliques, acides diterpéniques comme l'acide hydroxyditerpénique, le labdane et le clérodane	(Piccinelli et al., 2013)
Suisse	<i>P. tremula</i>	Le <i>p</i> -coumarate de benzyle, le férulate de benzyle et les glycérides phénoliques tels que le dicoumaroylacétylglycérol, le diférouloylacétylglycérol, le ferouloylcoumaroylacétylglycérol et le cafféoylcoumaroylacétylglycérol	(Bankova et al., 2002)
Malte	<i>Ferula</i> spp., Probablement <i>Ferula</i> communis	Les acides diterpéniques tels que l'acide isocupressique, communic, pimarique et imbricatoloïque, conjointement avec le totarol et le 13-epitorulosal	(Popova et al., 2010a)
Turquie	<i>Populus</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Et Castanea</i> sativa	La pinocébrine, le pinobanksin et son acétate, les esters prényliques de l'acide caféique, les acides feruliques, les acides diterpéniques comme les acides pimarique, isopimarique, abiétique, dihydroabiétique, cinnamylcinnamate et oléate d'éthyle, les esters d'acide aromatique tels que le cinnamate de benzyle, l'acide benzédicarboxylique et les flavanols tels que le benzopyranne et chrysin	(Velikova et al., 2000 ; Silici et al., 2007 ; Duran et al., 2011)
Grèce	Probablement <i>Conifera</i> spp.	Les flavonoïdes, les acides diterpéniques tels que isocupressic, pimarique, et les acides communic, isoagatholal, agathadiol, ferruginol, 8-élémane et totarol	(Popova et al., 2010a ; Celemi et al., 2013)
Europe, Amérique du Nord, Nouvelle-Zélande, et les zones tempérées de l'Asie	<i>Populus</i> spp., Plus principalement <i>P. nigra</i>	Pinocébrine, pinobanksine, chrysrine, galangine, acide caféique, acide férulique, acide cinnamique et leurs esters	(Bankova et al., 2000 ; Falcao et al., 2010 ; Sun et al., 2012)
Brésil Propolis rouge Propolis vert	<i>Baccharis</i> spp., Principalement <i>B. dracunculifolia</i> <i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	Les phénylpropanoïdesprénylés, les acides phénoliques, les acides <i>p</i> -coumariquesprénylés, les acétophénonnes, les acides diterpéniques, les acides cafféoylquiniques, le kaempferide, l'isosakuranétine et le kaempferol Formononetin, isoliquiritigénin, liquiritigénin, medicarpin et biochanine A	(Bankova, 2005 ; Park et al., 2002 ; da Silva et al., 2013 ; Daugh et al., 2008 ; Silva et al., 2008 ; Bankova et al., 2000)
Russie	<i>Betula</i> spp., Plus spécifiquement <i>B. verrucosa</i> , <i>B. pendula</i> et <i>B. pubescens</i>	Les acides cinnamiques, les sesquiterpénols de phénylpropanoïde, l'acacétine, l'apigénine, l'émanine, la rhamnocitrine, le kaempferide, l' α -acétoxybétuléol	(Bankova et al., 2000 ; Isidorov et al., 2014)
Cuba, Venezuela	<i>Chusias</i> spp., Plus spécifiquement <i>C. rosea</i> et <i>C. minor</i>	Les benzophénones polyisoprénylées, plus spécifiquement la nemorosone, le xanthocymol et la guttiferone E	(Bankova, 2005 ; Cuesta-Rubio et al., 2002)
Australie Apis mellifera, Stingless abeille Tetragonulacarbonaria	<i>Acacia paradoxa</i> <i>C. torelliana</i> (résine de fruits)	La xanthorrhée, le ptérostilbène, la sakuranétine, la pinostrobine, les stilbènes, le tétrahydroxystilbèneprénylé, les acides cinnamiques prénylés, les flavanones, les flavonols, les chalcones	(Abu-Mellal et al., 2012 ; Tran et al., 2012 ; Ghisalberti et al., 1978 ; Massaro et al., 2014 ; Leonhardt et al., 2011)
Afrique Nigeria Kenya	Probablement <i>M. schweinfurthii</i>	Isoflavonoïdes, isoflavonoïdesprénylés et stilbénoloïdes. Les triterpènes, les lignanes d'arylnaphtalène tels que la tétrahydrojusticidine B et la 6-méthoxydiphylline, les geranylstilbènes et la macarangine de geranylflavon.	(Zhang et al., 2014 ; Petrova et al., 2010)
Cameroun Congo		Triterpènes, dérivés de l'amyrine et du lupeol et des flavonoïdes diprényliques	(Papachroni et al., 2015)
Ethiopie	Probablement <i>Acacia</i> spp.	Les triterpénoloïdes tels que les α et β -amyrines, les acétates α et β -amyryle, le lupeol et les acétates α et β -lupeyle	(Rushdi et al., 2014)
Oman	<i>Azadirachta</i> indica, <i>Acacia</i> spp. Et <i>Mangifera</i> indica	Les triterpènes, les flavanonesprénylées telles que la 7-O-méthyl-8-prénylnaringénine, la 3, 8-diprénylnaringénine et la 8-prényl-5,7-dihydroxy-3-(3-hydroxy-3-méthylbutyl)-4-méthoxyflavanone, Chalcones, cardanol, cardols et acides anacardiques	(Popova et al., 2013)
Thaïlande	<i>Arbres Styra</i>	Phénylallylflavanone, (E)-cinnamyl- (E)-cinnamylidénate	(Athikomkulchai et al., 2013)
La région du Pacifique Okinawa, Hawaii et Taïwan	<i>Macaranga tanarius</i>	Les prénylflavonoïdes, plus spécifiquement l'isonymphéol-B, le nymphéol-A, le nymphéol-B, le nymphéol-C, les propolines, la 3-géranyl-naringénine	(Kumazawa et al., 2004a ; Inui et al., 2014 ; Chen et al., 2012)
Indonésie, Myanmar	<i>Mangifera</i> indica	Alk (én)ylrésorcinol, les triterpènes de type cycloartane, les cycloartanes et les flavanonesprénylées	(Trusheva et al., 2011 ; Li et al., 2009)
Îles Canaries	<i>Inconnu</i>	Furofuranlignans	(Bankova et al., 1998 ; Christov et al., 1999)

Les échantillons de propolis de peuplier (par exemple d'Europe, d'Amérique du Nord, de Nouvelle-Zélande et des zones tempérées d'Asie) sont principalement composés de flavonoïdes, d'acides phénoliques et de leurs esters (Bankova, 2000; Falcao *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012), nettement différents des autres types de propolis (Tableau 1). La propolis portugaise, bien que semblable à celle trouvée dans tous les échantillons européens, contient également de nouveaux dérivés méthylés, estérifiés et hydroxylés des flavonoïdes et des dérivés pinocébrine/pinobantaines contenant une fraction dérivée de l'acide phényl propanoïque dans leur structure (Falcao *et al.*, 2010 ; Falcao *et al.*, 2013).

La propolis de type peuplier est sans doute la plus étudiée, mais il existe de nombreux autres types de propolis. Des études récentes ont révélé un nouveau type de propolis européen: la propolis méditerranéenne. Ce type de propolis se distingue par la forte concentration de diterpénoïdes et se retrouve dans de nombreuses régions comme la Grèce (Popova *et al.*, 2010a; Celekli *et al.*, 2013), la Suisse (Bankova *et al.*, 2002), Malte (Popova *et al.*, 2011), la Turquie (Velikova *et al.*, 2000; Silici *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2011) et l'Algérie (Piccineli *et al.*, 2013).

La propolis des régions tropicales, comme le Brésil, Cuba, le Venezuela et le Chili, a attiré beaucoup d'attention ces dernières années en raison de ses profils chimiques particuliers. Les phényl propanoïdes prénylés, les acides *p*-coumariques prénylés, les acétophénones, les acides diterpéniques et les acides cafféoyl quiniques sont très répandus et abondants dans la propolis du Brésil, principalement de la région sud-est (Bankova *et al.*, 2000; Bankova, 2005; Falcao *et al.*, 2013). Les flavonoïdes comme le kaempferide et l'isosakuranétine et quelques dérivés de kaempferol ont également été trouvés dans des échantillons brésiliens (Park *et al.*, 2002). De plus, la propolis rouge des régions nord-est du Brésil présente des concentrations élevées d'acides phénoliques et des flavonoïdes tels que : formononétine, isoliquiritigénine, liquiritigénine, medicarpin et biochanine A (Daugusch *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2013). La propolis Cubaine est particulièrement riche en benzophénones poly isoprenylés, plus spécifiquement le nemorosone, alors que la teneur en xanthochymol et guttiferone E est relativement faible (Cuesta-Rubio *et al.*, 2002; Bankova, 2005). Ce qui rend ce type d'échantillon chimiquement distinct des deux propolis européenne et brésilienne. La propolis du Venezuela se compose également de benzophénones poly isoprénylées en plus des constituants usuels trouvés dans les échantillons des régions tropicales (Tomas-Barberan *et al.*, 1993; Trusheva *et al.*, 2004; Bankova, 2005).

Les informations sur la composition chimique de la propolis australienne sont très limitées malgré la grande biodiversité de l'île. La propolis de l'île Kangourou est principalement composée de stilbènes, dont certains sont prénylés. De plus, elle contient également des acides cinnamiques prénylés et des flavonoïdes (Abu-Mellal *et al.*, 2012), comme la 2,3,4-triméthoxychalcone, la 2-hydroxy-3,4-diméthoxychalcone, la 2,4-dihydroxy-3-méthoxychalcone, la 5,7-dihydroxy-3-acétate de 2,3-dihydroflavonol (3-acétate de pinobanksine) et le 3-acétate de 5,7-dihydroxy-6-méthoxy-2,3-dihydroflavonol (Tran *et al.*, 2012). Alors que la propolis d'Australie occidentale est principalement composée de Xanthorrhoeol, pterostilbene, sakuranetin et pinostrobin (Ghisalberti *et al.*, 1978). Une étude assez récente a démontré que la propolis des abeilles Australiennes (*Tetragonula carbonaria*) est composée principalement de flavanones C-méthylées (Massaro *et al.*, 2014).

La propolis du "Pacifique" (de Myanmar et des îles : Okinawa, Taiwan, Hawaï et Indonésie) est d'une autre particularité. Une nouvelle famille de composés, les prényl flavonoïdes, plus spécifiquement l'isonymphéol-B, a été identifié dans la propolis d'Okinawa, bien que trois composés déjà connus, le nymphéol-A, le nymphéol-B et le nymphéol-C, aient également été isolés dans trois échantillons (Kumazawa *et al.*, 2004). Comme la propolis d'Okinawa, la propolis hawaïenne est également composée de neuf prényl flavonoïdes (Inui *et al.*, 2014). La propolis taiwanaise est composée de huit prényl flavanones, de nymphéol-A, de nymphéol-B et de nymphéol-C, de propolines A, B et E, d'isonymphéol B et de 3-géranyl-naringénine (Chen *et al.*, 2012). Dans un autre échantillon de la région du Pacifique, la propolis indonésienne, comporte un mélange inséparable de quatre alk(en)yl resorcinols (5-pentadécylrésorcinol, 5-(8Z,11Z heptadécadiényl) -resorcinol, 5- (11Z- heptadecényl) -resorcinol, et 5-heptadécylrésorcinol), ainsi que quatre prényl flavanones, les propolines D, C, F et G et trois triterpènes de type cycloartanetype, l'acide mangiférolique, l'acide iso mangiférolique et l'acide 27-hydroxy isomangiférolique ont été identifiés (Trusheva *et al.*, 2011). En outre, le fractionnement des extraits de propolis du Myanmar a conduit à l'isolement de deux nouveaux triterpènes de type cycloartane, ainsi que de 13 cycloartanes et de quatre flavanones prénylées connues (Li *et al.*, 2009).

Dans la propolis des îles Canaries, un profil phénolique différent a été trouvé, les lignanes de furofurane étant les composés principaux, dont six ont été isolés et caractérisés comme la sésamine, l'épésamine, le méthylxanthoxylol, l'ascomérine, la sesartenine et le yangambin (Bankova *et al.*, 1998; Christov *et al.*, 1999).

De nombreuses études sur la propolis africaine de différentes régions, comme le Kenya, l'Ethiopie (Est), le Cameroun, et le Congo (Ouest), ont montré que les triterpénoïdes sont les composantes chimiques majeures (Petrova *et al.*, 2010; Popova *et al.*, 2013; Rushdi *et al.*, 2014; Papachroni *et al.*, 2015). La propolis du sud du Nigeria comporte des composés rares, car elle présente des isoflavonoïdes prénylés, comme la propolis rouge brésilienne, et une abondance élevée de composés stilbénoides (Zhang *et al.*, 2014).

I.2.2. Autres composés de la propolis

La propolis contient également des sucres et des alcools de sucre (Bankova *et al.*, 1998 ; 2000). Les polysaccharides comme l'amidon et les mono et disaccharides, le glucose, le fructose, le ribose, le rhamnose, le talose, et le saccharose sont également présents dans la propolis (Kurek-Gorecka *et al.*, 2014).

La propolis contient en outre des minéraux tels que le magnésium, le calcium, l'iode, le potassium, le sodium, le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer. Certaines vitamines comme B1, B2, B6, C, E et D, ainsi que la provitamine A. Quelques acides gras, ainsi que certaines enzymes dérivées de la sécrétion glandulaire de l'abeille ou éventuellement du pollen comme la déshydrogénase succinique, l'adénosine triphosphatase, la glucose-6-phosphatase, la phosphatase acide, l' α -amylase, la β -amylase, l' α -lactamase, la β -lactamase, la maltase, l'estérase et la trans hydrogénase (Khalil, 2006; Kurek-Gorecka *et al.*, 2014).

I.3. Propriétés thérapeutiques de la propolis

Les résultats résumés ci-dessous montrent que la propolis possède des effets antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasitaires, antioxydants, hépatoprotectrices, immunomodulateurs, antitumoraux, antiradiation, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et autres activités. Ces propriétés en font un bon candidat pour son application en thérapie.

I.3.1. Activité antimicrobienne de la Propolis

L'activité antimicrobienne de la propolis est la propriété biologique la plus importante, qui a mérité du plus grand intérêt scientifique, compte tenu du grand nombre d'études réalisées. Environ 700 cents documents traitent cet aspect (Bogdanov, 2016). Malgré les grandes différences de composition des différents types de propolis, elles ont toutes une activité antimicrobienne. Il semble que c'est la somme des composantes de la propolis qui sont responsable de l'action antimicrobienne plutôt qu'individuelles (Kujumgiev *et al.*, 1999).

I.3.1.1. Activité antibactérienne

La propolis est le produit de l'abeille ayant l'activité antimicrobienne la plus élevée. L'activité antibactérienne de la propolis a été confirmée par de nombreuses études scientifiques et démontrée contre les deux types de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, à la fois aérobies et anaérobies. Bien que la composition de la propolis diffère considérablement en fonction de son origine botanique, tous les types examinés de propolis ont révélé une forte activité antibactérienne (Bankova, 2005b; Bankova *et al.*, 2007). Cette activité antibactérienne de la propolis de peuplier et d'autres types de propolis d'origine géographique et botanique différentes sont similaire (Kujumgiev *et al.*, 1999). Par ailleurs, la propolis de peuplier recueillie par *Apis mellifera caucasica* a montré une activité antibactérienne plus élevée que celle obtenue par *Apis mellifera anatolica* et *Apis mellifera carnica* (Silici *et* Kutluca, 2005).

L'activité antibactérienne de la propolis contre des bactéries pathogènes ou nocives est résumée dans le tableau 2 ci-dessous (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001b; Orsolich *et al.*, 2004; David *et al.*, 2012; Gressler *et al.*, 2012) La propolis est plus active contre les pathogènes à Gram-positifs malgré que de nombreuses bactéries à Gram négatives sont également inhibées (Tableau 2).

Tableau 2: Effets de la propolis contre les micro-organismes pathogènes et virus d'après (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001b; Orsolich *et al.*, 2004; David *et al.*, 2012; Gressler *et al.*, 2012)

Microorganisme	Espèces
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus cereus, Bacillus mesentericus, Corynebacterium spp., Corynebacterium diphtheriae, Diplococcus pneumoniae, Enterococcus spp., Mycobacteria sp., Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Streptococcus: S. critecus, S. epidermis, S. faecalis, S. mutans, S. pyogenes, S. viridans, S. sobrinus,</i>
Bactéries à Gram négatif	<i>Branhamella catarrhalis, E. coli, Helicobacter pylori, Klebsiella mozaemae, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella : S. choleraesuis, S. dublin, S. enteritidis, S. exneri, S. gallinarum, S. pullorum, S. paratyphi-A, S. paratyphi-B, Shigella dysintertiae, Sh. sonnei</i>
Champignons	<i>Aspergillus sp., Candida albicans, C. guiliermondi, C. parapsilosis, C. tropicalis; Cryptococcus sp., Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Madurella mycetomi, Microsporium: audoinini, canis, cepleo, distortum, ferrugeneum, gypseum; Piedrahortae, Phialophora jeanselmei, Saccharomyces sp., Trichophyton: sp., mentagrophytes, rubrum, Trichosporon cutaneum</i>
Virus	<i>Adenovirus, Coronavirus, Herpes symplex, Influenca A et B virus, Newcastle disease virus, Polio virus, Vaccinia, Rotavirus; Vesicular Stomatitis Virus, Coronar virus</i>
Parasites	<i>Cholomonas paramecium, Eimeria: magna, media, perforans; Giardia lambia, Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma evansi</i>

Des recherches ont révélé une activité antibactérienne contre *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium* et *Klesbsiella pneumoniae* (Victorino *et al.*, 2007). Bien que des

études antérieures avait prétendu que *Listeria monocytogenes* n'était pas sensible à la propolis (Grange *et Davey*, 1990), des travaux postérieurs ont révélé une activité antibactérienne significative vis-à-vis de *Listeria* (Ozcan *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). D'autres études ont montré que la propolis a une activité antibactérienne importante contre 13 pathogènes végétaux différents (Uzel *et al.*, 2005; Basim *et al.*, 2006).

Avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, un intérêt considérable des hôpitaux pour la propolis comme agent antibactérien est né ces dernières années. Il a été montré que la propolis possédait des effets synergiques avec les antibiotiques (Marcucci, 1995; Onlen *et al.*, 2007; Orsi *et al.*, 2006; Scazzocchio *et al.*, 2006; Speciale *et al.*, 2006; Stepanovic *et al.*, 2003).

L'effet antibactérien de la propolis est bactéricide (Grange *et Davey*, 1990; Mirzoeva *et al.*, 1997; Pepeljnjak *et Kosalec*, 2004), par inhibition de leur mobilité (Mirzoeva *et al.*, 1997). Chaque type de propolis agit différemment sur l'activité bactérienne. Savka *et al.* (2015), ont montré que l'activité antibactérienne de la propolis de peuplier repose également sur l'action inhibitrice des molécules du QS (quorum sensing ou communication cellulaire) appelés aussi quorum sensing inhibitor (QSI). La pinocébrine flavonoïde est un important agent QSI.

I.3.1.2. Activité antifongique

La propolis de peuplier recueillie par *Apis mellifera caucasica* en Turquie a eu une activité antifongique plus élevée que celle recueillie par *Apis mellifera anatolica* et *Apis mellifera carnica* (Silici *et al.*, 2005). La propolis a montré des effets fongicides sur : *Candida famata*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* et *Pichia ohmeri* responsables de la détérioration du jus (Koc *et al.*, 2007). Des recherches récentes sur la propolis du peuplier ont montré que celle-ci a la plus importante activité antifongique. Elle a été testée sur 40 souches de levure de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* et *Trichosporon spp.* (Koc *et al.*, 2011). En plus des propriétés antifongiques ont été retrouvés chez des propolis de différentes origines botaniques et géographiques (Kujumgiev *et al.*, 1999).

I.3.1.3. Activité antivirale

La propolis comprend une complexité de composés qui jouent un rôle dans la protection antivirale. Malgré les quelques données disponibles sur cette activité, il a été démontré que la propolis provenant de différentes régions géographiques aurait une activité antivirale considérable en agissant à différents niveaux et en interférant avec la réplication de certains

virus (Fokt *et al.*, 2010). C'est le cas de l'*Herpès simplex* de type 1 et 2, l'adénovirus de type 2, Le virus de la grippe ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), entre autres (Amoros *et al.*, 1992; Marcucci, 1995; Gekker *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2012).

I.3.1.4. Activité antiparasitaire

La propolis agit contre un certain nombre de parasites (Tableau 2). Ainsi, elle pourrait agir comme agent protecteur contre les parasites intestinaux, comme *Schistosoma mansoni* (Issa, 2007) et certains trophozoïtes exp : *Giardia duodenalis* (Freitas *et al.*, 2006). La propolis du Portugal est active contre les *Trypanosomas brucei*, parasite responsable de la maladie africaine du sommeil (Falcao *et al.*, 2014).

I.3.2. Activité antioxydante et hépatoprotectrice

I.3.2.1. Activité antioxydante

Un antioxydant est une molécule capable de ralentir ou d'empêcher l'oxydation d'autres molécules et ainsi d'empêcher de tels changements. L'effet antioxydant est en corrélation avec l'activité anti-inflammatoire et hépatoprotectrice.

La propolis est remarquable pour ses propriétés antioxydantes et qui est plus actif que le reste des produits de la ruche en ce qui concerne cette propriété (Volpi et Bergonzini, 2006). Les effets antioxydants relativement puissants de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) provenant de différentes origines géographiques (Argentine, Australie, Chine, Hongrie et Nouvelle-Zélande) ont été corrélés avec des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes, en particulier le kaempferol et le phénéthyl caffeate (Kumazawa *et al.*, 2004a). D'autres échantillons de propolis provenant de Turquie et de différentes régions de Corée ont donné des résultats similaires (Ahn *et al.*, 2004). En général, les antioxydants synthétiques ont montré de meilleures propriétés antioxydantes que l'EEP, mais à des concentrations plus élevées, par contre le pouvoir réducteur de l'EEP et des antioxydants artificiels étaient similaires. L'activité DPPH de piégeage des radicaux libres de l'EEP Coréenne est supérieure à celle de l'hydroxy toluène butylé (BHT). L'acide ferulique, la quercétine, l'acide caféique, les composés prénylés, l'apigénine ainsi que la galangine, l'acide p-coumarique et l'CAPE (caffeic acid phenethyl ester) ont été identifiés comme composés bioactifs responsables du potentiel antioxydant dans différents échantillons de propolis (Cuesta-Rubio *et al.*, 2002; Orsolich et Basic, 2005; Orsolich *et al.*, 2006; Volpi et Bergonzini, 2006; Fischer *et al.*, 2007). En plus des composés cités, Oyaizu *et al.* (1999) ont rapporté que l' α -tocophérol est contenu

dans presque tous les échantillons de propolis et est fortement corrélé avec son effet antioxydant.

I.3.2.2. Activité hépatoprotectrice

Le foie est l'organe le plus actif du corps. Il a des centaines de tâches à accomplir, y compris la désintoxication du sang (Pham-huy *et al.*, 2008). Un foie lent signifie fatigue et toxémie et un risque élevé de diverses maladies chroniques. Les composés phénoliques sont connus pour avoir une fonction hépatoprotectrice. En effet, une activité hépatoprotectrice a été signalé pour différents types de propolis, ceci est en étroite corrélation avec son activité antioxydante (Banskota *et al.*, 2000; Banskota *et al.*, 2001a; Banskota *et al.*, 2001b). La propolis contre carre les effets hépatotoxiques de la lésion hépatique chez les souris (Lin *et al.*, 1997; Ramirez *et al.*, 1997) et les rats induites respectivement par le paracétamol et le tétrachlorure de carbone (Gonzalez *et al.*, 1995).

I.3.3. Effets immunomodulateurs

Les antioxydants présents dans la propolis (Cuesta *et al.*, 2005; Orsolich *et Basic*, 2005; Orsolich *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2007) jouent aussi un rôle important dans ses propriétés immunomodulatrices (Sayed *et al.*, 2009). L'effet immunomodulateur a été revu par Sforcin (2007), qui a démontré que tous les types de propolis auraient une activité immunomodulatrice. Fischer *et al.* (2007) ont par ailleurs rapporté que la propolis augmente la réponse immunitaire cellulaire par l'augmentation de l'ARNm de l'interféron- γ et active la production de cytokines

a-Action sur les macrophages

Des essais *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'action modulatrice de la propolis sur les macrophages péritonéaux murins, augmentant ainsi leur activité microbicide. Les meilleurs résultats immunomodulateurs ont été observés lorsque la propolis a été administrée à court terme aux animaux. La propolis de peuplier et de baccharis augmentait l'activité des macrophages (Sforcin, 2007).

b-Action sur les lymphocytes et la production d'anticorps

D'autres parts, les deux types de propolis de peupliers et de Baccharis peuvent avoir un effet immunomodulateur en augmentant la production d'anticorps et en activant des lymphocytes B et T (Sforcin, 2007).

Des travaux récents ont fourni des informations sur l'influence de la propolis sur le système immunitaire (Orsolich *et al.*, 2010). Les tests immunomodulateurs ont inclus des tests avec des témoins positifs tels que le lipopolysaccharide (LPS), la concanavaline A (Con A), l'acétate de miristate de phorbol (PMA), les cytokines (IFN-) ou d'autres pour comparer l'efficacité de la propolis. Le cyclo phosphamide est couramment utilisé comme médicament immuno suppresseur et il a été utilisé *in vivo* à la fois comme témoin négatif et aussi pour étudier l'action immuno restauratrice de la propolis de peuplier (Dimov *et al.*, 1992; Ivanovska *et al.*, 1993). La propolis verte brésilienne (200 mg/kg pendant 14 jours) a également exercé une activité immunomodulatrice chez les souris porteuses de mélanome soumises à un stress chronique (Missima *et al.*, 2009; 2010). Chez l'homme, le CAPE (à 1, 2 et 4 g/mL) a montré un effet protecteur contre le stress hyperthermique chez les athlètes, ce qui améliore la tolérance hyperthermique dans les cellules mononucléaires immunitaires des cyclistes compétitifs (Chen *et al.*, 2009).

I.3.4. Effets antitumoraux et antiradiation

Orsolich (2010), a montré l'activité chimio préventive de la propolis dans les modèles animaux et les cultures cellulaires par : (i) leur capacité à inhiber la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales, (ii) leur capacité à induire l'apoptose (mort cellulaire) des cellules tumorales (iii) ainsi que leurs propriétés à activer les macrophages, par production des facteurs capables de réguler la fonction des cellules B, T et NK. En effet, Sforcin (2007) avait déjà rapporté une stimulation de l'activité lytique des cellules NK contre les cellules tumorales par augmentation de la production des anticorps. De plus, les flavonoïdes de la propolis jouent un rôle protecteur contre la toxicité des agents chimio thérapeutiques ou des radiations chez la souris, ce qui donne l'espoir qu'ils peuvent avoir une action protectrice similaire chez l'homme. La combinaison avec une thérapie antioxydante adjuvante peut améliorer l'efficacité de la chimiothérapie en améliorant l'effet secondaire sur les leucocytes, le foie et les reins et, par conséquent, permettant ainsi une augmentation de la dose (Sforcin, 2007).

Bien que de nombreux polyphénols aient une activité anti-métastatique, l'acide phénylique d'acide caféique (CAPE) de la propolis de peuplier et l'Artepiline C de la propolis de baccharis ont été identifiés comme des agents anti tumoraux (Bankova *et al.*, 2007; Sforcin, 2007). Les effets anti tumoraux de la chryisine (propolis de peuplier), de la nemorosone et de la plukenetione A (propolis cubaine) ont aussi été rapportés. La consommation régulière de suppléments alimentaires de propolis peut avoir un effet préventif contre les cancers liés à la

mutation chez l'homme. Cette activité préventive est liée à l'activité anticancéreuse, antioxydantes, antiprolifératives (les cellules cancéreuses provoquant une apoptose), anti-angiogénique (processus multi-étape pour former des vaisseaux sanguins, ce processus est perturbé dans le cancer), suppressives, anti-inflammatoire et immunomodulateur (Watanabe *et al.*, 2011; Vit *et al.*, 2015).

Par son effet antioxydant puissant la propolis peut contrer le rayonnement en minimisant les taux de molécules oxydantes dans les cellules tumorales des animaux. En effet, la propolis agit également dans l'apoptose des cellules cancéreuses, améliorant ainsi l'effet anticancéreux du rayonnement (Benkovic *et al.*, 2008; Orsolich, 2010).

I.3.5. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse biologique complexe impliquant des tissus vasculaires suite à des stimuli nuisibles, tels que les agents pathogènes, les endommagements des cellules et les effets irritants des radicaux libres. L'activité anti-inflammatoire est donc définie comme l'effet primaire du système de défense de l'hôte (Khayyal *et al.*, 1993).

L'activité anti-inflammatoire de la propolis a aussi été rapportée. Alors que l'extrait éthanolique de propolis supprime les prostaglandines et la production de leucotriènes par les macrophages péritonéaux de souris *in vitro*, et pendant l'inflammation péritonéale aiguë induite par le zymosan *in vivo*. La propolis alimentaire supprime significativement la voie de la lipoxigénase du métabolisme de l'acide arachidonique pendant l'inflammation *in vivo*. C'est le CAPE qui serait responsable de cette modulation, et qui s'est avéré plus puissant que l'acide caféique, la quercétine et la naringénine (Mirzoeva *et Calder*, 1996).

La propolis aurait des effets inhibiteurs sur l'activité de la myélo peroxydase, la NADPH-oxydase l'ornithine décarboxylase, la tyrosine-protéine-kinase et l'hyaluronidase provenant de mastocytes de cobaye. Cette activité anti-inflammatoire peut s'expliquer par la présence de flavonoïdes actifs et de dérivés d'acide cinnamique. Le premier comprenant l'acacétine, la quercétine et la naringénine, alors que le second comprend l'ester de phényle d'acide caféique et l'acide caféique (Almeida *et Menezes*, 2002).

D'autres part, le CAPE et la galangine, les deux constituants typiques de la propolis de peuplier ont inhibé de manière significative l'œdème de carraghénane, la pleurésie de carraghénane et les inflammations de l'arthrite chez le rat (Borrelli *et al.*, 2002; Du Toit *et al.*, 2009). En effet d'autre part, il a été démontré que la propolis de *Baccharis* supprime les réponses neuro-inflammatoires induites par l'hypoxie par inhibition de l'activation de NF-

kappa B dans la microglie. L'activation de ces dernières dans les mitochondries est responsable d'une génération accrue de ROS (Wu *et al.*, 2013).

I.3.6. Activité anti-ulcéreuse

Tossoun *et al.* (1997) et Boyanova *et al.* (2005), ont rapporté que le miel et la propolis ont été efficaces en tant que traitement des ulcères cutanés chroniques. En effet, la propolis bulgare possède un effet inhibiteur *in vitro* sur la croissance d'*Helicobacter pylori*. En utilisant différentes méthodes (diffusion sur gélose, méthode des puits, disques secs ou humides) pour évaluer l'activité d'un extrait éthanolique de propolis bulgare (EEP à 30%); Kimoto *et al.* (1998) sont parvenus à conclure que cette propolis possédait une activité antibactérienne considérable contre *H. pylori* et pouvait inhiber la croissance de *Campylobacter jejuni* et de *Campylobacter coli*.

I.3.7. Autres activités

De nombreuses autres propriétés biologiques et pharmacologiques de la propolis ont été décrites dans plusieurs études (Marcucci, 1995), y compris les propriétés régénératrices des tissus, les propriétés immunogènes. Des effets cardio protecteurs (Chopra *et al.*, 1995), neuroprotecteurs (Shimazawa *et al.*, 2005) ont également été rapportés. La propolis semble diminuer le taux de cholestérol et la tension artérielle, ce qui rend possible son utilisation dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose (Castaldo *et Cappasso*, 2002). D'ailleurs, Maruyama et ses collaborateurs (2009) suggèrent que l'EEP de la propolis verte brésilienne et ses principaux constituants peuvent être utiles pour la prévention de l'hypertension. La propolis a une activité anesthésique avec des effets similaires à ceux de la cocaïne (Paintz *et Metzner*, 1979).

Partie expérimentale

Chapitre II :

Etude de la composition chimique de la propolis

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Préparation des échantillons de propolis

➤ Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour les différentes analyses traitées dans ce chapitre sont résumés dans ce qui suit : Pyridine anhydre, N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide, Le réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, chlorure d'Aluminium, acide gallique et quercétine, ont été achetés auprès de Sigma, les autres réactifs étant de qualité analytique.

➤ Récolte de la propolis

Quatre échantillons de propolis brute Algérienne ont été récoltés dans différentes régions géographiques au cours des années 2011-2014, en raclant les cadres mellifères des ruches. Les quatre sites des ruchers sont distribués comme suit dans la wilaya de Sétif (Est de l'Algérie) : Babor, 2011 (Nord, B), Sétif, 2012 (Guasria, S), Ain-Abbassa, 2013 (Nord-Ouest, Ab) et Boutaleb, 2014 (Sud, Bo). Les échantillons de propolis ont été conservés à l'obscurité et à 4 ° C jusqu'à leurs utilisations.

➤ Extraction

L'extraction n'est qu'une étape de transformation de la matière première (dans notre cas c'est la propolis) en un extrait. Toutes les étapes qui précèdent ou suivent l'extraction doivent être maîtrisées avec précision pour un produit final de qualité optimale. Dans cette optique, le découpage de la propolis a été réalisé de façon à pouvoir récupérer des morceaux très fins dans le but d'optimiser l'extraction. Rendue en petit morceaux, subissant une extraction à température ambiante (macération). L'extrait récupéré a été pesé pour déterminer le poids sec résultant après évaporation à sec sous pression réduite.

L'extraction a été réalisée par deux solvants. Le premier est l'éthanol, et le second est l'eau distillée. Deux extraits ont été obtenus, un extrait éthanolique (EEP), et un extrait aqueux (EAP).

➤ Préparation des extraits éthanolique de propolis (BE, SE, AbE, BoE)

30 grammes de chaque échantillon de propolis ont été macérés dans 100 mL d'éthanol à 70% à température ambiante pendant une semaine, ensuite filtrés sur gaze et papier Whatman n°1, respectivement. La phase éthanolique obtenue est alors évaporée à 50 °C puis séché dans une étuve à 40°C. La poudre résultante est alors conservée à 4 °C à l'obscurité jusqu'à utilisation (Eraslan *et al.*, 2007).

➤ Préparation des extraits aqueux de propolis (BA, SA, AbA, BoA)

50 grammes de propolis brute est macérés dans 150 mL d'eau distillée sous agitation pendant 48 h. L'extrait aqueux résultant est filtré sur gaze et papier Whatman n°1, respectivement. Les filtrats sont évaporés à 50 °C puis séché dans une étuve à 40°C, et stockés à 4 °C à l'obscurité jusqu'à utilisation (Yildirim *et al.*, 2004).

II.1.2. Analyse chimique

II.1.2.1. Analyse GC-MS

Le couplage chromatographie en phase gazeuse–spectrométrie de masse (GC-MS, figure 2) est une technique parmi les plus utilisées de la chimie analytique et la spectrométrie de masse. Elle fournit les informations nécessaires pour la détermination structurale de chaque constituant, en complément de l'identification.

a. Principe

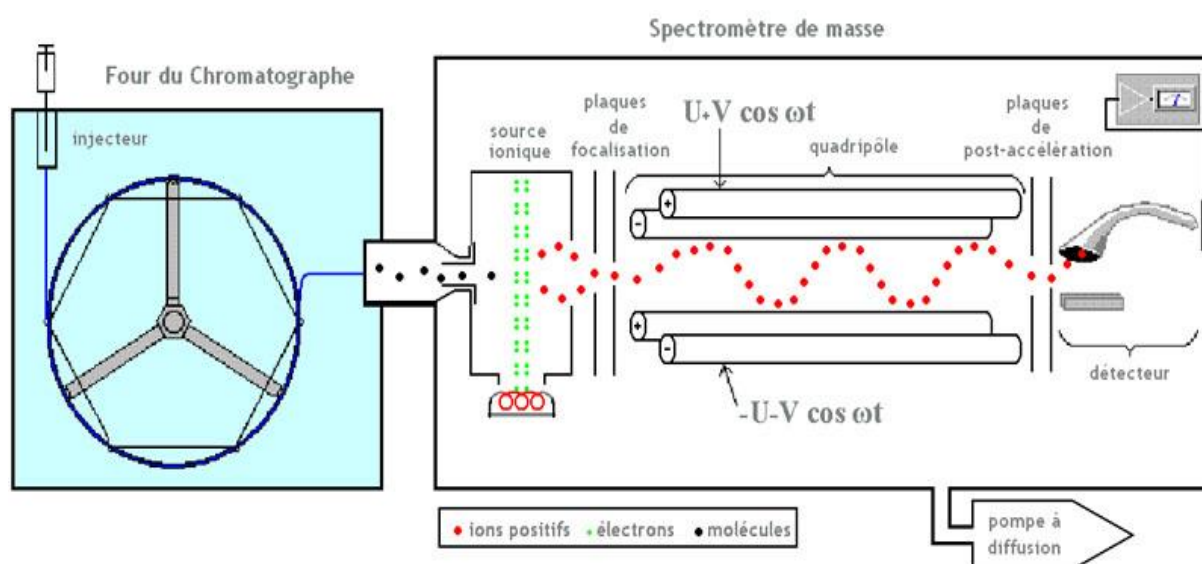


Figure 2: Schéma de montage d'un appareil GC/MS (<http://atechimie.univ-lille1.fr/Techniques/CPG-SM/Principe-fonctionnement/>)

La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permet de séparer des mélanges de composés volatiles ou susceptibles d'être vaporisés par suite d'équilibres entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire.

b. Chromatographie en phase gazeuse:

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules essentiels : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Où, entraînés par un gaz vecteur inerte, les analytes étudiés sont séparés en fonction de leur capacité d'interaction avec la phase stationnaire.

- L'injecteur: L'échantillon est introduit avec une micro seringue, à travers un septum en élastomère, dans la chambre de vaporisation. L'injecteur a une double fonction : il porte l'échantillon à l'état de vapeur, puis il l'amène dans le flux gazeux en tête de colonne.

- La colonne: est placée dans une enceinte à température régulée. Elle se présente sous la forme d'un tube de silice, enroulée sur lui-même et de longueur allant de 1 à plus de 60 m.

- Le détecteur: il s'agit du module qui va permettre de détecter voire d'identifier les composés en sortie de colonne.

c. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire m en analysant leur rapport de masse/charge, noté m/z , où m est la masse du composé et z sa charge. Un spectromètre de masse est un appareil qui permet de mesurer le rapport m/z des ions formés à partir de l'échantillon analysé. Il est constitué des parties suivantes :

-Chambre d'ionisation: en sortie de colonne, l'intégralité des analytes entre dans la chambre d'ionisation. Le mode d'ionisation est l'impact électronique (EI)



Ces ions formés dans la source sont ensuite accélérés et focalisés par une électrode chargée positivement (le repousseur) vers l'analyseur : le quadripôle.

- Analyseur quadripolaire : L'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte où règne le vide, permet de déterminer le rapport masse sur charge (m/z) de l'ion. En balayant les amplitudes U et V, la trajectoire des ions peut-être stabilisée ou déstabilisée en fonction de leur rapport m/z . Seuls les ions qui ont une trajectoire stable vont pouvoir traverser le quadripôle et arriver au détecteur, les autres étant éjectés.

- Détecteur : Le détecteur recueille alors ces ions séparés par l'analyseur en fonction de leur rapport m/z . Puis un micro-ordinateur va assurer le traitement des données et fournir

un spectre de masse. L'EI est un procédé reproductible qui permet des comparaisons spectrales à l'aide de bibliothèques de spectres (NIST), (Deng *et al.*, 2005).

Mode opératoire

L'analyse GC/MS a été effectuée selon la méthode décrite par Popova *et al.* (2005).

5 mg de résidu (des huit extraits (4) aqueux et (4) éthanoliques préparés précédemment) a été mélangé avec 50 µL de pyridine anhydre et 75 µL de N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide, chauffé à 80 °C pendant 20 min et analysés par GC-MS. L'analyse GC-MS a été effectuée avec un chromatographe Hewlett Packard en phase gazeuse 6890 série II Plus couplé à spectrophotomètre de masse (Hewlett Packard 6972) équipé d'une colonne capillaire HP5-MS de 30 m de long, 0,25 mm de diamètre intérieur et de 0,5 µm d'épaisseur de film. La température est programmée de 100 à 325 C à une vitesse de 5 °C/min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 20 mL/min. Le rapport de division est de 50:1, et la température de l'injecteur est de 280°C.

L'analyse par GC/MS a été réalisée au niveau du centre SACE de l'université de Murcie, Espagne.

➤ L'identification des composés

L'identité des composants dans les extraits a été obtenue par comparaison de leurs indices de rétention et modèles de fragmentation des spectres de masse avec ceux retrouvés dans la banque de données informatique NIST08.LIB, WILEY275.LIB et aussi avec les données publiées.

II.1.2.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007).

• Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phospho tungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phospho molibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de cette coloration bleue est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu ayant un maximum d'absorption à 765 nm (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

Mode opératoire

Préparation de la gamme d'étalonnage

- Une solution mère d'acide gallique est préparée par dissolution de 10 mg dans 10 mL d'éthanol (S1=1 mg/mL). Ensuite des dilutions sont préparées à partir de celle-ci dans un volume final de 500 μ L (Tableau 3).

Tableau 3 : Dilutions de la solution mère de l'acide gallique pour tracer la courbe d'étalonnage.

[C]	10	20	40	60	80	100	120	140
V _{sm} (μ L)	5	10	20	30	40	50	60	70
V _{e.d.} (μ L)	495	490	480	470	460	450	440	430

[C] : Concentration obtenue.

V_{sm} (μ L) : Volume de la solution mère.

V_{e.d.} (μ L) : Volume du solvant ajouté (eau distillé).

• Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Dans des tubes à essais, 0,1 mL de chaque dilution de la gamme étalon d'acide gallique est additionnée à 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dans l'eau distillée (v/v); après une agitation vigoureuse et un repos de 4 min, 0,4 mL de carbonate de sodium à 7,5 % sont rajoutés. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les absorbances sont lues sur un spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 765 nm (les échantillons de propolis subissent le même traitement). Ainsi la courbe d'étalonnage est alors tracée. Le blanc est représenté par 0,1 mL de chaque concentration d'acide gallique à laquelle on ajoute 0,4 mL de carbonate de calcium additionnée à 0,5 mL d'eau distillée. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata. Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de propolis sont calculées en extrapolant les valeurs d'absorbance à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard.

II.1.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de propolis est réalisée par la méthode de Bahorun *et al.* (1996).

• Principe

Après l'ajout de la solution de chlorure d'Aluminium (AlCl_3), une couleur jaunâtre se forme. Cette coloration est due à la formation du complexe entre le chlorure d'Aluminium (Figure 3) et les flavonoïdes ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons (Ribéreau-Gayon, 1968). La formule du complexe entre le chlorure d'Aluminium et un composé phénolique O-hydroxy carbonylé se présentant comme suit:

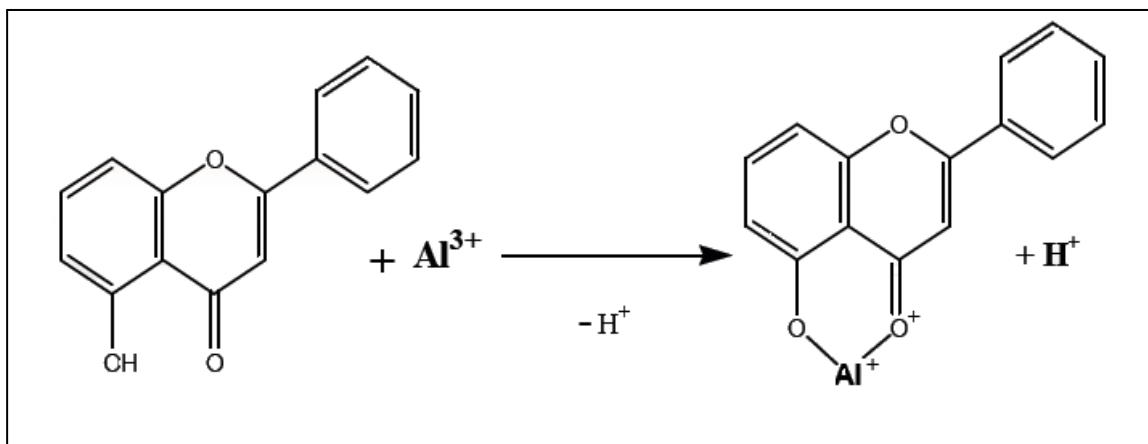


Figure 3: Réaction du Chlorure d'aluminium et des Flavonoïdes (Ribéreau-Gayon, 1968).

Mode opératoire

• Préparation de la gamme d'étalonnage

Une solution mère de quercétine est préparée par dissolution de 2,5 mg de quercétine dans 1mL de méthanol (S2). La solution mère est diluée une première fois dans une fiole, et afin d'obtenir une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$, 50 mL de méthanol est rajouté. La préparation des solutions pour la courbe d'étalonnage des flavonoïdes est illustrée dans le tableau 4 (Le volume total est de 5 mL).

Tableau 4 : Dilution de la solution mère de la quercétine pour tracer la courbe étalon

[C] ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	5	7	10	15	20	40
V_{sm} (mL)	0,1	0,2	0,5	0,7	1	1,5	2	4
$V_{\text{Me.OH}}$ (mL)	4,9	4,8	4,5	4,3	4	3,5	3	1

[C] : Concentration obtenue,

V_{sm} (mL) : Volume de la solution mère,

$V_{\text{Me.OH}}$ (mL) : Volume du solvant ajouté (Methanol),

- **Courbe d'étalonnage de la quercetine**

Dans des tubes à essais 1 mL de chaque dilution de la gamme étalon de quercetine sont additionnés à 1 mL de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 %; les tubes sont alors incubés à l'abri de la lumière pendant 10 min à température ambiante (Les échantillons de propolis subissent le même traitement). Le blanc est représenté par 1mL de chaque concentration de quercetine à laquelle 1 mL de méthanol est rajouté. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. La lecture des absorbances est faite à 430 nm, après agitation et repos de 10 min. La concentration des échantillons de propolis en composés flavonoïques est déterminée en extrapolant les absorbances de ceux-ci à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercetine comme standard. La courbe d'étalonnage ($Y = aX + b$) obtenue avec la quercetine à différentes concentrations pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes en mg par g de propolis est alors déterminée.

II.2. Résultats et discussion

II.2.1. Etude de taux d'extraction

Les rendements d'extraction de la propolis par l'eau distillée (BA, SA, AbA, BoA) et par l'éthanol (BE, SE, AbE, BoE) sont présentés dans le Tableau 5. Ces extraits renferment tous les composés qui peuvent être extraits par l'eau ou l'éthanol (selon l'affinité du solvant d'extraction avec les composés extraits), ces composés peuvent être des flavonoïdes, des composés phénoliques, etc. le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de propolis brute. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (p/ p), (Paviani *et al.*, 2009).

Le rendement d'extraction varie de $4,59\% \pm 0,1$ à $6,53\% \pm 0,2$ pour les extraits aqueux et de $28,24\% \pm 0,22$ à $40,73\% \pm 0,21$ pour les extraits éthanoliques. Cette variation dépend du solvant d'extraction ainsi que la provenance de la propolis, ce qui prouve une fois de plus la complexité de la composition de la propolis.

Tableau 5 : Le rendement des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques.

L'origine	Extraction par l'eau distillée	Extraction par l'éthanol 70%
Babor (B)	$6,53\% \pm 0,2$	$40,73\% \pm 0,21$
Sétif (S)	$5,83\% \pm 0,8$	$38,86\% \pm 0,12$
Ain-abbassa (Ab)	$5,33\% \pm 0,22$	$28,24\% \pm 0,22$
Boutaleb (Bo)	$4,59\% \pm 0,1$	$36,66\% \pm 0,42$

Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N = 3).

Concernant l'eau, celle-ci étant polaire, les rendements sont très faibles. Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés dans la littérature. En effet, une étude sur l'extraction aqueuse a indiqué des rendements de l'ordre de 3,2%, 7,7% et 9,6% respectivement pour la propolis du Pérou, de la Chine et du Brésil (Banskota *et al.*, 2000). Une autre étude a rapporté un taux d'extraction par l'eau de 7% (Najafi *et al.*, 2007). L'extraction avec l'eau a montré un rendement plus faible parce que l'eau a une affinité avec les composés polaires, le groupe hydroxyle (-OH) transforme l'eau en un mauvais solvant pour les composés organiques.

Dans le cas de l'extraction avec l'éthanol, on remarque une augmentation du rendement d'un facteur de 6 et plus. Les résultats du rendement en EEP de la propolis Algérienne ($28,24\% \pm 0,22$ à $40,73\% \pm 0,21$) étaient proches de ceux obtenus par Funari *et al.* (2007), (Najafi *et al.* (2007), Paviani *et al.* (2009) et Biscaia *et* Ferreira (2009) qui ont obtenu des rendements de l'ordre de $38,34\% \pm 2,05$, $35\% \pm 2,20$, $39,45\% \pm 1,20$ et $46,00\% \pm 6,00$, respectivement. En effet, ce taux peut varier d'un échantillon à un autre dans la même région. Ceci a été démontré pour la propolis brésilienne, où des taux allant de 40,7% à 73,9% ont été obtenu avec l'éthanol à 70%. De plus ce taux croit avec l'augmentation du temps de macération, cependant la composition qualitative reste la même (Silva *et al.*, 2006).

Les différences dans le rendement d'extraction et les concentrations sont liées aux caractéristiques de la propolis brute influencées par, la saison de récolte, les espèces d'abeilles et la flore régionale (Popova *et al.*, 2010b).

II.2.2. Composition chimique

II.2.2.1. Analyse par GC/MS

L'analyse GC-MS des échantillons a permis d'identifier 30, 25, 31 et 35 composés (Tableau 1, 2, 3 et 4 : **Annexe I**), dans les extraits éthanoliques de propolis prélevés à Babor (BE), Sétif (SE), Ain-Abbassa (AbE) et Boutaleb (BoE), respectivement. Pour les extraits aqueux de propolis, 20, 21, 26 et 28 composés (Tableau 5, 6, 7 et 8 : **Annexe I**) ont été identifiées dans l'échantillon de Babor (BA), Sétif (SA), Ain-Abbassa (AbA) et Boutaleb (BoA), respectivement.

La technique GC-MS a été utilisée pour explorer les phytoconstituants majeurs et mineurs présents dans les différents extraits de propolis. Le screening phytochimique préliminaire montre la présence d'acides gras saturés et insaturés, d'hydrocarbures, de glycosides, de polysaccharides, de composés phénoliques, de composés organiques hétérocycliques, d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de phytostérols, de monoterpènes, de triterpènes, de sesquiterpènes, d'acides aminés et d'anthraquinones.

L'identification phytochimiques des composés est basée sur le temps de rétention (Popova *et al.*, 2005). Dans la présente étude, on a détecté une variété de composés dans les échantillons de propolis, comprenant la Chrysin (Flavonoïde), la 2'-O-méthyl cajanone (Isoflavonoïdes), l'acide déshydro abiétique, l'acide pimarique, l'acide abiétique, l'acide hydroxydehydrostevic (Diterpène), le docosane, le butane, l'octadécane (Alcane hydrocarbure), l'acide hexadécanoïque, l'acide nona hexacontanoïque (acides n-

alcanoïques), l'acide cinnamique, l'acide benzoïque, l'acide 2,3,5-triméthoxymandélique, l'acide 3-chloro2-fluorobenzoïque (acide aromatique), la lanostane-3-one, le 18-époxy- et le Pregn-4-en-3-one, le 17-hydroxy-, (17a) (tri-terpène), le thymol (monoterpène phénol) Guaiène (sesquiterpènes), Pagicerine, Demecolcine, Papaverine, Aspidospermidine, Thébaine, N, O-Diméthyl stéphine, Morpholine (alcaloïdes).

L'aire de pic la plus élevée (%) de 60,27 a été obtenue pour le triméthyl 3,4-bis (triméthoxy) cinnamate (ester d'acide aromatique) avec un temps de rétention de 17,628 dans l'échantillon de BA (Tableau 5 : **Annexe I**) et la plus faible surface de pic (%) de 0,02 a été obtenu pour le succinate d'éthyle (triméthylsilyle) (ester Ehtyl) avec un temps de rétention de 5,081 dans l'échantillon BE (Tableau 1 : **Annexe I**). En plus de ces composés, il y a des sucres (D- fructose, sorbopyranose, mannose, talose, alpha-D-Mannopyranose, D-Glucose, lyxose et scopolin) et leurs acides (L et D-acide gluconique, des alcools (xylitol) et d'autres composés.

Malgré la différence qui a été enregistré parmi les composés des extraits de propolis, certains composés se sont révélés être communs. C'est le cas par exemple de : l'acide butanedioïque (acide succinique), l'acide cinnamique, l'acide benzoïque et le cinnamate et ses dérivés (Figure 4); qui étaient communs entre six des extraits à savoir : les extraits éthanolique et aqueux des régions de Babor, Sétif et Ain Abbassa. L'acide cinnamique et l'acide benzoïque sont présents dans l'extrait aqueux de Boutaleb, alors qu'ils sont absents de son extrait éthanolique (Tableau 6).

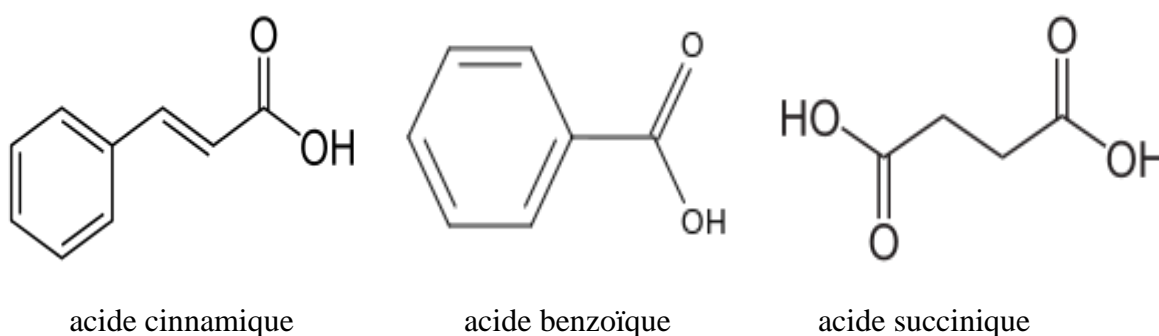


Figure 4 : Structure plane de l'acide cinnamique, l'acide benzoïque et de l'acide succinique (Pubchem, 2017).

Tableau 6 : Acides aromatiques des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo).

Composés	Zone du pic %							
	SE	BE	AbE	BoE	SA	BA	AbA	BoA
Acide cinnamique	1,31	0,90	-	-	-	0,67	-	0,42
Triméthyl-3-méthoxy-4-cinnamate	1,48	0,27	0,64	-	-	-	-	-
Triméthylcinnamate	-	2,98	1,91	-	21,75	1,24	7,17	-
Acide benzoïque	4,52	0,37	-	-	0,58	0,14	0,34	-
Acide 1,2-benzènedicarboxylique, ester diisooctylique	-	0,69	-	-	-	-	-	-
Acide cinnamique, ester 3,4-diméthylrique	-	-	0,47	-	-	-	-	-
Acide cinnamique, 4-méthoxy-3-ester	-	-	0,19	-	2,32	-	1,52	-
Acide benzoïque, ester 2-méthylrique	-	-	4,96	-	-	-	0,10	-
Acide 2,3,4-trihydroxybenzoïque	-	-	10,74	-	-	-	0,21	-
Acide benzènepropanoïque, triméthyl ...	-	-	-	0,33	-	-	-	-
Trimethyl 3,4-bis(trimethyloxy)cinnamate	-	-	-	-	-	60,27	-	-
Acide cinnamique, 3,4-diméthoxy-	-	-	-	-	1,39	-	-	-
Acide benzènepropanoïque	-	-	-	-	0,32	-	-	1,09
Acide benzoïque, 4-triméthyl	-	-	-	-	-	-	0,24	-
Acide 3-méthoxybenzoïque	-	-	-	-	-	-	-	0,71
Acide 3-chloro-2-fluorobenzoïque	-	-	-	-	-	-	-	0,52
Acide 4-hydroxymandélique	-	-	-	-	-	-	-	0,67
Acide 2,3,4-triméthoxymandélique	-	-	-	-	-	-	-	4,49

D'autre part, l'éther de glycérol (Figure 5) était commun entre les huit extraits.

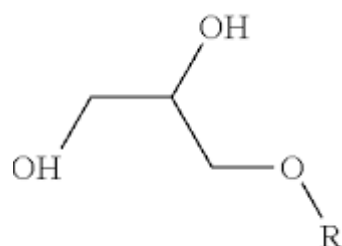


Figure 5 : L'éther de glycérol (Pubchem, 2017).

Les anthraquinones et ces dérivés (Figure 6) n'étaient fréquents qu'entre BE, SE AbE. Ils représentent **17,71%** (8,01 % de 1,6-Dihydroxy-3-methylantraquinone et 9,70 % de 1,3,8-Trihydroxy-6-methylantraquinone) dans SE, **9,14%** (1,29% de 1,6-Dihydroxy-8-methoxy-3-methylantraquinone et 7,85% de 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxyméthyl) anthraquinone) dans AbE et **3,48%** (1,4% de 1,6-Dihydroxy-3-methylantraquinone et 2,08% de 1,8-Dihydroxy-3-(hydroxyméthyl) anthraquinone) dans BE.

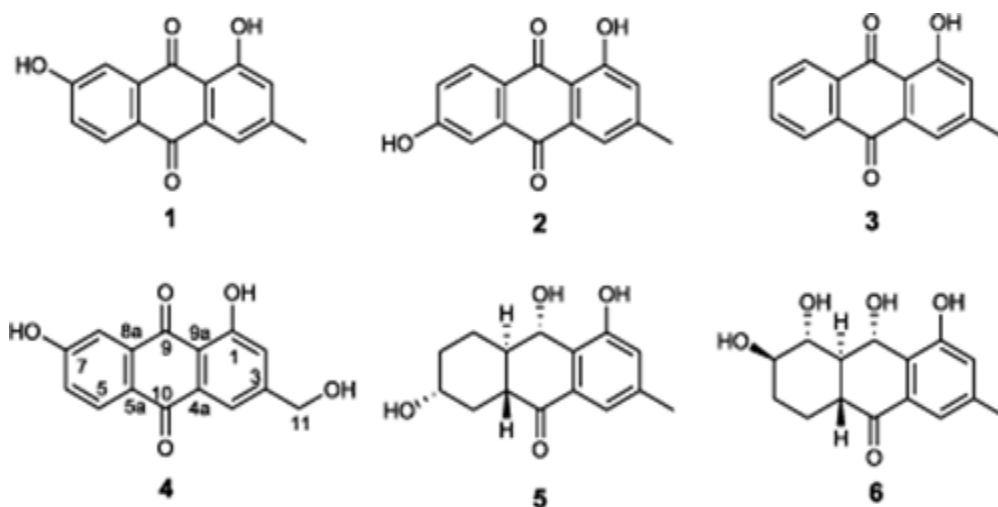


Figure 6: Dérivées d'anthraquinone, **1** (1,7-dihydroxy-3-méthyl-9,10-anthraquinone), **2** (Phomarin, 1,6-dihydroxy-3-méthyl-9,10-anthraquinone), **3** (Pachybasin, 1-hydroxy-3-méthyl-9,10-anthraquinone), **4** (1,7-dihydroxy-3-hydroxyméthyl-9,10-anthraquinone), **5** (Dendryol E), **6** (Dendryol F), (Warley de Souza and Mônica Tallarico, 2006).

Les alcaloïdes (Figure 7) représentent la valeur la plus élevée **19,65%** dans l'extrait BE (Tableau 7). Ils sont également représentés par **13,82%**, **7,16%**, **4,61%**, **4,59%**, **1,70%** et **1,45%** dans la composition des extraits AbE, SE, BoE, BoA, AbA et SA, respectivement. La valeur la plus faible des alcaloïdes représente **0,13%** dans l'extrait BA.

Tableau 7 : Les alcaloïdes représentants dans les différents extraits de la propolis.

Echantillon	Alcaloïdes en (%)
SE	Papaverine (4,52%); Aspidodispermine (2,45%); Demecolcine (0,19%).
BE	Acide pyrido [3', 4': 5,6] cyclohept [1,2-b] indol-5-carboxylique, 2-acétyl-1,2,3,4,4a, 5,6,11,12,12a - decahydro-12a-hydroxy-5-(hydroxyméthyle) -12-méthyle, γ -lactone, acétate (ester); 0.24% 1'H-Cholesta-3,5-diène [3,4-b] indole (18.97%); Pagicerine (0,24%); Demecolcine (0,20%).
AbE	Morpholine et ses dérivés (8,68%); Thébaïne et ses dérivés (5,14%)
BoE	Furo[3,2-c]quinoline,2,3-dihydro-2-hydroxyméthyl-4,8-diméthyl (0,74%); 3,4,5-Triphenylpyrazole (0.49%); Ester méthylique d'acide 2,4,6-trichloro-5-nitro-nicotinique (0.51%); 3-(4-Methoxyphenyl)benzo[f]quinazoline (0.50%); 2-p-Tolylisoindole-1,3-dione (2.37%).
BA	Isoquinoline,6,7,8-triméthoxy (0.13%).
SA	Thébaïne (0,49%); 2-(4-Methoxyphenyl)-4-[(2-propyn-1-yl)thio]quinazoline (0.96%).
AbA	Morpholine (1,53%); dérivé de nicotine (0,17%).
BoA	Dérivé de morpholine (0,81%); Isoquinoline, 1-butyl- (0.39%); Cinnoline, 4-ethyl-3-méthyl- (0.89%); 1-(3H-Imidazol-4-yl)-ethanone (0.64%); 3-Méthyl-1-phenyl-2-azafluorene (1.04%); 4-Aminobenzo[g] quinazoline (0.82%).

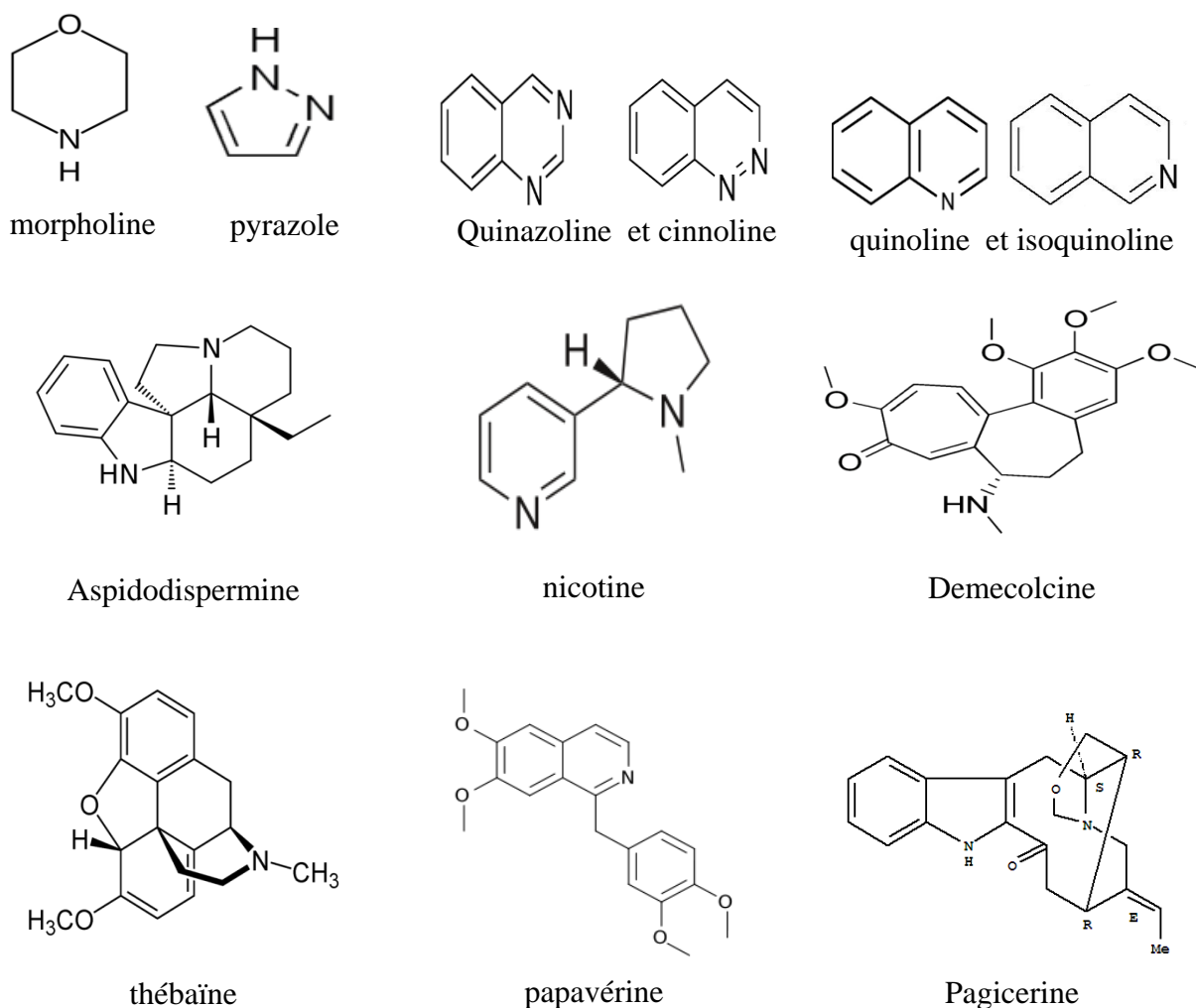


Figure 7 : Les alcaloïdes (Pubchem, 2017).

Les pourcentages de terpènes étaient variables entre les extraits BE, AbE, BoE, AbA et BoA. Dans le cas des diterpènes, les pourcentages étaient de **12,61%** dans l'extrait de BoE (4,69% d'acide pimarique, 4,65% d'acide abiétique, 2,80% d'acide déshydroabiétique et 0,47% d'acide hydroxydehydrostétique), **1,76%** dans l'acide AbE (1,09% et 0,37% d'acide déshydroabiétique) et seulement **0,79%** d'acide pimarique dans l'extrait de BoA.

Les sesquiterpènes étaient présents en petites quantités dans les extraits d'AbE, de BoE et de BoA (0,09% de bêta-guaiène, 0,83% de gamma-élémente et 0,39% de gamma-élémente, respectivement).

D'autre part, les acides gras saturés étaient communs seulement entre les extraits, AbE, BoE, SA et SE. Ils sont également représentés par **2,23%** (0,58% acide hexadécanoïque, 1,06% acide oléique et 0,59% acide hexadécadiénoïque), **1,67%** (0,44% Oléate d'éthyle et 1,23% acide 11-cis-octadécénoïque) et **1,02%** (0,77% acide hexadécanoïque et 0,25%

acide octadécanoïque) et 0,82% (acide oléique), respectivement.

D'autres composés étaient spécifiques à l'extrait:

Lanostan-3-one, 11 β , 18-époxy- et Pregn-4-en-3-one, 17-hydroxy-, (17 α) (5,36% - triterpène et 6,07% -stéroïde, respectivement) et de 2'-O-méthylcajanone (0,05% - isoflavonoïde) dans **BE** (Figure 8),

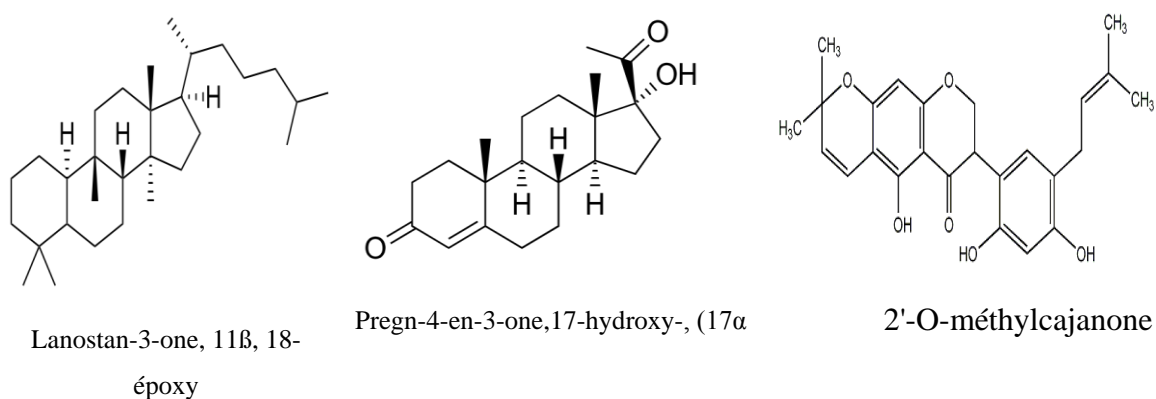


Figure 8 : Structure des composés spécifiques dans BE (Pubchem, 2017).

Podofilox (2,60% - médicament), 8H-Dinaphtho [2,3-c: 2', 3'-h] Phénothiazine (0,54% - hydrocarbure aromatique polycyclique), 1- (phénylthioxométhyl) -2,5- pyrrolidinedione (2,91% - pyrrolidones), Nifénazone (0,93% - médicament), Brallobarbital et cyclobarbital (0,85% et 0,48% dérivé de barbituriques) dans **SE** (Figure 9),

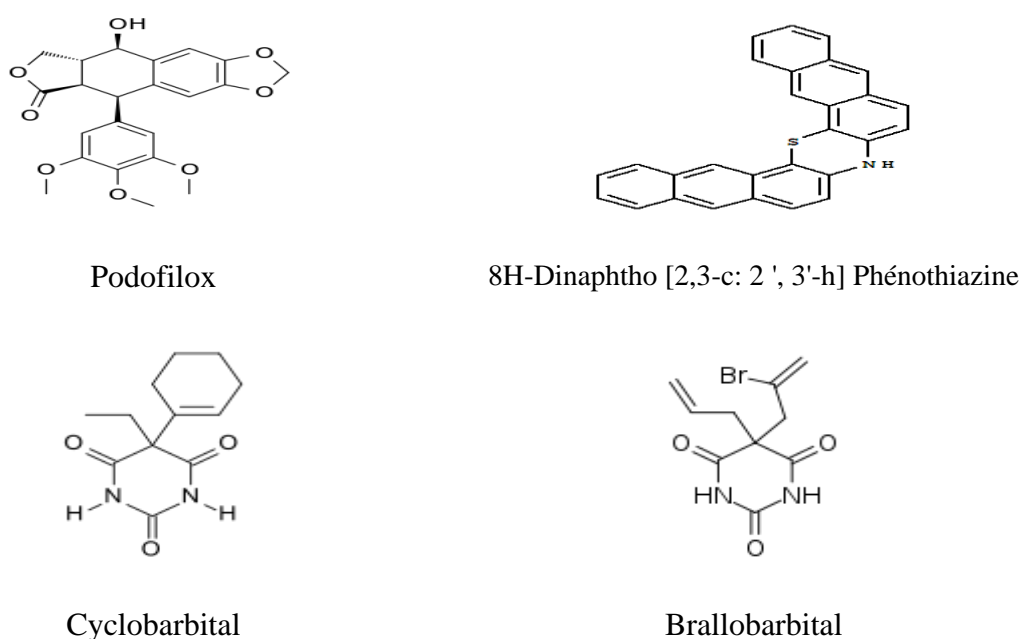
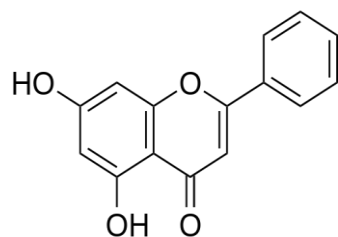
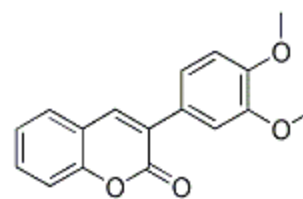


Figure 9 : Structure des composés spécifiques dans SE (Pubchem, 2017).

La Chrysrine (8,76% -Flavanoïde) et la Coumarine, le 3- (3,4-diméthoxyphényl) -6-nitro (1,40% - aromatisant aromatique) dans **AbE** (Figure10),



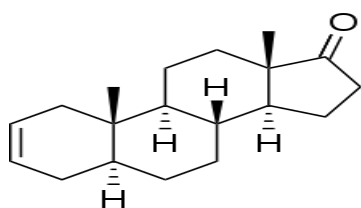
Chrysrine



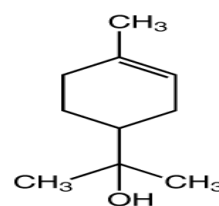
Coumarine, le 3- (3,4-diméthoxyphényl) -6-nitro

Figure 10 : Structure des composés spécifiques dans AbE (Pubchem, 2017).

Androst-5-en-17-one (0,38%- steroïde) et 3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha (0,12% - α -terpeneol) dans **BoE** (Figure 11),



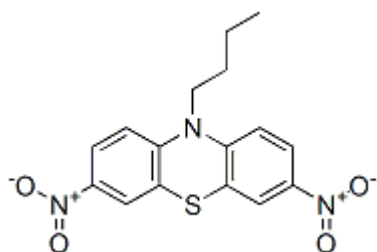
Androst-5-en-17-one



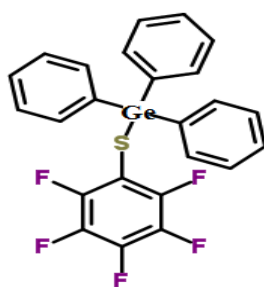
3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha

Figure 11 : Structure des composés spécifiques dans BoE (Pubchem, 2017).

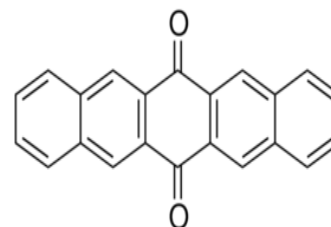
10H-Phénothiazine, 10-butyl-3,7- Dinitro; Germane [(pentafluorophényl) thio] triphényle et 6,13-pentacenedione (0,19%; 0,47% et 7,91% respectivement- composés hétérocycliques) dans **BA** (Figure 12),



10H-Phénothiazine, 10-butyl-3,7-Dinitro



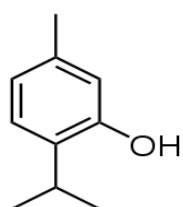
Germane [(pentafluorophényl) thio] triphényle



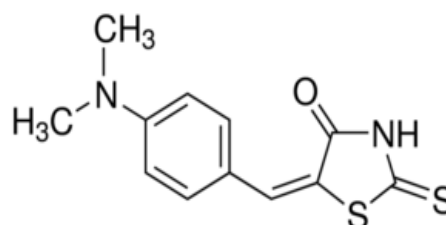
6,13-pentacenedione

Figure 12 : Structure des composés spécifiques dans BA (Pubchem, 2017).

Le thymol (0,32% - monoterpène phénol) et 5- (4-diéthylaminobenzylidène) rhodanine (0,10% - composé organique hétérocyclique) dans **AbA** (Figure 13),



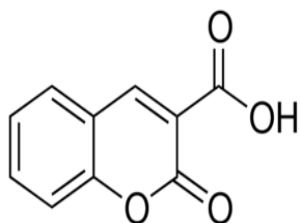
thymol



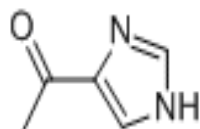
5- (4-diéthylaminobenzylidène) rhodanine

Figure 13 : Structure des composés spécifiques dans AbA (Pubchem, 2017).

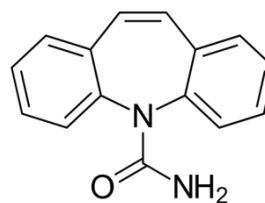
L'ester 8-allyl-, cyclohexylique de l'acide coumarine-3-carboxylique (0,67% - aromatisant aromatique); 1- (3H-imidazol-4-yl) -éthanone et La carbamazépine (0,64% et 0,75% - composé organique hétérocyclique) ; Méthylène Bis Aspidinol (0,73% - Hydroxy-cétones aromatiques) dans **BoA** (Figure 14).



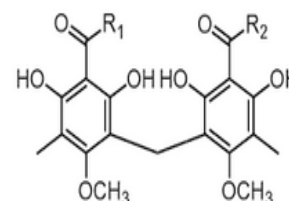
acide coumarine-3-carboxylique



1- (3H-imidazol-4-yl) -éthanone



carbamazépine



Méthylène Bis Aspidinol

Figure 14 : Structure des composés spécifiques dans BoA (Pubchem, 2017).

Les principaux flavonoïdes détectés à partir d'extraits dans notre étude étaient: 2-O-Methylcajanone et chrysin. Ainsi, nous observons certaines similitudes dans la composition qualitative entre la propolis algérienne, malte, grec et turque (Velikova *et al.*, 2000; Silici *et al.*, 2007; Popova *et al.*, 2010a; Duran *et al.*, 2011; Celemlil *et al.*, 2013; Piccinelli *et al.*, 2013) et les composés phénoliques étaient similaires à ceux identifiés dans les propolis des pays américains (Bankova *et al.*, 2000; Seidel *et al.*, 2008; Falcao *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012) et la région méditerranéenne (Abd El Hady *et Hegazi*, 2002; Lahouel *et al.*, 2010).

La composition chimique de la propolis dépend des caractéristiques phytogéographiques du site de collecte, puisque les abeilles choisissent différentes plantes comme source de propolis dans différents habitats (Popova *et al.*, 2010a). Cet aspect, fait que la normalisation de la propolis est difficile car différents solvants (éthanol, méthanol et eau) peuvent extraire différents composés, influençant ainsi son activité (Cunha *et al.*, 2004). Ainsi, une normalisation universelle serait impossible, et Bankova (2005a) a proposé que les propriétés biologiques de la propolis soient liées à une étude détaillée de sa composition chimique et de ses sources botaniques.

En général, les abeilles choisissent des matières végétales résineuses collantes pour être utilisées comme propolis en raison de leurs propriétés physiques qui lui confère. D'autre part, ce matériau est également leur défense chimique contre les micro-organismes (Ghisalberti, 1979; Bankova, 2005b).

Un grand nombre de documents traitant des différents aspects des propriétés biologiques de propolis ont été publiés au cours des dernières décennies. Cependant, une partie considérable d'entre eux sont d'une utilité limitée, bien qu'ils déclarent une activité «forte», «remarquable» ou «significative». La raison en est le manque de base pour la comparaison et l'évaluation scientifique des résultats, car ils ne se réfèrent pas à la nature chimique des échantillons de propolis étudiés. Ces études indiquent seulement que les tests ont été effectués avec des extraits de propolis (Sforcin *et* Bankova, 2011).

Dans la présente étude les quatre échantillons de propolis brute Algérienne ont été récoltés dans différentes régions géographiques de la wilaya de Sétif dont la propolis de Babor provient de la forêt de Babor qui constitue un véritable foyer de biodiversité bien conservé, c'est le lieu de l'endémisme faunistique et floristique comme le cèdre de l'atlas (*Cedrus atlantica*), le peuplier de tremble (*Populus termula*), le sapin de Numidie (*Abies numidica*), et la Cîtelle de kabylie (*Sitta ledanti* vielliard). Trois espèces principales dominant dans la forêt de Boutaleb, le pin d'Alep, le chêne vert et le cèdre de l'atlas. Et La région de Sétif renferme deux espèces dominantes, le chêne vert qui se présente essentiellement sous forme de matorral, et le pin d'Alep qui se manifeste sous forme de forêt (Zerroug, 2012). Le paysage actuel de la commune d'Ain Abassa se particularise par l'absence de strate arborescente naturelle. Les strates présentes sont : la strate arbustive buissonnante, la strate herbacée et la strate muscinale. A Ain Abassa, les plantes mellifères appartiennent à diverses familles botaniques, les plus importantes de point de vue nombre sont les Lamiaceae, les Fabaceae, les Scrofulariaceae et les Orchidaceae (Boulaaccheb, 2009).

Par exemple, dans la zone tempérée nordique, la propolis provient principalement des bourgeons d'aulnes, de hêtres, de bouleaux, de conifères, de châtaignes et d'ormes (Ghisalberti, 1979). Ces arbres fournissent des flavonoïdes, des phénols, des acides et des esters dans les propolis. En Amérique du Sud, cependant, les sources de propolis contiennent des acides coumaniques et des alcools diterpéniques. Mais, quelle que soit la source et les produits chimiques de base, l'action de la propolis dans la ruche est similaire. Un regard plus attentif sur les actions de certains des produits chimiques présents dans la propolis contribue à expliquer leur utilité dans la ruche (Schnaubelt, 1995).

II.2.2.2. Teneur en polyphénols totaux

Pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits, la courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes de chaque extrait ont été rapportées en équivalents gramme d'acide gallique et déterminé par l'équation: $y = 0,008x + 0,07$ sachant que $R^2 = 0,998$ (Figure 15).

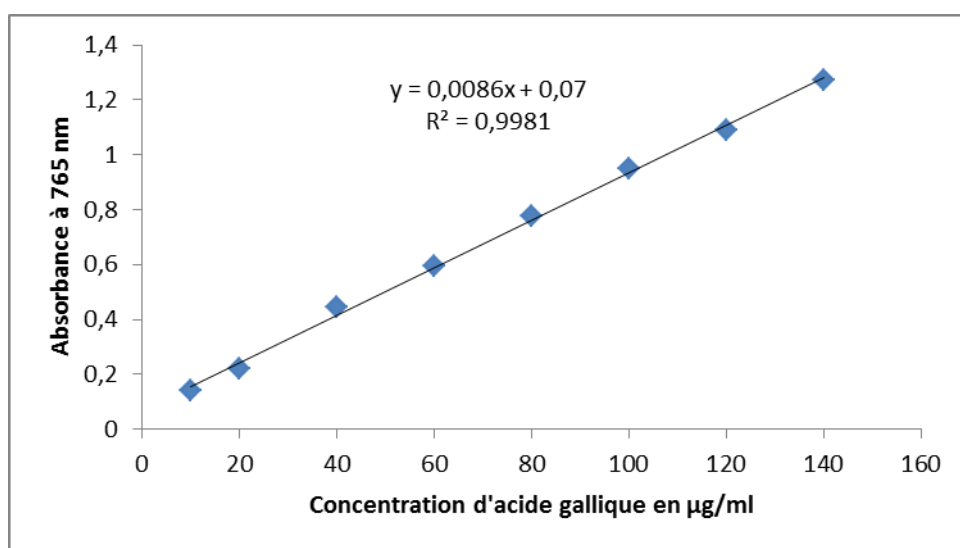


Figure 15 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux dans les échantillons de propolis analysés sont présentés dans le Tableau 8. Les valeurs de la concentration et de l'écart type correspondant sont exprimées en mg d'équivalent d'acide Gallique par gramme de propolis brute (mg EAG/g M brute).

Tableau 8: Teneur en polyphénols des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor (B), Sétif (S), Ain-Abbassa (Ab) et Boutaleb (Bo).

Echantillon	quantité de polyphénols en mg/g de propolis
SE	510,166 ± 0,061
BE	600 ± 0,017
AbE	384,5 ± 0,019
BoE	215 ± 0,030
SA	221 ± 0,001
BA	542,333 ± 0,018
AbA	96,833 ± 0,027
BoA	122,583 ± 0,013

Compte tenu des résultats obtenus, nous remarquons que la teneur en polyphénols totaux est différente d'un échantillon à un autre. L'extrait éthanolique de la propolis de Babor présente la valeur la plus élevée qui est de 600 ($\pm 0,017$) mg EAG/g de propolis, par contre l'extrait aqueux de la propolis d'Ain Abbassa présente la valeur la plus faible 96,833 ($\pm 0,027$) mg EAG/g. Les autres échantillons présentent des valeurs moyennes variant entre 122,583 ($\pm 0,013$) et 542,333 ($\pm 0,018$) mg EAG/g de propolis.

Nous remarquons aussi que les teneurs en polyphénols totaux des extraits aqueux sont relativement faibles par rapport aux extraits éthanoliques (Figure 16), sauf l'extrait aqueux de Babor (BA) ayant une teneur en polyphénols totaux plus élevée que celle des autres extraits aqueux (SA, AbA, BoA). Cette teneur est plus élevée que celle des extraits éthanoliques de la propolis d'Ain Abbassa et Boutaleb. Il paraît clairement que l'éthanol est le solvant qui permet d'avoir un rendement en polyphénols totaux plus élevé.

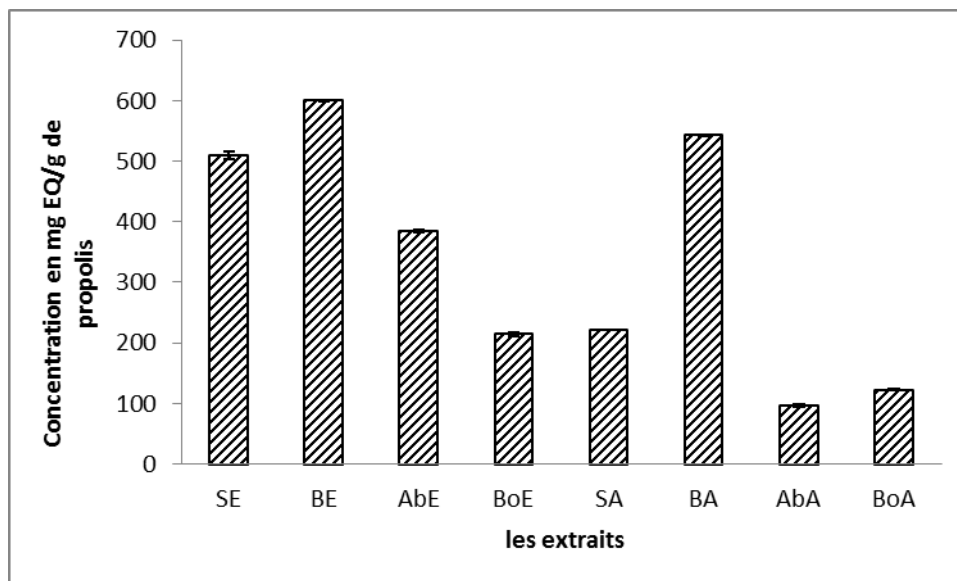


Figure 16: Teneurs en polyphénols des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N = 3).

Les investigations faites sur la détermination de la teneur en polyphénols totaux de la propolis d'abeille sont nombreuses, et les résultats sont différents d'une étude à l'autre, on peut citer quelques-unes :

La teneur en polyphénols totaux de la propolis brésilienne est de l'ordre de 232 (\pm 22.3) mg EAG/g (Alencar *et al.*, 2007). Cette valeur est en accord avec celle trouvée avec la propolis de Sétif.

L'étude réalisée sur la propolis du Portugal, montre des teneurs en polyphénols totaux oscillant entre 151,00 (\pm 0,01) et 329,00 (\pm 0,01) mg EAG/g de propolis respectivement pour la région de Fundao et Borne (Leandro *et al.*, 2008).

Les travaux réalisés sur la propolis iranienne (Mohammadzadeh *et al.*, 2007), ont rapporté des teneurs en composés phénoliques de l'ordre de 8,46% (\pm 0,03); 7,11% (\pm 0,19) et 3,08% (\pm 0,02) de propolis brute respectivement pour Teheran, Isfahane et Khorasan. Ces valeurs sont inférieures à celles trouvés dans la présente étude, tandis que d'autres études ont eu des résultats comparables aux nôtres. Une étude réalisée sur la propolis de chine indique que les valeurs en composés phénoliques oscillent entre 85 (\pm 2) et 228 (\pm 8) mg/g de propolis (Ahn *et al.*, 2007).

II.2.2.3. Teneurs en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière fraîche (mg EQ/g de propolis). Les taux des flavonoïdes des extraits aqueux de la propolis ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 17) qui suit une équation de type : $y = 0,028x + 0,010$ sachant que $R^2 = 0,998$.

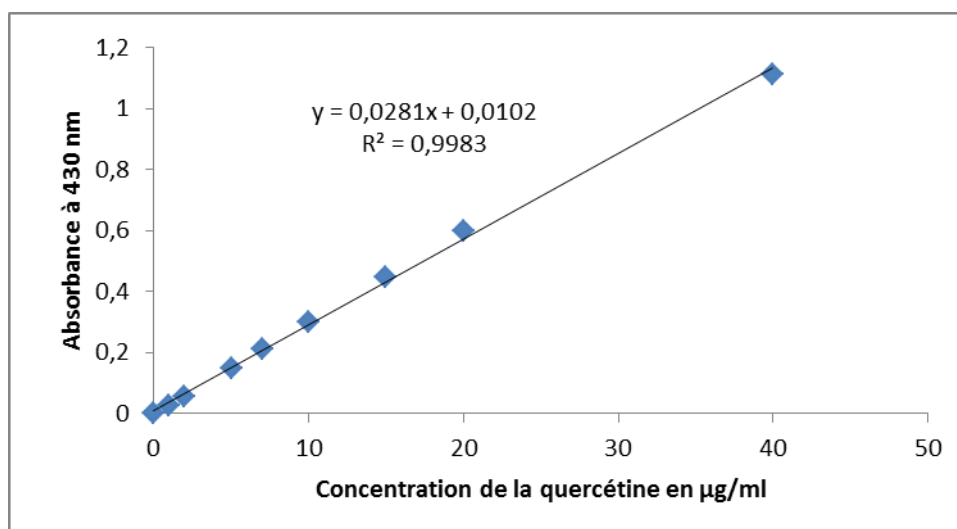


Figure 17: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

La teneur en flavonoïdes des différents échantillons de propolis sont reportées dans le Tableau 9. Les quantités les plus élevées en flavonoïdes sont repérées chez les échantillons éthanolique de Sétif ($132,952 \pm 0,016$ mg EQ/g de propolis) suivi de celle d'Ain abbassa ($130,761 \pm 0,01$ mg EQ/g de propolis). Les teneurs les plus faibles sont celles des extraits aqueux. Les autres échantillons de Babor et Boutaleb ont présentés des valeurs moyennes allant de $61,6190 \pm 0,0135$ à $111 \pm 0,007$ mg EQ/g de propolis. Ces résultats sont différents d'un échantillon à un autre, ce qui signifie que la détermination de la teneur en flavonoïdes peut être utilisée comme un indice de provenance de la propolis.

Tableau 9: La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis.

Echantillon	quantité de flavonoïdes en mg/g de propolis
SE	132,952 ± 0,016
BE	111 ± 0,007
AbE	130,761 ± 0.01
BoE	61,6190 ± 0,0135
BA	4,047 ± 0,0005
SA	3,047 ± 0,004
AbA	5,273 ± 0,013
BoA	11,440 ± 0,006

En comparant les résultats de la même région. On peut déduire que la teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques présente des valeurs importantes en flavonoïdes, par contre la teneur en flavonoïdes des extraits aqueux présente une valeur très faible (Figure 18).

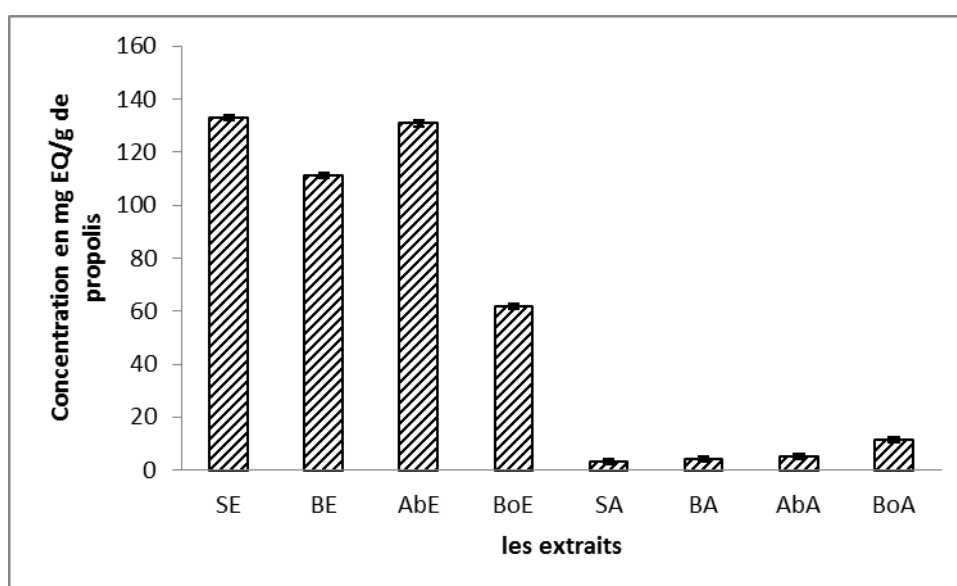


Figure 18 : Teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques : Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA). Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais ± SD (N = 3).

La teneur en flavonoïdes totale décelée dans les extraits éthanoliques de la propolis iranienne, était de 77,9 (± 0,39), 31,1 (± 0.08) et 12,2 (± 0,33) mg EQ/mg de propolis

respectivement pour les échantillons de Teheran, Isfahane et Khorsan (Mohammadzadeh *et al.*, 2007).

Le travail réalisé sur l'échantillon éthanolique provenant du Brésil indique une teneur en flavonoïdes de l'ordre de $43(\pm 0,1)$ mg EQ/g de propolis brute (Alencar *et al.*, 2007).

La teneur en flavonoïdes totale de la propolis de Chine varie de $8,3 (\pm 3,7)$ à $188 (\pm 6,6)$ mg EQ/g de propolis brute (Ahn *et al.*, 2007).

L'étude réalisée par (Kamazawa *et al.*, 2004b), confirme que la teneur en flavonoïdes dépend de la région botanique (Tableau 10), dévoilant ainsi que la quantification des flavonoïdes peut être très utile pour différencier entre les échantillons de propolis. Ces résultats sont comparables aux nôtres. Ceux de la Thaïlande ($2,5 \pm 0,8$ mg EQ/g de propolis) avec SA ($3,047 \pm 0,004$ mg EQ/g de propolis), de l'Ukraine ($63,7 \pm 3,2$ mg EQ/g de propolis) avec BoE ($61,6190 \pm 0,0135$ mg EQ/g de propolis), du Chili ($116 \pm 9,3$ mg EQ/g de propolis) avec BE ($111 \pm 0,007$ mg EQ/g de propolis) et les valeurs d'échantillons de Sétif ($132,952 \pm 0,016$ mg EQ/g de propolis) suivi de celle de Ain Abbassa ($130,761 \pm 0,01$ mg EQ/g de propolis) sont similaires à celles trouvés pour la propolis d'une région d'Argentine ($130 \pm 5,5$ mg EQ/g de propolis).

Ces résultats ont été approuvés lors d'une autre étude réalisée sur la propolis de la Kerrie, qui montre une teneur en flavonoïdes totale allant de 16–136 mg EQ /g de propolis (Katalinic *et al.*, 2006).

Tableau 10: Influence de la région sur la teneur en flavonoïdes de la propolis d'abeille d'après (Kamazawa *et al.*, 2004).

Provenance	Flavonoïdes (mg EQ /g propolis)	Provenance	flavonoïdes (mg EQ /g propolis)
Argentine	$130 (\pm 5,5)$	New Zélande	$152 (\pm 12,6)$
Australie	$145 (\pm 6,5)$	Afrique du sud	$50,8 (\pm 0,8)$
Brésil	$51,9 (\pm 2,4)$	Thaïlande	$2,5 (\pm 0,8)$
Bulgarie	$157 (\pm 8,9)$	Ukraine	$63,7 (\pm 3,2)$
Chilie	$116 (\pm 9,3)$	Uruguay	$168 (\pm 6,4)$
Chine	$147 (\pm 9,3)$	USA	$122 (\pm 6,2)$
Hongrie	$176 (\pm 1,7)$	Ouzbékistan	$94,2 (\pm 6,8)$

Chapitre III :
Etude de l'activité biologique de la
propolis

III.1. Matériel et méthodes

Matériels utilisés

Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des extraits de la propolis a été testée contre:

Shewanella putrefaciens Pdp11, *Photobacterium damsela* subsp. piscicida SK 223/04 (CECT 7198), *Vibrio harveyi* Lg 16/00. Les souches ont été enfilées par le docteur MA Moriñigo de l'Université de Málaga (Espagne)

Animaux

Dix-huit spécimens de poissons, douze *Sparus aurata* (dorade) et six *Dicentrarchus labrax* (bar), provenant d'une ferme locale de l'Instituto Español de Oceanografía (Mazarrón, Espagne), ont été conservés dans des aquariums d'eau de mer agitée (débit 1500 Lh⁻¹) à 28 ‰ de salinité, 20°C, 12 h de lumière et 12 h de photopériode sombre. Les poissons ont été nourris avec des pastilles commerciales (Skretting) à raison de 1% en poids par jour. Ils ont été acclimatés pendant 15 jours avant les expériences. Le Comité de Bioéthique de l'Université de Murcie a approuvé les études décrites.

Milieux de culture

Deux milieux de cultures ont été utilisés, RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) et HBSS (Hanks' Balanced Salts)

sRPMI : [RPMI-1640 additionné de chlorure de sodium à 0,35% (pour ajuster l'osmolarité du milieu à l'osmolarité plasmatique de dorade de 353,33 mOs), 2% sérum de veau foetal (FCS, Gibco), 100 IU mL⁻¹ de pénicilline (Flow) et 100 µg mL⁻¹ de streptomycine (Flow)]

sHBSS : [HBSS contenant 1 µg mL⁻¹ d'acétate de myristate de phorbol (PMA, Sigma) et de luminol 10⁻⁴ M (Sigma)]

Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés pour les différentes analyses traitées dans ce chapitre sont résumés dans ce qui suit : 1, 1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), β-carotène, l'acide linoléique, l'hydroxytoluène butylé (BHT), Tween 40, rutine, quercétine, acide galique, chloroforme, méthanol, diméthyl-sulfoxyde (DMSO), MS222 (Tricaine Methanesulfonate, Sandoz), chlorure de sodium, Iodure de propidium (PI), Tetra Methyl Benzyl (TMB), bromure de cétyle triméthyle ammonium (CTAB) ont été achetés auprès de Sigma, les autres réactifs étant de qualité analytique.

III.1.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits aqueux et éthanolique de la propolis est évaluée par deux méthodes : test au DPPH et le test de blanchissement du β -carotène.

III.1.1.1. Test au DPPH

Principe

Le 1, 1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est défini comme radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible qui provoque la couleur violette profonde, caractérisée par une absorption (517 nm). Il réagit avec des groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques, etc... Cette propriété est largement recommandée et utilisé dans la pratique analytique. Quand la solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (1,1-diphényl-2-(2,4,6- trinitrophenyl) hydrazine (DPPH₂, figure 19) avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle résiduelle due à la présence de groupement picryl selon la réaction suivante (Molyneux, 2004) .

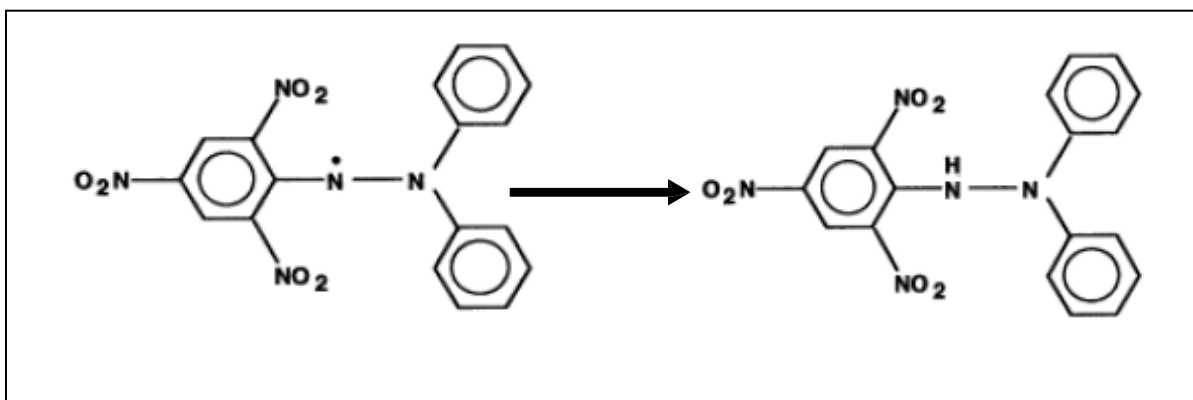


Figure 19 : Réduction du radical libre DPPH* en DPPH (Molyneux, 2004).

Mode opératoire

Une solution méthanolique de 0,004% de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits de propolis. A cet effet, 50 μ L de chaque dilution de ces extraits sont mis dans un tube à essai, et additionnés de 1,25 mL de solution méthanolique de DPPH. Après une incubation de 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc qui contient du méthanol pur (Boumerfeg *et al.*, 2009). L'opération est répétée en remplaçant l'extrait de propolis par le témoin positif

(BHT). Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition de celui-ci selon la relation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = \frac{(\text{Abs control} - \text{Abs extrait})}{\text{Abs control}} \times 100$$

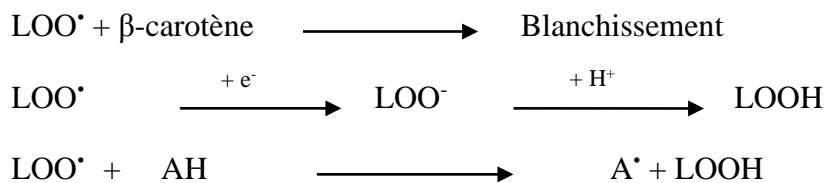
Où Abs : absorbance.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI_{50} , sachant que l' CI_{50} est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH \cdot .

III.1.1.2. Test de blanchissement du β -carotène

Principe

L'activité antioxydante des extraits de propolis est mesurée selon la méthode d'Aslan *et al.* (2006). L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Tepe *et al.*, 2006).



Où :

LOO \cdot : les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique

AH : un antioxydant

Mode opératoire

Du β -carotène est dissout à raison de 0,5 mg dans 1mL de chloroforme. La solution obtenue est introduite dans un ballon contenant 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation du chloroforme, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés sous agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2,5 mL sont transférés dans des tubes aux quels sont additionnés 350 μ L de chaque extrait de propolis (2 mg/mL). Un tube contenant 2,5 mL d'émulsion et 350 μ L de méthanol ou d'eau distillée servira de témoin négatif. Alors qu'un tube contenant 2,5 mL d'émulsion et 350 μ L de BHT servira de témoin positif. Le blanc est représenté par 350 μ L de chaque extrait auquel on ajoute 2,5 mL d'eau distillée. L'absorbance est immédiatement mesurée à 790 nm, d'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (0, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h et 48h), (Aslan *et al.*, 2006). L'activité antioxydante relative après 24 heures est calculée selon la relation suivante :

$$\text{AAR} = (\text{Abs}_{\text{Echantillon}} / \text{Abs}_{\text{BHT}}) \times 100$$

Où :

AAR : activité antioxydante relative.

Abs_{Echantillon} : absorbance de l'échantillon après 24 heures.

Abs_{BHT} : absorbance du BHT après 24 heures.

III.1.2. Activité anti bactérienne des extraits de propolis

Deux bactéries marines pathogènes *Vibrio harveyi* et *Photobacterium damsela*, et une bactérie non pathogène *Shewanella putrefaciens* ont été utilisées pour déterminer l'activité bactéricide présente dans les extraits de propolis. Les bactéries ont été cultivées sur de la gélose tryptique de soja (TSA) à 25 °C. Ensuite, des colonies de 18h de 1 à 2 mm ont été diluées dans 5 mL de milieu de culture liquide (TSB) et cultivées pendant 16 h à 25 °C. L'activité antimicrobienne des extraits de propolis a été déterminée en évaluant leurs effets sur les courbes de croissance bactérienne en utilisant la méthode de Sunyer *et Tort* (1995) avec quelques modifications. Des aliquotes de 10 μ L de chacune des dilutions bactériennes (1/10) ont été placées dans des plaques à 96 puits à fond plat (Nunc) et incubées avec des volumes égaux des extraits de propolis (concentration finale 500 μ g/mL) pendant deux heures. La DO des échantillons a été mesuré à 620 nm (BMG, Star Galaxy Fluoro) à des intervalles de 30 minutes pendant 24 h à 25 °C. Des échantillons sans bactéries ont été utilisés comme blancs (témoin négatif). Des échantillons sans extraits de propolis ont été utilisés comme témoins positifs.

III.1.3. Effets *in vitro* des extraits de la propolis sur les réponses immunitaires innées de la dorade

III.1.3.1. Préparations des solutions des extraits et mesure de l'Osmolalité

Pour préparer une solution mère de chaque extrait de propolis, 200 mg de propolis est dissout dans 1 mL de DMSO (100%). Par addition du milieu de culture RPMI-1640, des dilutions en série sont effectuées pour avoir des concentrations finales de 1; 100 et 200 µg/mL pour chaque extrait de propolis (dans tous les cas le DMSO était inférieur à 0,1%), (Fron-Herrera *et al.*, 2013). L'osmolalité du milieu de culture et de chaque concentration de chaque extrait de propolis est mesurée par un Osmomètre à tension de vapeur (Vapro® Modèle 5600).

III.1.3.2. Conception expérimentale et échantillonnage

Pour l'étude *in vitro*, les poissons ont été anesthésiés avec 100 mg/L MS222 (Tricaine Methanesulfonate, Sandoz). Après le saignement, des leucocytes sont prélevés de la partie céphalique du rein de poissons (Head kidney ou HK) dans des conditions stériles. La partie céphalique du rein est ensuite coupée en petits fragments et transférée dans 8 ml de sRPMI [milieu de culture RPMI-1640 additionné de chlorure de sodium à 0,35% (Esteban *et al.*, 1998). Des suspensions cellulaires ont été obtenues en forçant des fragments de l'organe à travers une maille de nylon (maille de 100 µm), lavées deux fois avec le milieu de culture (400 g, 10 minutes), comptées et ajustées à 2×10^7 cellules mL⁻¹ dans sRPMI.

Les leucocytes isolés ont été incubés seuls (témoin) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis. Pour cela, des aliquotes de leucocytes ont été distribués dans des plaques de micro titrage à 96 puits à fond plat (Nunc) et incubés avec des extraits de propolis (100 et 200 µg/mL) pendant 30 minutes à 22 °C, avec 85% d'humidité relative et dans une atmosphère à 5% de CO₂.

III.1.3.3. Effet des extraits de propolis sur la viabilité des leucocytes

Pour déterminer si les extraits de propolis affectaient la viabilité des leucocytes prélevés des HK de *S. aurata* et *D. labrax*, les leucocytes sont incubés avec différentes concentrations d'extraits de propolis dans des tubes de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson). Ensuite, 40 µL d'iodure de propidium (PI) (400 µg mL/L, Sigma) sont rajoutés à chaque échantillon. Les tubes ont été mélangés doucement avant analyse dans un cytomètre à flux FAC Scan (Becton Dickinson) avec un laser à argon ajusté à 488 nm. Les analyses ont été effectuées sur 5 000 cellules. Les données ont été recueillies sous forme de diagrammes à deux paramètres

(granularité) (SSC) et de dispersion directe (taille) (FSC). Des diagrammes à points ou histogrammes à fluorescence rouge (FL2) ont alors été réalisés sur un système informatisé. Les cellules mortes ont été estimées comme le pourcentage de cellules avec de l'iodure de propidium (cellules fluorescentes PI-rouge).

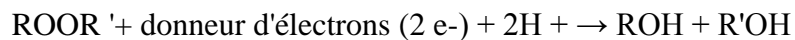
Marquage au PI (Iodure de Propidium)

Le PI est un marqueur d'acide nucléique de nature hydrophobe. Normalement, il pénètre à l'intérieur des cellules uniquement lorsque les membranes ont été fragilisées (cellule mortes, ou en apoptose, ou membranes perméabilisées artificiellement). Cette pénétration s'accompagne d'une Fluorescence rouge mesurée à 617 nm (Lecoeur, 2002).

III.1.3.4. Burst Respiratoire et Activité de la peroxydase leucocytaire

Principe

Les peroxydases représentent une grande famille d'enzymes retrouvées chez les animaux (myéloperoxydase), les plantes, les champignons et les bactéries telles que : la peroxydase du type cytochrome-C ou encore la peroxydase de raifort ("horse radish peroxidase", HRP). Ces enzymes catalysent les réactions d'oxydoréduction suivantes:



Pour de nombreuses peroxydases, le substrat optimal est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cependant, certaines sont plus actives avec les hydro peroxydes organiques tels que les peroxydes lipidiques. En effet, dans la cellule les peroxydases neutralisent les radicaux hydroxydes toxiques qui sont des sous-produits formés pendant la respiration aérobie. La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme peroxydase qui, est plus abondamment exprimée dans les granulocytes neutrophiles. Il s'agit d'une protéine lysosomale stockée dans des granules azurophiles du neutrophile. La protéine MPO de 150 kDa est un dimère constitué de deux chaînes légères de 15 kDa et de deux chaînes lourdes glycosylées à poids variable liées à un groupe hématique prosthétique. MPO produit de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'anion chlorure (Cl⁻) pendant l'hyperactivité du burst Respiratoire des neutrophiles (Figure 20), (Bayne *et* Levy, 1991).

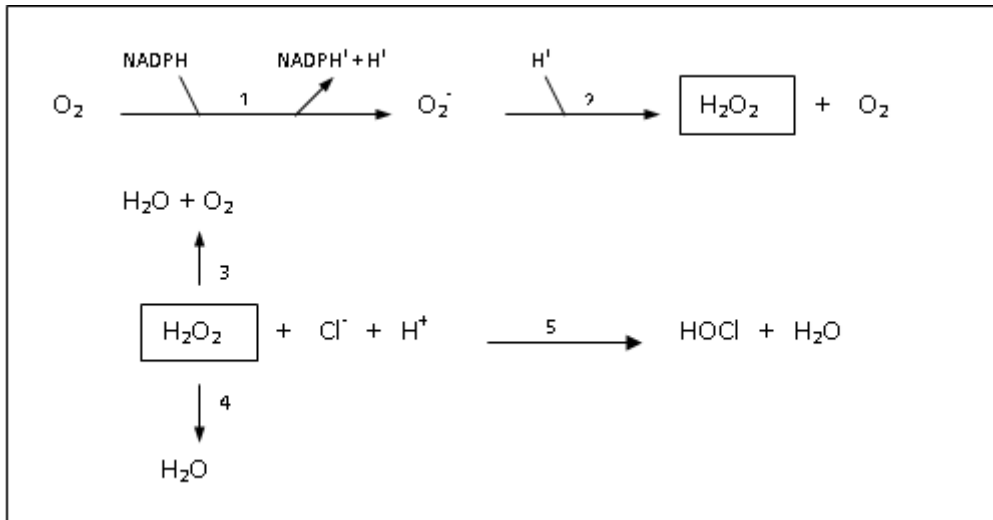


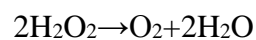
Figure 20 : Réactions oxydatives du burst respiratoire des phagocytes téléostéens. Les chiffres correspondent aux enzymes suivantes: **1**, la NADPH oxydase; **2**, le superoxyde dismutase; **3**, la catalase; **4**, de la peroxydase; **5**, la myéloperoxydase (Bayne *et* Levy, 1991).

III.1.3.4.1. Burst Respiratoire

Principe

Le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) est un stimulant d'origine chimique qui peut activer la protéine kinase C de façon spécifique en se fixant sur le site de reconnaissance du diacylglycérol ; il déclenche alors une activité respiratoire importante et durable chez le granulocyte neutrophile (Gschwendt *et al.*, 1991).

Un oxydant est nécessaire afin de provoquer la luminescence du luminol. Habituellement, une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et un sel hydroxyde aqueux sont utilisés comme activateurs. En présence d'un catalyseur - comme un composé ferreux - le peroxyde d'hydrogène est décomposé en eau et en dioxygène :



Les enzymes de beaucoup de systèmes biologiques sont également susceptibles de catalyser la décomposition de peroxyde d'hydrogène (Dominique *et* Larpent, 1993).

Lorsque le luminol réagit avec le sel hydroxyde (Figure 21), un dianion se forme. L'oxygène issu de la décomposition du peroxyde d'hydrogène réagit alors avec ce dianion. Le produit de cette réaction, un peroxyde organique, très instable se décompose immédiatement avec une perte d'azote pour produire de l'acide 3-aminophtalique possédant des électrons dans

un état excité. La désexcitation des électrons provoque l'émission d'énergie sous forme d'un photon de lumière bleue visible (Clark, 1937).

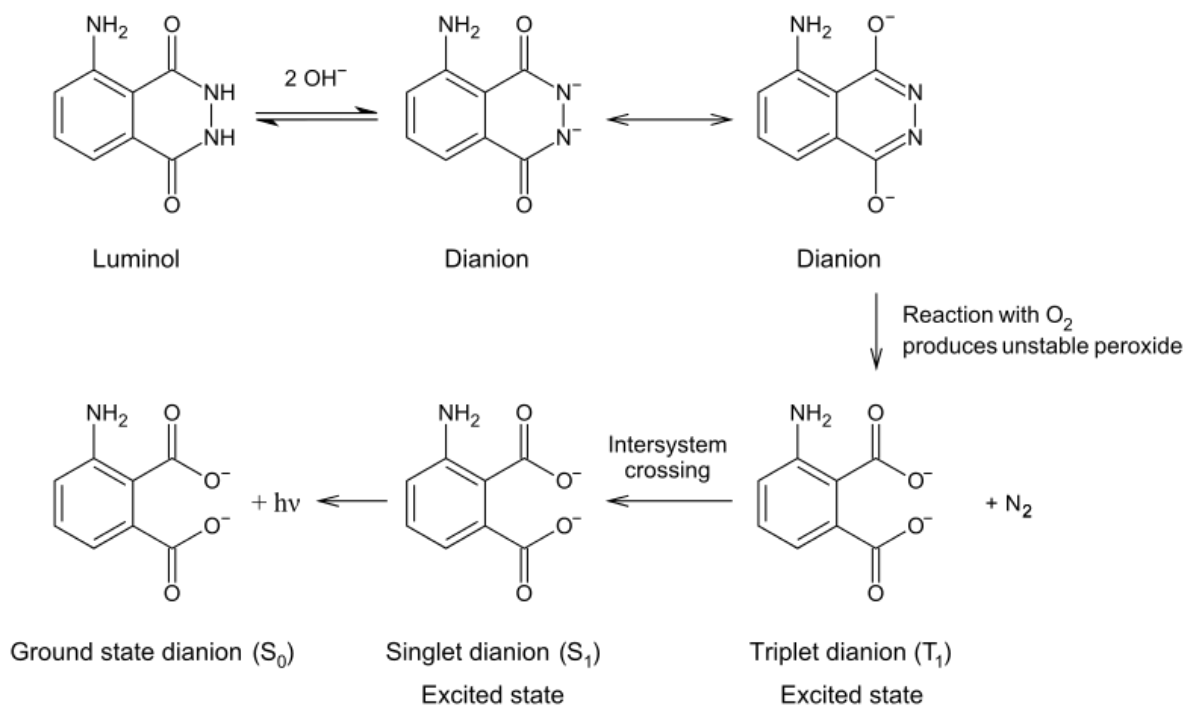


Figure 21 : Mécanisme de chimiluminescence du Luminol (Clark, 1937).

Mode opératoire

L'évaluation du Burst Respiratoire des extraits de propolis a été effectuée en mesurant l'activité respiratoire des leucocytes HK de la dorade par une méthode de chimio luminescence (Bayne et Levy, 1991). Pour ce fait, 50 μ L de sHBSS ont été ajoutés à chaque échantillon de leucocytes HK (préalablement incubés avec différentes concentrations d'extraits de propolis). La plaque a été agitée et immédiatement lue dans un lecteur de plaques (BMG, Star Galaxy Fluoro) pendant 1 h à intervalles de 2 min. La cinétique des réactions a été analysée et la pente maximale de chaque courbe a été calculée. Les fonds de luminescence ont été calculés en utilisant des solutions réactives contenant du luminol mais pas du PMA.

III.1.3.4.2. Activité de la peroxydase leucocytaire

Principe

L'activité de la peroxydase leucocytaire est déterminée par la technique ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay), une procédure simple, directe et automatisée. Où l'anticorps polyclonal anti-MPO a été fixé sur des plaques à 96 puits. Et l'anticorps polyclonal anti-MPO

conjugué à la biotine a été utilisé comme anticorps de détection. Des substrats TMB (Tétra méthyl benzyle) ont été utilisés pour visualiser la réaction enzymatique HRP. Le TMB a été catalysé par HRP pour produire un produit de couleur bleue qui s'est transformé en jaune après addition d'une solution d'arrêt acide. La densité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité MPO de l'échantillon capturé dans la plaque. L'Absorbance est lue à 450 nm dans un lecteur de microplaques, ce qui permet de déterminer la concentration de MPO (ABNOVA, 2017).

Mode opératoire

L'activité peroxydase des leucocytes HK de la dorade a été mesurée selon Quade *et* Roth (1997). Les leucocytes HK ont été d'abord incubé avec différentes concentrations des extraits de propolis, puis ont été lysé avec 50 µL de bromure de cétyl triméthyl ammonium à 0,002% (CTAB; Sigma). C'est alors que 100 µL de TMB à 10 mM et de H₂O₂ à 5 mM, sont rajoutés. Le changement de couleur de la solution a été arrêté après 2 min en ajoutant 50 µL d'acide sulfurique à 2 M. Des échantillons standards sans leucocytes ont été utilisés comme témoin blancs. L'Absorbance est lue à 450 nm dans un lecteur de microplaques (BMG, Star Galaxy Fluoro).

III.1.3.5. Analyses statistiques

Les données ont été analysées statistiquement par analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA) pour tester les différences entre tous les traitements, et un test post-hoc (Student-Newmal-Keuls) a été utilisé pour déterminer les différences entre deux groupes si nécessaire. Les hypothèses d'homogénéité des variances et de la normalité ont été vérifiées à l'aide des tests de Levene et Kolmogorov-Smirnov / Shapiro Wilk respectivement. Les données non normalement distribuées ont été transformées logarithmiquement avant l'analyse et un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de comparaison multiple, a été utilisé lorsque les données ne correspondaient pas aux hypothèses paramétriques. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 20. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à un niveau de confiance de 95%.

III.2. Résultats et Discussion

III.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire

III.2.1.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH

L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et des témoins BHT, Rutine, Quercetine et Acide gallique (antioxydants de référence). L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC_{50} , ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH[•] (couleur). Ces IC_{50} sont déterminées à partir des graphes (Figure 1-12, **Annexe II**) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

Tous les extraits ont un pouvoir anti radicalaire envers le DPPH[•], plus la valeur de l' IC_{50} est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. Les résultats illustrés dans la figure (Figure 22) montrent que les activités antiradicalaires des extraits de la propolis sont assez importantes. On remarque aussi que le pouvoir antiradicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration, ce qui a été remarqué avec le pouvoir réducteur des extraits éthanoliques ainsi que dans l'étude réalisé par Leandro *et al.*, (2008).

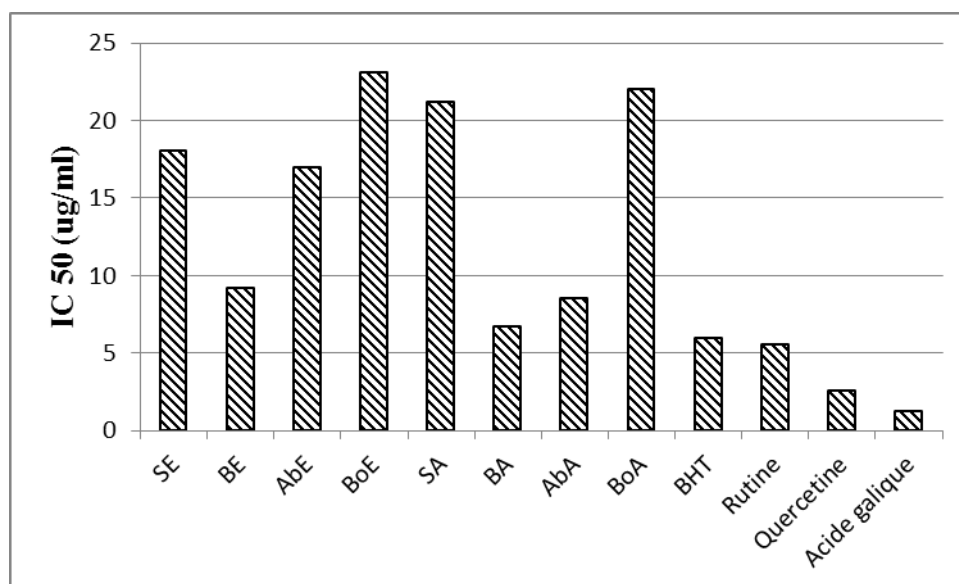


Figure 22 : Valeurs d' IC_{50} des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques.

Afin d'établir une comparaison entre les échantillons on a déterminé les IC_{50} Tableau 11. Les extraits éthanoliques et aqueux présentent une activité antiradicalaire différente. C'est

l'échantillon de Babor qui a présenté le plus important pouvoir antiradicalaire. Par contre l'échantillon provenant de Boutaleb a présenté le plus faible pouvoir antiradicalaire. Les autres échantillons ont présenté des valeurs moyennes pour les régions Sétif et Ain Abbassa, respectivement.

Tableau 11 : Valeurs d'IC₅₀ des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques.

Echantillon	IC ₅₀ (µg/mL)
SE	18,0351±0,0192
BE	6,7332±0,0040
AbE	8,4999±0,0107
BoE	22,0204±0,0051
SA	21,1687±0,0090
BA	9,1502±0,0035
AbA	16,9836±0,0288
BoA	23,0822±0,0144
BHT	5,94815±0,0011
Rutine	5,5859±0,0004
Quercetine	2,5654 ±6,6235 E-05
Acide galique	1,2672±0,0017

En comparant les IC₅₀ des quatre régions des extraits aqueux, on peut en déduire que l'extrait de la région Babor présente le meilleur pouvoir antiradicalaire estimé à 9,15 µg/mL, suivi par la région de Ain abbassa avec 16,98 µg/mL. Par ailleurs, L'extrait aqueux de Boutaleb présente un pouvoir antiradicalaire plus faible avec une valeur de IC₅₀= 23 µg/mL.

D'autre part, la Quercetine et l'Acide galique ont montré une activité antioxydante avec une IC₅₀ de l'ordre de 2,56 et 1,26 µg/mL, respectivement, et donc très élevé par rapport à nos extraits. Alors que la Rutine (IC₅₀= 5,58 µg/mL) et le BHT (IC₅₀= 5,94 µg/mL) ont montré une activité antioxydante proche de l'extrait éthanolique de Babor (BE).

Les composés phénoliques sont doués d'effets biologiques multiples, y compris l'activité antioxydante (Ahn *et al.*, 2007) .Parmi les principaux groupes de composés présents dans la propolis nous retrouvons les polyphénols et les flavonoïdes qui peuvent agir sur l'élimination des radicaux libres ou empêchent leur formation. Ce fait peut contribuer à la capacité de la propolis à empêcher l'oxydation (Ahn *et al.*, 2007 ; Moreira *et al.*, 2008).

Les propriétés antioxydantes des différents extraits végétaux et des composés purs peuvent être évaluées en utilisant divers essais *in vitro*. En effet, les propriétés antioxydantes de la propolis portugaise du nord-est et du centre du Portugal ont déjà été démontrées en utilisant la méthode DPPH et le pouvoir réducteur du fer (Moreira *et al.*, 2008). Dans notre cas, la méthode du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) a été utilisée pour évaluer la capacité des extraits de propolis à éliminer les radicaux libres. Par conséquent, ces extraits étant capables d'empêcher la formation de radicaux anioniques superoxydes, ils empêchent aussi l'oxydation et les dommages des tissus vivants. Les extraits éthanoliques de la propolis provenant du Portugal ont montré que les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont de l'ordre de 6 et 25 µg/mL respectivement pour les propolis de *Bornes* et *Funddao* (Leandro *et al.*, 2008). Ces résultats rejoignent ceux du présent travail (6 et 22 µg/mL pour Babor et Boutaleb, respectivement) ceci nous permet de dire que les échantillons de propolis étudiés ont un pouvoir antiradicalaire.

III.2.1.2. Test de blanchissement du β-carotène (the bleaching test)

La cinétique de blanchissement du β-carotène en absence et en présence des extraits de propolis et d'antioxydant standards (BHT) a été suivie (Figure 23).

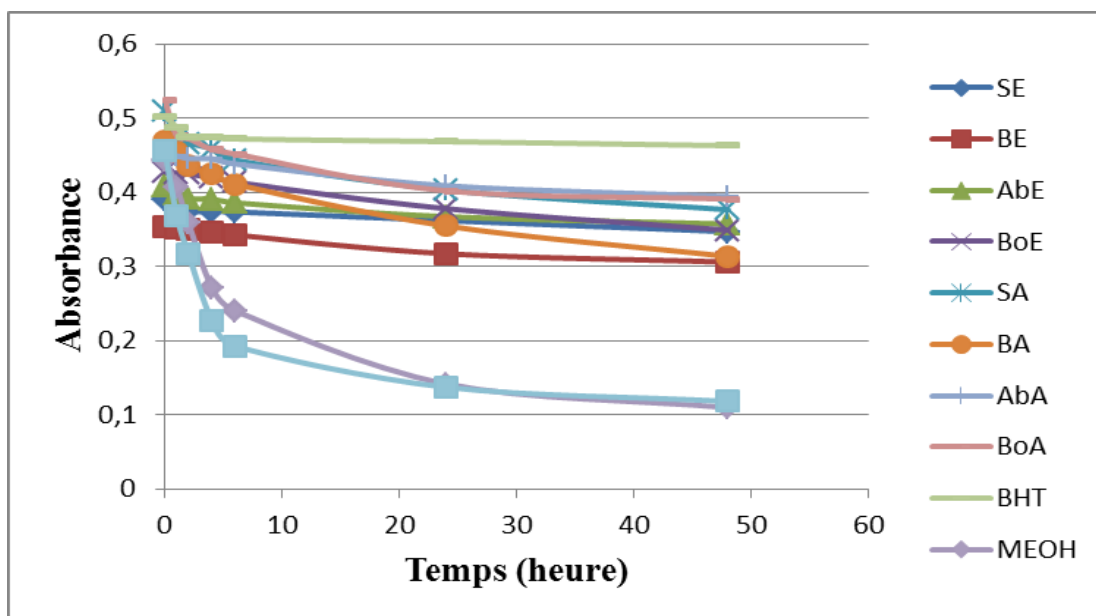


Figure 23 : La cinétique de blanchissement du β-carotène en absence et en présence des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques

La technique de décoloration du β -carotène/acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de propolis par inhibition de la peroxydation des lipides en suivant l'absorbance dans le temps, les absorbances des milieux réactionnels en absence des extraits diminuent rapidement dans le temps, alors que l'ajout d'extraits actifs ou de BHT ralentit ce déclin.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

L'effet de 2 mg/mL des extraits de la propolis sur la peroxydation lipidique d'une émulsion d'acide linoléique pendant 24 heures est représentée en Tableau 12 et Figure 24. En fonction des échantillons, cette activité était comprise entre $67,758 \pm 0,686 \%$ et $87,330 \pm 2,597\%$. Cependant, la plus faible activité a été obtenue avec l'extrait BA tandis que les valeurs les plus élevées ont été obtenues pour AbE.

Nous avons également observé que les extraits éthanoliques des échantillons de propolis avaient une forte activité antioxydante.

Tableau 12 : L'activité antioxydante relative de blanchissement du β -carotène en présence des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques pendant 24h.

Echantillon	AAR%
SE	86,049±0,427
BE	75,729±3,950
AbE	87,330±2,597
BoE	85,836±0,213
SA	77,295±1,612
BA	67,758±0,686
AbA	78,434±0,493
BoA	80,711±1,897
BHT	100±0,537
MEOH	30,249±2,342
H ₂ O	29,323±2,835

Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA), le méthanol (MEOH), l'eau (H₂O) et le BHT. Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N = 3).

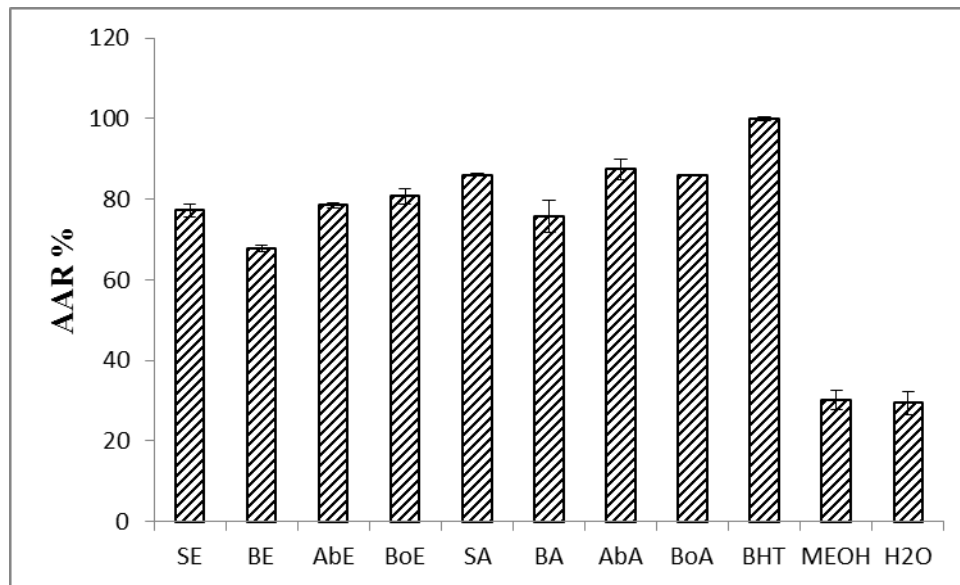


Figure 24 : L'activité antioxydante relative de blanchissement du β -carotène en présence des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis de diverses origines géographiques Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA), le méthanol (MEOH), l'eau (H₂O) et le BHT pendant 24h. Les valeurs ont été exprimées en tant que moyen de trois essais \pm SD (N = 3).

L'activité antioxydante représentée sur la Figure 24 semble corrélérer avec les teneurs totales en flavonoïdes des extraits. Les flavonoïdes ont été rapportés comme étant les antioxydants les plus abondants et le plus efficaces dans la propolis (Scheller *et al.*, 1990).

Ahn *et al.* (2004) ont rapporté l'activité antioxydante de la propolis de diverses régions de la Corée. Où l'EEP de Cheongju évaluée par le système β -carotène-acide linoléique, a présenté une activité antioxydante plus forte (~ 40%) que celle des autres régions.

Par ailleurs, Nieva Moreno *et al.* (2000) en étudiant l'activité antioxydante de la propolis d'Argentine, ont rapporté une étroite corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité antioxydante de celle-ci. Cependant, d'autres facteurs seraient impliqués. C'est ce qui avait été précédemment rapporté par Yamauchi *et al.* (1992), qui avaient isolé un flavonoïde (le benzyle) comme l'un des antioxydants de la propolis chinoise.

Selon la méthode utilisée, différents résultats peuvent être obtenus puisque l'oxydation est un processus complexe se produisant en plusieurs étapes et les mécanismes par lesquels les activités antioxydantes peuvent être mesurées sont différents. En fait, le procédé d'évaluation de la capacité d'inhibition de la formation d'anions de radicaux superoxydes est différent de

ceux dans lesquels on évalue la capacité de balayage des radicaux DPPH. Dans ces deux cas, les méthodes sont basées sur la réaction de transfert d'électrons (Sanchez-Moreno, 2002).

Par conséquent, il y a une activité antioxydante due à la présence de polyphénols (Ahn *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008), mais cette activité n'est pas directement corrélée avec la teneur en phénol, comme cela a été observé dans les échantillons du nord-est et du centre du Portugal ou de Chine. La structure chimique du phénol est un facteur déterminant de l'activité antioxydante (Rice-Evans *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 2002; Tsao *et Deng* 2004). Il est considéré que l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leurs potentiels d'oxydo-réduction élevé, ce qui leur permettent d'agir comme des agents réducteurs donneurs d'hydrogène et les désactivateurs d'oxygène singulet. La présence de groupes hydroxyle dans les positions 3'-4'- et 5 'dans le cycle B des flavonoïdes augmente l'activité antioxydante par rapport aux composés avec un groupe hydroxyle. De plus, la présence de groupe hydroxyle en position 3 et de 2,3-double liaison conjuguée au groupe 4-oxo semble avoir une importance dans les propriétés antioxydantes (Miguel, 2010). En outre, ces derniers ont également montré que les niveaux mesurés de phénols et de flavonoïdes ne reflètent pas directement l'activité antioxydante des extraits de propolis (Silva *et al.*, 2006).

III.2.2. Activité bactéricide

Dans le présent travail, l'activité bactéricide a suivi un modèle similaire pour les huit extraits étudiés contre *V. harveyi*. Toutefois, cette activité était très faible et de façon frappante, spécialement dans le cas des extraits aqueux vis-à-vis de *P. damselae* (Figure 25).

Malgré la faible activité des extraits aqueux dans le cas de *P. damselae*, le profil bactéricide était également assez similaire. Cependant, en considérant tous les extraits confondus la plus haute activité a été retrouvée vis-à-vis de *S. putrefaciens*. Par contre, dans les extraits éthanoliques, l'activité bactéricide était la plus élevée contre *S. putrefaciens*, et la plus faible contre *V. harveyi*. Il est d'ailleurs admis que l'extrait éthanolique de la propolis a un potentiel élevé comme source alternative de composés antibactériens (Lu *et al.*, 2005; Basim *et al.*, 2006 ; Mohammadzadeh *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009).

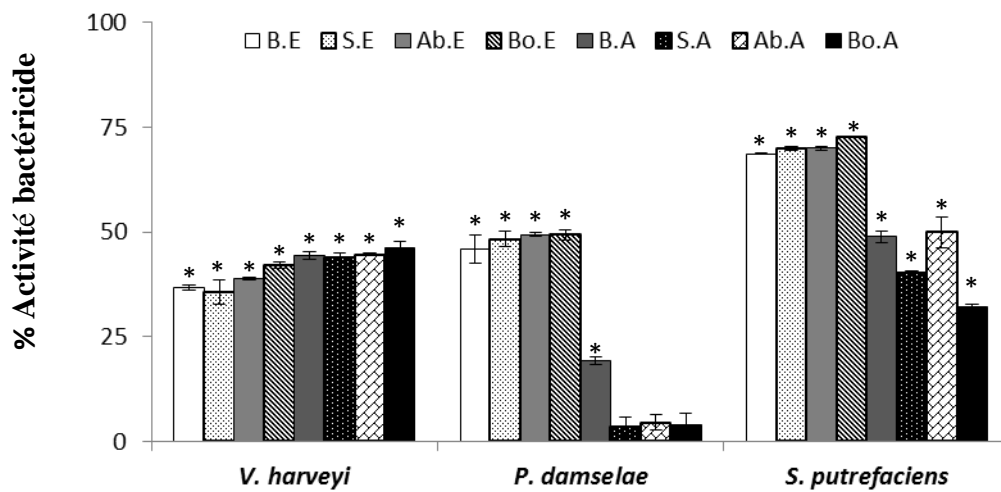


Figure 25 : Activité bactéricide des extraits de propolis (Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA)) contre *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* et *Shewanella putrefaciens*. Les barres représentent la moyenne \pm SD (N = 3). ** indiquent des différences significatives par rapport au contrôle positif (0% d'activité bactéricide, $P \leq 0,01$).

Comme tous les êtres vivants, les poissons sont sensibles aux infections bactériennes, surtout dans les élevages de forte densité. (les épidémies) sont responsables de taux de mortalité élevés et d'une diminution de la productivité, entraînant de lourdes pertes économiques pour les pisciculteurs (Hatha *et al.*, 2005).

Pour lutter contre ces maladies bactériennes, les pisciculteurs comme tous les éleveurs ont recours à une grande variété d'antibiotiques et ont contribué au développement et à la sélection de bactéries résistantes. En plus des problèmes occasionnés en pisciculture, ces dernières peuvent constituer une source d'agents pathogènes pour d'autres animaux et pour les humains (Hatha *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2008). D'où le besoin urgent de rechercher de nouveaux médicaments par la mise en œuvre de thérapies alternatives pour lutter contre ces maladies bactériennes. Par sa richesse en substances aussi nombreuses que différentes, la

propolis constitue une source thérapeutique inépuisable (Grange *et Davey*, 1990; Banskota *et al.*, 2001b).

Trois maladies bactériennes d'un grand impact économique dans les fermes de dorade ont fait l'objet de la présente étude. La vibriose ayant pour étiologie des espèces du genre *Vibrio*, celui-ci est largement distribué dans les milieux marins et saumâtres. Ce sont les espèces *V. harveyi* et *V. anguillarum*, les plus importantes sur le plan économique en larviculture marine et en aquaculture aussi bien des poissons que celle des fruits de mer (Frans *et al.*, 2011; Chisada *et al.*, 2013).

Une autre maladie aussi importante que la précédente, la pasteurellose ou pseudotuberculose, est une septicémie bactérienne causée par la bactérie halophile *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (anciennement *Pasteurella piscicida*) chez une grande variété de poissons marins (Romalde, 2002).

Shewanella putrefaciens est responsable d'infections cutanéomuqueuses, de suppurations profondes et de bactériémies. Ces dernières compliquent parfois les infections cutanéomuqueuses non traitées. Cependant, chez certains patients fragilisés par une pathologie hépatobiliaire, la bactériémie survient généralement sans notion de porte d'entrée infectieuse à l'examen clinique et son pronostic est souvent fatal malgré l'antibiothérapie (Holt *et al.*, 2005)

Les données de nombreuses études concernant les propriétés antibactériennes de la propolis confirment le fait que la propolis serait principalement active contre les bactéries à Gram positives et afficherait une activité beaucoup plus faible, voire nulle contre les bactéries à Gram négatives (Dobrowolski *et al.*, 1991; Marcucci, 1995; Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin *et al.*, 2000; Kartal *et al.*, 2001; El-Fadaly *et El-Badrawy*, 2001; Stepanovic *et al.*, 2003; Silici *et Kutluca*, 2005; Drago *et al.*, 2007).

En testant des échantillons de propolis provenant de différentes régions géographiques (zones tropicales et tempérées) Kujumgiev *et al.* (1999) ont obtenu une activité antibactérienne significative contre *S. aureus*, mais aucune contre *E. coli*.

Grange *et Davey* (1990), ont rapporté que les extraits éthanoliques de la propolis (EEP) de Boiron et Cie, Lyon, France inhibaient complètement la croissance de *S. aureus*, *Enterococcus* spp. et *Bacillus cereus*, partiellement la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* et n'ont eu aucun effet sur *Klebsiella pneumoniae*.

D'autre part, de faibles concentrations de propolis brésilienne collectée au cours des quatre saisons inhibaient la croissance des bactéries à Gram positives alors que des concentrations plus élevées d'EEP étaient nécessaires pour inhiber les bactéries à Gram négatif. Cependant, aucune différence d'activité n'a été enregistrée sur les courbes de survie de *S. aureus* et *E. coli* en fonction des périodes de collectes. On peut s'attendre à ce que la propolis produite à différentes saisons, et donc à partir d'espèces végétales ou d'organes végétaux potentiellement différentes, présente une variation chimique importante, mais comme la diversité climatique est également un facteur important, il se peut que la zone d'échantillonnage ne révèle pas de variations climatiques importantes au cours de l'année et donc une flore plus ou moins constante (Sforcin *et al.*, 2000).

Auparavant il a été démontré que des échantillons de propolis brésiliennes collectés dans diverses régions avaient inhibé l'activité enzymatique de *Streptococcus spp.* (Park *et al.*, 1998). En effet, ce dernier est d'un grand intérêt odontologique, par sa capacité à métaboliser les hydrates de carbones par la glucosyl transférase en dextrane, elle adhère aux dents en formant la plaque dentaire. (De castro, 2001). Cela prouve ainsi l'efficacité de ces produits à base de propolis, ce qui en fait une alternative thérapeutique naturelle pour le traitement des mycoses cutanées chez les chevaux et ne porte aucuns effets secondaires toxiques des produits pharmaceutiques conventionnels (De castro, 2001).

En outre, plusieurs bactéries anaérobies causant des maladies parodontales sont sensibles à l'extrait éthanolique de la propolis, encore une fois, le Gram négatif est le plus résistant à l'action de la propolis (Santos *et al.*, 2002; Volpi *et Bergonzini*, 2006; Koru *et al.*, 2007).

Certains auteurs ont suggéré que la résistance accrue des bactéries Gram-négatives pourrait être due à la présence de pompes d'efflux dans les membranes plasmiques qui empêcheraient l'entrée intracellulaire des constituants de la propolis, ou favoriseraient leur extrusion à partir de la cellule, ou même parce que la propolis contiendrait beaucoup de constituants de résine végétale qui sont sécrétées pour protéger les plantes des agents pathogènes Gram positifs principalement (Garedew *et al.*, 2004).

L'activité antibactérienne de la propolis a été principalement corrélée avec les flavonoïdes, tels la galangine, la pinocébrine et la pinostrobine étant reconnues comme les plus efficaces (Dimov *et al.*, 1992). Cependant, il existe des rapports d'échantillons de propolis contenant uniquement des traces de flavonoïdes mais présentant une action antibactérienne (Tomas-Barberan *et al.*, 1993). L'acide ferulique et l'acide caféique, l'acide coumarique prénylé et les dérivés de la benzophénone ou des acides diterpéniques sont également des composés

bioactifs (Kujumgiev *et al.*, 1990; Ghisalberti, 1979; Mirzoeva *et al.*, 1997; Burdock, 1998, Castaldo *et Capasso*, 2002; Popova *et al.*, 2007), mais le mécanisme exact de l'action antimicrobienne reste à élucider et n'a fait l'objet que de quelques publications. La microscopie électronique et le test micro calorimétrique, ont montré que l'EEP interfère avec la division de *Streptococcus agalactie*. Cette interférence serait due à la formation de structures pseudo-multicellulaires, à la désorganisation du cytoplasme, à l'inhibition de la synthèse des protéines aboutissant enfin à la lyse cellulaire (Takaisi-Kikuni *et Schilcher*, 1994).

De nombreuses bactéries sont effectivement éliminées par les flavonoïdes. Cependant, les cibles primaires des flavonoïdes, les eicosanoïdes, ne semblent pas être synthétisées par les bactéries puisque les enzymes impliquées sont seulement présentes dans les cellules eucaryotes. Les procaryotes contiennent cependant des métalloenzymes, telles que les phosphatases, et c'est avec les atomes de métaux lourds que les flavonoïdes forment un complexe de ligand plus d'affinité, privant ainsi les métalloenzymes de leurs cofacteurs (Fokt *et al.*, 2010). L'effet bactéricide des flavonoïdes peut être dû à une perturbation métabolique dans les canaux ioniques en raison d'une altération des réactions de phosphorylation / déphosphorylation (Mirzoeva *et al.*; 1997; Farnesi *et al.*, 2009).

L'acide caféique, l'acide benzoïque et l'acide cinnamique agissent probablement aussi sur les sites de la membrane microbienne ou de la paroi cellulaire, provoquant des dommages fonctionnels et structurels (Marcucci, 1995; Mirzoeva *et al.*, 1997).

Certains diterpènes et composés phénoliques possèdent une activité contre *Helicobacter pylori* (Boyanova *et al.*, 2005), une bactérie Gram négative qui provoque l'ulcère gastroduodéal et le cancer gastrique. Jusqu'à présent, aucun composant de propolis n'a montré une activité antibactérienne supérieure à celle de l'extrait brut (Bonvehi *et al.*, 1994). Certains auteurs attribuent l'activité antimicrobienne de la propolis à sa composition hautement complexe et variable, et les données recueillies jusqu'à présent suggèrent qu'elle peut être liée à de multiples cibles, avec plusieurs constituants agissant en synergie (Amoros *et al.*, 1992; Takaisi-Kikuni *et Schilcher*, 1994; Mirzoeva *et al.*, 1997, Burdock, 1998; Scazzocchio *et al.*, 2006).

La propolis affecte la membrane cytoplasmique, inhibe la motilité bactérienne et l'activité enzymatique, présente une activité bactériostatique contre différents genres bactériens et peut être bactéricide en concentrations élevées (Mirzoeva *et al.*, 1997). Certains de ces exemples et son action multiple contre de nombreux facteurs de virulence des bactéries Gram-positives

présentant un intérêt clinique: le facteur de virulence de la coagulase staphylococcique est complètement supprimée, la lipase fortement réduite et la prévention de la dose-dépendante de la formation de biofilms est évidente en présence d'EEP (Scazzocchio *et al.*, 2006).

Bien que les observations *in vivo* soient toujours manquantes, cette réduction des facteurs de virulence microbienne est sans aucun doute une cible intéressante dans le traitement des infections à Gram positif. La synergie entre l'EEP et les antibiotiques, avec une réduction nette des valeurs de CMI pour plusieurs souches, a également été rapportée (Stepanovic *et al.*, 2003; Scazzocchio *et al.*, 2006.).

III.2.3. Effets *in vitro* des extraits de la propolis sur les réponses immunitaires innées de la dorade

Les valeurs d'osmolalité du milieu de culture RPMI et des extraits de la propolis par l'eau distillée (BA, SA, AbA, BoA) et par l'éthanol (BE, SE, AbE, BoE) à différentes concentrations, sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 13).

Tableau 13 : Les valeurs d'osmolalité du milieu de culture RPMI et des extraits de la propolis à différentes concentrations.

Echantillons	Osmolalité (m mol/Kg)		
	1µg/mL	100µg/mL	200µg/mL
Milieu de culture RPMI	361,333		
SE	355	364	369
BE	359	365	370
AbE	361	365	373
BoE	359	360	370
SA	360	361	362
BA	357	358	360
AbA	360	361	363
BoA	359	362	363

L'osmolalité de chaque extrait de la propolis est restée stable, alors elle n'affectera pas les cellules HK aux cours du travail.

L'osmolalité représente le nombre de particules osmotiquement actives par kg d'eau. Sa valeur tient compte essentiellement du capital sodé, tout comme le glucose et l'urée, qui sont des substances osmotiquement actives, capables d'attirer et de retenir l'eau. L'osmolalité physiologique est maintenue dans des limites étroites. Une variation minime, de l'ordre de

quelques %, entraîne la mise en route des principaux facteurs de régulation : sécrétion d'ADH, déclenchement de la soif, régulation rénale par concentration-dilution (aboutissant à variations pathologiques) (Ichai *et al.*, 1994; Butscher *et al.*, 1996).

La propolis est utilisée en médecine populaire depuis des siècles. On vient de démontrer que la propolis possède des activités antimicrobiennes et antioxydantes, mais on sait qu'elle possède aussi des activités anti-ulcéreuses et anti-tumorales. Par conséquent, la propolis a attiré beaucoup d'attention ces dernières années comme une substance utile ou potentielle utilisée en médecine et les produits cosmétiques. En outre, elle est maintenant largement utilisée dans les aliments et les boissons avec la prétention qu'elle pourrait maintenir ou améliorer la santé humaine (Banskota *et al.*, 2001a).

Plusieurs études ont déjà rapporté des effets immuno-stimulateurs de la propolis chez les mammifères (Zhang *et al.*, 2009; Talas *et al.*, 2009). Chez les poissons, la propolis a eu un effet important sur l'environnement aquatique (Christyapita *et al.*, 2007). Utilisée comme supplément alimentaire la propolis a amélioré les réponses immunitaires non spécifiques ainsi que la résistance aux maladies chez le tilapia du Nil (Abd-elRhaman *et al.*, 2009). Ceci est en partie dû à la stimulation des fonctions physiologiques des poissons et qui aurait aussi des avantages sur la santé des consommateurs (Talas *et al.*, 2009).

Pour la présente recherche, la dorade a été choisie comme modèle de poissons, vu son importance pour l'aquaculture marine et son intérêt commercial ; pour tester l'utilisation possible de la propolis comme immunostimulant des poissons. Les résultats obtenus suggèrent que des extraits BE, BA et AbA sont nécessaires pour induire une diminution significative de la viabilité cellulaire des leucocytes de dorade lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations de 100 et 200 µg/mL (Figure 26A), mais tous les extraits à 1 µg/mL ne présentaient aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur la viabilité des leucocytes du loup de mer (Figure 26B).

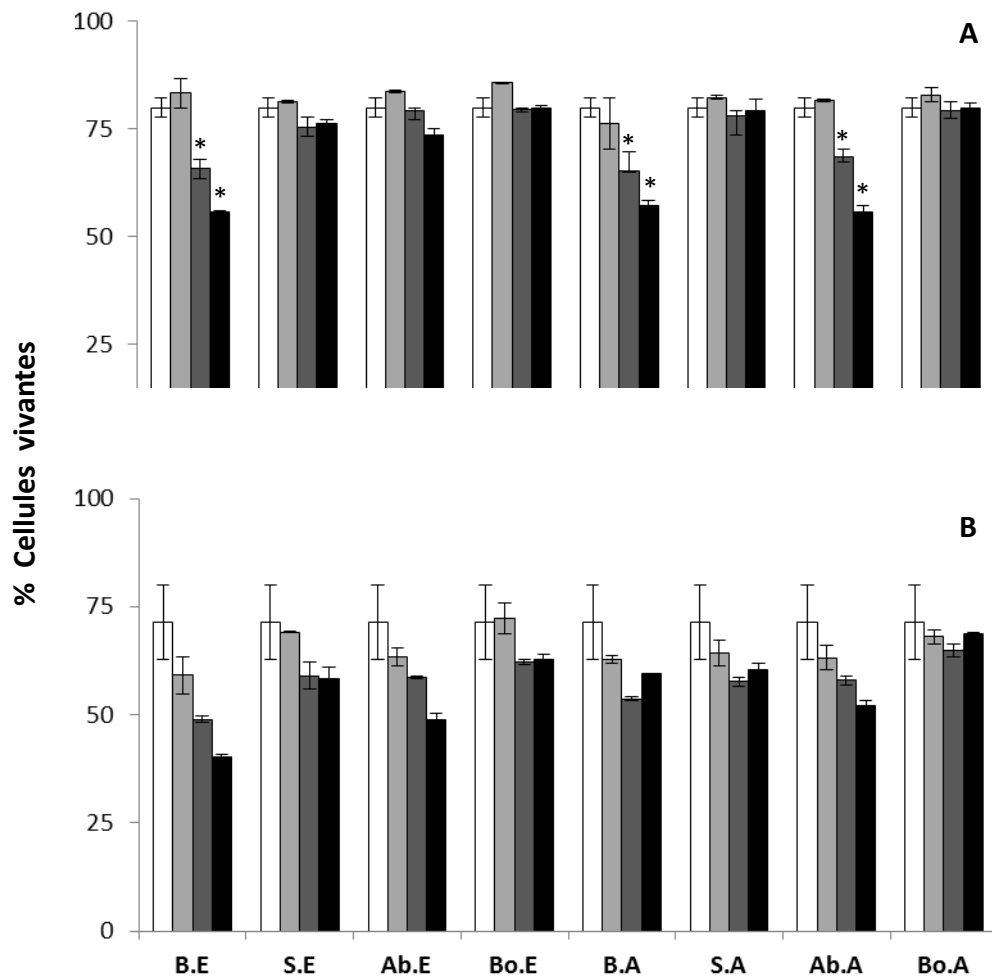


Figure 26: Viabilité [pourcentage (%) de cellules vivantes] de leucocytes HK à partir de spécimens de dorade (*S. aurata*) après incubation sans (contrôle, barres blanches) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA) (barres grises claires: 1 µg/mL, barres gris foncé: 100 µg/mL, barres noires: 200 µg/mL) A : dorade et B : loup. Les barres représentent la moyenne \pm SD (N = 3). **indiquent des différences significatives par rapport au groupe témoin ($P \leq 0,01$).

Le résultat différentiel obtenu parmi toutes les concentrations d'extraits est probablement expliqué par les composés présents dans chaque échantillon de propolis. En outre, cet effet pourrait être attribué à un certain effet synergique entre les principaux constituants de nos échantillons. Plusieurs articles rapportent que les flavonoïdes et leurs dérivés, présents dans nos extraits, exercent une faible cytotoxicité sur les cellules normales en fonction de leurs concentrations (Feng *et al.*, 2008; Rucinska *et al.*, 2008; Kleiton, 2011).

Malgré les différents rapports qui montrent la cytotoxicité par la propolis (Weng *et al.*, 2007), nos résultats indiquent que l'induction supplémentaire de la mort cellulaire est probablement due à la composition et à la proportion différentielles (Trusheva *et al.*, 2006). Selon Orsolic (2010), la propolis est une variété de composés polyphénoliques / flavonoïdes qui peuvent influencer un certain nombre de cibles intracellulaires clés et peuvent servir de régulateurs de l'expression des gènes et / ou moduler les produits géniques. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur la viabilité des leucocytes du loup de mer (figure 26B).

Les cellules cytotoxiques non spécifiques, NCC, chez les poissons sont fonctionnellement équivalentes aux cellules NK (natural killer) des mammifères, formant une population hétérogène de cellules présentant des caractéristiques morphologiques typiques des monocytes-macrophages, granulocytes et lymphocytes (Meseguer *et al.*, 1996) capables de tuer les cellules tumorales, les cellules xénogéniques, ou encore les cellules infectées par un virus ou par un parasite. Ainsi, chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et la dorade (*Sparus aurata*), les trois types de leucocytes auraient une activité NCC contre les lignées de cellules tumorales (Kurata *et al.*, 1995; Cuesta *et al.*, 1999). Chez *Tilapia mossambica*, *Tilapia honorum*) et le loup de mer (*Dicentrarchus labrax*), l'activité NCC est médiée par les macrophages (Faisal *et al.*, 1989).

L'activité de la peroxydase sérique a également été affectée par les extraits de propolis. La tendance générale était une augmentation à faible concentration, et une augmentation à des concentrations élevées par rapport au groupe témoin (Figure 27). Ces augmentations sont statistiquement significatives dans le cas des extraits de BoE et BA à 1 µg/mL, tandis que BA, SA et AbA à 200 µg/mL provoquent une diminution significative de cette activité.

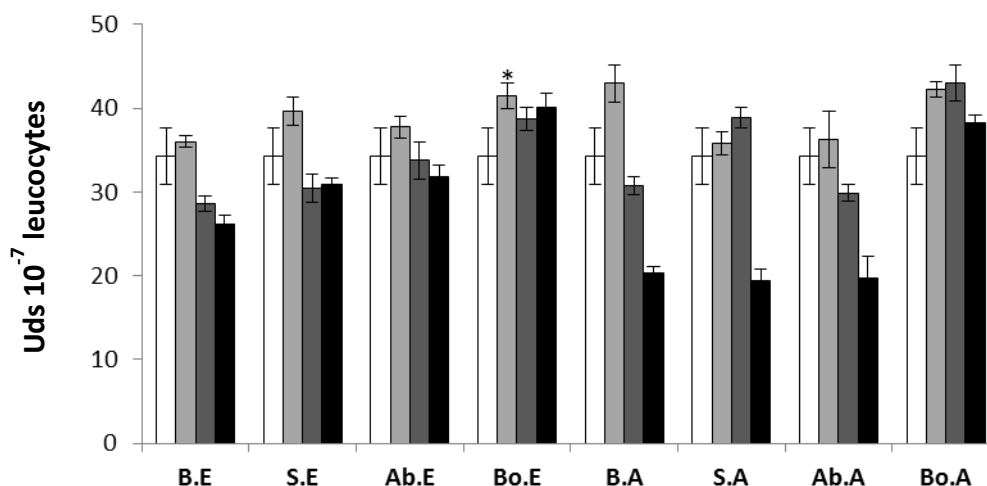


Figure 27 : Activité de la peroxydase des leucocytes HK à partir de spécimens de dorade (*S. aurata*) après incubation sans (contrôle, blancs) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA) (barres grises claires: 1 µg/mL, barres gris foncé: 100 µg /mL, barres noires: 200 µg /mL). Les barres représentent la moyenne ± SD (N = 3). **indiquent des différences significatives par rapport au groupe témoin (P≤0,01).

Le rôle joué par la propolis dans l'une des plus importantes fonctions des macrophages, à savoir la production de radicaux libres, n'est pas clair. Cependant, Ivanovska *et al.* (1993) ont démontré que deux flavonoïdes présents dans la propolis, l'acide cinnamique et l'acide caféique, inhibent et induisent, respectivement, la libération de H₂O₂ par les macrophages. Plus tard, Orsi *et al.* (2000) ont suggéré que la propolis induisait la libération de peroxyde d'hydrogène mais inhibait la génération de NO. Nos résultats démontrent que la propolis inhibe la production de H₂O₂ par les leucocytes HK chez les dorades.

Dans la présente étude, l'activité MPO de la propolis était significativement plus faible que celle du groupe témoin, et l'effet dépendait de la dose dans tous les cas sauf pour les extraits BoE et BoA (Figure 28).

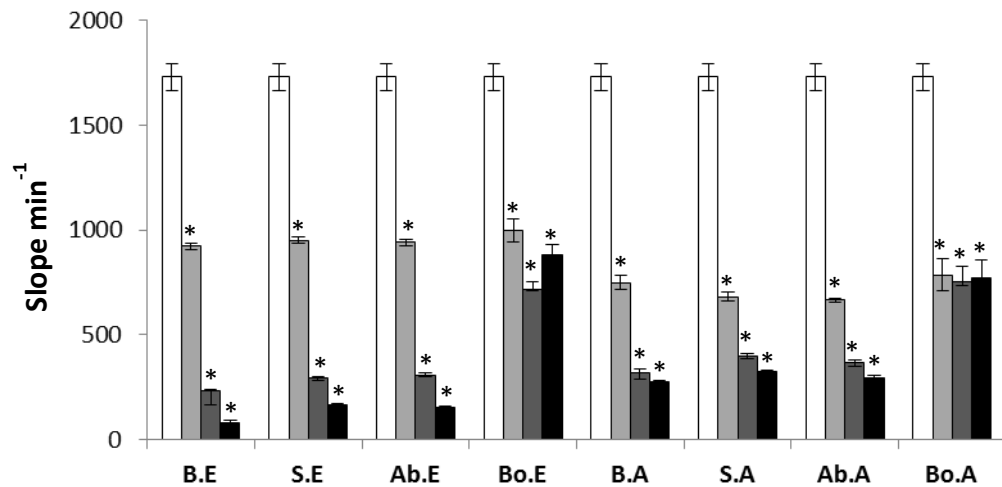


Figure 28 : Activité de rupture respiratoire des leucocytes HK des échantillons de dorade (*S. aurata*) après incubation sans (contrôle, blancs) ou avec différentes concentrations d'extraits de propolis Babor éthanolique (BE), Sétif éthanolique (SE), Ain-Abbassa éthanolique (AbE), Boutaleb éthanolique (BoE), Babor aqueux (BA), Sétif aqueux (SA), Ain-Abbassa aqueux (AbA), Boutaleb aqueux (BoA) (barres gris clair: 1 µg/mL; 100 µg/mL, barres noires: 200 µg/mL). Les barres représentent la moyenne \pm SD (N = 3). **indiquent des différences significatives de respect par rapport au groupe témoin ($P \leq 0,01$).

L'activité du burst respiratoire a montré un effet inhibiteur important lorsque les leucocytes ont été incubés avec les extraits. La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme qui produit de l'acide hypochloreux à partir des radicaux oxydants pour détruire les bactéries et les agents pathogènes. Elle est libéré principalement à partir des granules azurophiles des neutrophiles lors de routines respiratoires oxydatives (Das *et al.*, 2013). Cependant, il n'y a pas de rapports précédents concernant les effets de la propolis sur l'activité MPO.

Discussions générales

Dans la présente étude, la composition chimique des différents échantillons de propolis de quatre sites de la région de Sétif, ainsi que leurs activités biologiques ont été évaluées. L'activité antioxydante par le test de DPPH et celui du β -carotène ont été confirmées par la présence de certains composés comme, les lipides d'éther. Ces derniers agissent comme des antioxydants, les effets protecteurs contre le stress oxydatif ont été démontrés en culture cellulaire, et ils pourraient même jouer un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines sériques. Cette activité antioxydante provient de la double liaison de l'énol-éther, cible de nombreux dérivés réactifs de l'oxygène (Brosche *et Platt*, 1998; Engelmann, 2004).

L'activité antibactérienne et l'effet immunostimulants ont été aussi vérifiés dans cette étude. Cette activité est liée à la présence de certains composés dans les extraits, tel que, l'acide cinnamique, l'acide benzoïque, l'antraquinone et ses dérivés, les alcaloïdes, les sesquiterpènes, les acides gras, lanostan-3-one, 11 β , la podophyllotoxine, les phénothiazines, le pyrrolidone, les dérivés de barbituriques, la chrysine, Androst-5-en-17-one, l'alpha-terpinéol, le thymol, les dérivés de rhodanine, les dérivés imidazoliques, la carbamazépine et le méthylène Bis Aspidinol.

L'acide cinnamique et l'acide benzoïque sont utilisés pour le traitement des maladies fongiques de la peau comme la teigne et le pied d'athlète. L'acide benzoïque a été utilisé comme expectorant, analgésique et antiseptique au début du 20^e siècle (Charles *et al.*, 2004).

L'antraquinone et ses dérivés naturels sont dotés d'un pouvoir thérapeutique avéré pour soigner tous les troubles fonctionnels intestinaux comme la colopathie fonctionnelle, la laxophobie, la constipation etc. L'antraquinone est utilisée comme laxatif ou purgatif (Müller-Lissner, 1993).

Les alcaloïdes ont un large éventail d'activités pharmacologiques comprenant des activités antipaludiques, antiasthmatiques, anticancéreuses, cholino mimétiques, vasodilatatrices, anti arythmiques, analgésiques, antibactériennes et anti hyperglycémiques. Beaucoup ont trouvé une utilisation dans la médecine traditionnelle ou moderne, ou comme point de départ pour la découverte de médicaments. D'autres alcaloïdes possèdent des activités psychotropes et stimulantes (Kittakoop *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2013; Cushnie *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014).

Les sesquiterpènes soient connus pour leur large éventail d'activités biologiques, y compris les activités antimicrobiennes et anti genotoxiques, la littérature rapporte

l'induction de l'ADN endommagé par des composés de type sesquiterpène à propriétés antimicrobiennes (Looi *et al.*, 2013).

Les acides gras ont divers effets sur les réponses immunitaires et inflammatoires, agissant comme médiateurs intracellulaires et intercellulaires. Les acides gras interfèrent avec de nombreuses étapes de l'inflammation, telles que la contraction vasculaire, la chimiotaxie, l'adhésion cellulaire, la diapédèse, et l'activation cellulaire. Les acides gras peuvent moduler la fonction leucocytaire, contrôler la prolifération, la production de cytokines et des molécules d'adhésion, et causer la mort cellulaire (Looi *et al.*, 2013; Arghiani *et al.*, 2014).

Les activités antibactériennes et cytotoxiques de lanostan-3-one, 11 β sont également rapportées par Lavoie *et al.* (2013).

La podophyllotoxine possède un grand nombre d'applications médicales et peut être utilisée en tant qu'agent antiviral cathartique, purgatif, vésicant et antihelminthique. De plus, la podophyllotoxine et ses dérivés sont des pistes pour les agents antitumoraux tels que l'étoposide et le téniposide (Damayanthi *et Lown*, 1998; Gordaliza *et al.*, 2004).

L'indication principale des phénothiazines neuroleptiques est le traitement des psychoses aiguës ou chroniques de l'adulte. Ces médicaments sont aussi utilisables dans les troubles graves du comportement de l'enfant avec agitation et agressivité. En dehors de la psychiatrie, certaines de ces molécules sont également prescrites pour leurs propriétés antiémétiques et sédatives, pour des patients cancéreux et les malades en fin de vie. Certaines phénothiazines sont des antihistaminiques H1 (Zong *et al.*, 2011; Filip *et al.*, 2015).

La famille pyrrolidone a des effets notropiques. Plus tard, elle est utilisée comme neuroprotecteur après un AVC et en tant qu'agents antiépileptiques (Shorvon, 2001).

Les dérivés de barbituriques sont utilisés pour traiter l'insomnie et comme sédatif pour soulager les symptômes de l'anxiété ou de tension. Il est également utilisé pour le contrôle de certains types de crises. Il fonctionne en ralentissant le cerveau et le système nerveux. Ils sont également utilisés pour réduire le taux de bilirubine dans les nouveau-nés (Kälviäinen *et al.*, 2005).

La chryisine est un bioflavonoïde qui a la capacité unique d'inhiber le processus d'aromatisation qui transforme la testostérone en œstrogènes chez les hommes âgés et vieillissants et qui est en grande partie responsable de leur relative féminisation, notamment de la gynécomastie. Beaucoup d'études ont montré que les niveaux de testostérone augmentent lorsque l'action de l'enzyme aromatase est bloquée (Saarinen *et*

al., 2001; Van Meeuwen *et al.*, 2007).

Androst-5-en-17-one est un androgène qui est réputé pour ses effets anti-âge (d'où son surnom médiatique d'« hormone de jeunesse »). Son efficacité est encore contestée, de nombreuses études. Il est actuellement considéré comme un produit dopant par l'Agence mondiale antidopage (Tchernof *et Labrie*, 2004; Traish *et al.*, 2011).

L'alpha-terpinéol présente des effets anti-prolifératifs sur les cellules érythroleucémiques humaines (Lampronti *et al.*, 2006). L'alpha-terpinéol a également été décrit comme ayant des propriétés anti-inflammatoires (Held *et al.*, 2007), tel qu'il a été révélé être un puissant inhibiteur de la production de superoxyde, régulant de manière sélective le fonctionnement des cellules au cours de l'inflammation (Brand *et al.*, 2001). L'alpha-terpinéol a été également démontré que antibactériens (Kotan *et al.*, 2007) et des activités antifongiques (Pitarokili *et al.*, 2002).

Le thymol entre dans la composition de divers médicaments en raison de son pouvoir antibactérien et antiseptique (Zarrini *et al.*, 2010). Il est aussi efficace contre certains champignons parasites (Numpaque, *et al.*, 2011). On trouve par exemple du thymol dans des médicaments soulageant les aphtes, les irritations de la gorge et les piqûres d'insectes (Evans *et Martin*, 2000). À noter : le thymol est également employé pour protéger les ruches d'abeille des invasions parasites au varroa (type d'acarien). (Hu *et Coats*, 2008)

Certains dérivés de rhodanine possèdent des propriétés pharmacologiques; par exemple, est utilisé pour traiter la neuropathie diabétique (Tomasic *et Peterlin Masic*, 2012).

Certains dérivés imidazoliques montrent des activités antifongiques, antihistaminique ou antiprotozoaires. Ces composés forment une classe de médicaments bien connus pour leur activité antiparasitaires et antimycosique aussi utilisés en bactériologie (Sunderland *et al.*, 2014).

La carbamazépine appartient au groupe de médicaments appelés « psychorégulateurs ». Ce médicament est utilisé pour traiter les troubles de l'humeur tels que le trouble bipolaire. La carbamazépine est également qualifiée d'« anticonvulsivant » et il est utilisé pour traiter les troubles épileptiques (Le fèvre-Houillier *et Delattre*, 2004; Lancelin *et al.*, 2003).

Méthylène Bis Aspidinol est un nouveau dérivé d'acylphloroglucinol qui a montré une activité trypanocide contre les tripomastigotes de *Trypanosoma brucei* similaire au médicament de référence pentamidine (Kabran *et al.*, 2015).

Des études comparatives ont révélé que, bien que la composition chimique est variée, la propolis a toujours démontré une activité biologique plus ou moins considérable

(Kujungiev *et al.*, 1999; Seidel *et al.*, 2008). Pour cette raison, la diversité chimique de la propolis a le potentiel de fournir des pistes précieuses (Bankova, 2009).

Par conséquent, une étude plus approfondie est nécessaire pour élucider tous les effets des produits de propolis sous différentes formes, leur contenu et leur composition pouvant varier selon leur source.

Conclusion générale

Dans le domaine de la recherche biologique, beaucoup d'efforts ont été réalisés ces dernières années pour la recherche de nouveaux traitements à base de plantes, l'étude de leurs éléments d'efficacité et la compréhension de leur mode d'action . Au cours des travaux réalisés dans la présente thèse , nous nous sommes focalisés sur la propolis l'un des produits les plus complexes de la ruche.

Les extraits testés ont été obtenu à partir de quatre sites de la région de Sétif par macération en utilisant deux solvants (eau et éthanol). Nous avons obtenu un meilleur rendement pour l'extrait éthanolique de Babor ($40,73\% \pm 0,21$). Alors que de faibles rendements ont été obtenus avec les extraits aqueux.

L'analyse par GC/MS a montré que chaque extrait éthanolique ou aqueux possédait une composition chimique différente. De même que la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux. Cependant, l'extrait éthanolique de la propolis de Babor a présenté la valeur la plus élevée en polyphénols $600 \pm 0,017$ mg EAG/g de propolis, par contre l'extrait aqueux de la propolis d'Ain Abbassa a présenté la valeur la plus faible $96,833 \pm 0,027$ mg EAG/g. En comparant les résultats de la même région, on a pu déduire que la teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques présente des valeurs importantes, par contre cette teneur était très faible dans les extraits aqueux.

L'évaluation de leurs pouvoirs anti-radicalaires, pouvoir réducteur et quantification de leurs composées phénoliques (polyphénols et flavonoïdes), a confirmé les propriétés puissantes des extraits éthanoliques de la propolis à piéger les radicaux libres. Spécialement l'extrait de Babor suivit de près par celui d'Ain-abbassa qui se sont révélés être les meilleurs antioxydants.

L'activité bactéricide des extraits éthanoliques était aussi très élevée vis-à-vis de *Shewanella putrefaciens*, moyenne contre *Photobacterium damsela* et très faible vis-à-vis de *Vibrio harveyi*. La plus faible activité bactéricide correspondait toujours aux extraits aqueux.

Dans la présente étude, l'activité MPO de la propolis était significativement plus faible que celle du groupe témoin, et l'effet dépendait de la dose dans tous les cas sauf pour les extraits BoE et BoA. Les extraits éthanoliques et aqueux de propolis (de Babor) et l'extrait aqueux (d'Ain-Abbassa) ont provoqué une diminution significative de la viabilité cellulaire lorsqu'ils ont été utilisés à des concentrations de 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$. En outre, des effets inhibiteurs significatifs ont été enregistrés sur l'activité du burst respiratoire des leucocytes.

Finalement, les activités biologiques observées dans la présente étude tendent dans une certaine mesure à valider les utilisations médicinales de cette substance. Il est intéressant de noter que les extraits de propolis testés possèdent des composés phytochimiques biologiquement actifs tels que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes et les tanins déjà connus pour leurs propriétés antioxydantes. A cet effet, on a montré que ces composés phytochimiques avaient des propriétés immunomodulatrices de la réponse des phagocytes et des monocytes à différentes étapes observées chez les poissons. Par ailleurs, ils pourraient avoir une importance thérapeutique comme source de nouveaux agents dans la gestion des maladies. En effet, pour la première fois huit extraits de propolis provenant de quatre zones géographiques différentes ont été étudiées pour leurs éventuelles propriétés immunomodulatrices *in vitro*. Cependant, il convient de noter que d'autres tests *in vivo* ainsi que des études cliniques contrôlées randomisées à double insu devraient être effectuées, pour confirmer si les résultats *in vitro* rapportés ici pourraient être traduits en activités *in vivo* susceptibles de soutenir les utilisations traditionnelles de ces produits comme des aliments médicamenteux chez les animaux et les humains.

En perspectives, il sera nécessaire d'identifier et d'isoler les composés bioactifs à tester séparément ou en combinaison avec d'autres médicaments déjà disponibles en vertu de l'utilisation des extraits de propolis comme traitement relativement peu coûteux dans différentes maladies. Malgré les essais *in vitro* et *in vivo*, qui fournissent de nouvelles informations précieuses sur les propriétés biologiques de la propolis et les mécanismes d'action, il faudra analyser cliniquement l'efficacité de la propolis, compléter la recherche fondamentale disponible et évaluer le potentiel de la propolis dans la promotion de la santé humaine et vétérinaire.

Enfin d'un point de vue économique, différentes préparations d'extraits de la propolis sont manufacturé sous différentes formes galéniques (gélule, spray, bain de bouche, etc.); pourquoi ne pas faire de même avec la propolis locale??

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El Hady, F.K., Hegazi, A.G., (2002). Egyptian Propolis: Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c, 386-394.
- Abd-El-Rhman, A.M.M., (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27, 454-459.
- ABNOVA, Peroxidase Assay Kit Catalog Number KA1620, 100 assays, Version: 02, Intended for research use only; www.abnova.com consulter: le 23/02/2017.
- Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R.K., Tran, V.H., Duke, C.C., (2012). Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry*, 77, 251-259.
- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T., (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101 (4), 1383-1392.
- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.S., Nakayama, T., (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7286-7292.
- Alencar, S.M., Oldoni, T.L., Castro, M.L., (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal Ethnopharmacology*, 113, 278-283:
- Almeida, E., C., D., Menezes, H., (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review 2104. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 8 (2), 191-212.
- Amic, D., Becol, D., Trinajstić, N., (2003). Structure-Radical Scavenging activity relationships of Flavonoïds. *Croatica Chemica Acta*, 76 (1), 55-61.
- Amoros, M., Simoes, C.M.O., Girre, L., (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type I in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55, 1732-1740.
- Anderson D.P, Swiciki A.K, Dixon O.W. Immuno-stimulation by levamisole in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *in vivo*. 1, 39-50. In: Ahne W, Kurstak E, editors. In *Viruses of Lower Vertebrates*. New York: Sringer-Verlag; 1989. pp. 469-478.

- Arghiani, N., Matin, M.M., Bahrami, A.R., Iranshahi, M., Sazgarnia, A., Rassouli, F.B., (2014). Investigating anticancer properties of the sesquiterpene ferutinol on colon carcinoma cells, *in vitro* and *in vivo*, *Life Science*, 109, 87-94.
- Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adigüzel, A., Sahin, F., Özkan, H., (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology*, 44, 247-252.
- Athikomkulchai, S., Awale, S., Ruangrungrasi, N., Ruchirawat, S., and Kadota, S., (2013). Chemical constituents of Thai propolis. *Fitoterapia*, 88, 96-100.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46, 1086-1089.
- Bankova, V., (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (12), 114-117.
- Bankova, V., (2005b). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 29-32.
- Bankova, V., (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 23-28.
- Bankova, V., Castro, S.L., Marcucci, M.C., (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., Popov, S., (1992). Determination of phenolics from propolis by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 607, 150-153.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.-G., (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung Section C*, 57 (5-6), 530-533.
- Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B., (2007). Plant origin of propolis: Latest developments and importance for research and medicinal use, *In Marghitas, L A; Dezmirean, D (eds) Apicultura - De la stiinta la agribusiness si apiterapie*, Editura Academic Press, Cluj Napoca, 40-46.

- Bankova, V., S., Christov, R., S., Tejera, A., D., (1998). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, 49 (5), 1411-1415.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., (2001a). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, 561-571.
- Banskota, A., H., Tezuka, Y., Adnyana, I., K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., (2001b). Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8 (1), 16-23.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Adnyana, I.K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A.A., Kadota, S., (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72 (1-2), 239-246.
- Barlak, Y., Deger, O., Olak, M., C., Karatayli, S., C., Bozdayi, A., M., Yucesan, F., (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Science*, 9, article 74.
- Basim, E., Basim, H., Ozcan, M., (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Process Engineering*, 77, 992-996.
- Bayne, C.J., Levy, S., (1991). Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. *Journal of Leukocyte Biology*, 50, 554-560.
- Benkovic, V., Knezevic, A., H., Dikic, D., Lisicic, D., Orsolcic, N., Basic, I., Kosalec, I., Kopjar, N., (2008). Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine*, 15, 851-858.
- Biscaia, D., Ferreira, S. R. S., (2009). Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 51, 17-23.
- Bogdanov, S., (2016). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science*, 6.
- Bogle, R. G., Whitley, G. S., Soo, S. C., Johnstone, A. P., Vallance, P., (1994). Effect of anti-fungal imidazoles on mRNA levels and enzyme activity of inducible nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*, 111 (4), 1257-1261.

- Bonvehi, J.S., Coll, F.V., Jorda, R.E., (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 529-532.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., Ialenti, A., (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract 2127. *Fitoterapia*, 73 (1), 53-63.
- Boulaacheb, N., (2009). Etude de la végétation terrestre et aquatique du djebel Megriss (Nord Tellien, Algérie) Analyse floristique, phytosociologique et pastorale. Thèse de doctorat. UFAS-1, Algérie.
- Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khennouf, S., Arrar, L., (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. Root Extracts. *Phytotherapy Research*, 23, 283-288.
- Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., Mitov, I., Krastev, Z., (2005). Activity of Bulgarian propolis against *Helicobacter pylori* strains *in vitro* by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 481-483.
- Brand, C., Ferrate, A., Prager, R.H., Riley, T.V., Carson, C.F., Finlay-Jones, J.J., Hart, P.H., (2001). The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated *in vitro*. *Inflammation Research*, 50 (4), 213-219.
- Brosche, T., Platt, D., (1998). The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage. *Experimental Gerontology*, 33 (5), 363-369.
- Budavari, S., (1996). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (12th ed.), Merck, ISBN 0911910123.
- Burdock, G.A., (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- Butscher, K., Jamali, S., Talib, R., Ravussin, P., Poggi-Bach, J., Ecoffey, C., (1996). Effets de différents solutés de remplissage sur l'osmolalité plasmatique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 15 (7), 1037-1040.

- Castaldo, S., Capasso, F., (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 (1), 1-6.
- Castro, M.L., Vilela, W.R., Zauli, R.C., Ikegaki, M., Rehder, V.L.G., Foglio, M.A., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., (2009). Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 25-30.
- Castro, S.B.R., Leal, C.A.G., Freire, F.R., Carvalho, D.A., Oliveira, D.F., Figueredo, H.C.P., (2008). Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 756-760.
- Celemlı, O., G., Hatjina, F., Charistos, L., Schiesser, A., and Ozkirim, A., (2013). More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 68 (11-12), 429-438.
- Charles, O. W., Ole G., John, H. B., (2004). *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 234, ISBN 0-7817-34819.
- Chen, C.-N., Hsiao, C.-J., Lee S.-S., (2012). Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. *Natural Product Research*, 26 (2), 116-124.
- Chen, Y.J., Huang, A.C., Chang, H.H., Liao, H.F., Jiang, C.M., Lai, L.Y., Chan, J.T., Chen, Y.Y., Chiang, J., (2009). Caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, protects peripheral blood mononuclear cells of competitive cyclists against hyperthermal stress. *Journal of Food Science*, 74, H162-167.
- Chisada, S., Shimizu, K., Kamada, H., Matsunaga, N., Okino, N., Ito, M., (2013). *Vibrios* adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream, *Pagrus major*, utilizing GM4 as an attachment site. *FEMS Microbiology Letters*, 341, 18-26.
- Chopra, S., Pillai, K., K., Husain, S., Z., Giri, D., K., (1995). Propolis protects against doxorubicin-induced myocardial pathology in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 62, 190-198.

- Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., and Delgado Tejera, A., (1999). Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis. *Fitoterapia*, 70 (1), 89-92.
- Christybapita, D., Divyagnaneswari, M., and Michael, R.D., (2007). Oral administration Of *Eclipta Alba* leaf aqueous extract enhances the nonspecific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23, 840-852.
- Clark, R.E.D., (1937). Chemiluminescence. *School Science Review*, 38 19, 489.
- Clark, J.S., Zarate, D., Toride, Y., Dycheepuat, D., (2000). L'utilisation de peptidoglycane comme un stimulant immunitaire pour le tilapia. *ISTAV-Riodejaneiro-RJ, Brésil*, 461-463.
- Crane, E., (1999). History of other products from bees the world history of beekeeping and honey hunting, Gerald Duckworth & Co Ltd, London, pp. 545-553.
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., (1999). Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71, 161-171.
- Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., and Meseguer, J., (2005). *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 18, 71-80.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B., A., Ramirez-Apan, T., and Cardenas, J., (2002). Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 57 (3-4), 372-378.
- Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P.O., (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 964-970.
- Cushnie, T.P., Cushnie, B., Lamb, A.J., (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44 (5), 377-386.

- Da Silva, F., Garcia, C.S., Gambato, C.G., (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137-142.
- Damayanthi, Y., Lown, J.W., (1998). Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Current Medicinal Chemistry*, 5 (3), 205-252.
- Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S., and Kamilya, D., (2013). Effects of potential probiotic *Bacillus Amylolyticus* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35, 1547-1553.
- Daugusch, A., Moraes, C., S., Fort, P., and Park, Y., K., (2008). Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5 (4), 435-441.
- David, E., B., DE Carvalho, T., B., Boni De Oliveira, C., M., Coradi, S., T., Sforcin, J., M., Guimaraes, S., (2012). Characterisation of protease activity in extracellular products secreted by *Giardia duodenalis* trophozoites treated with propolis. *Natural Product Research*, 26 (4), 370-374.
- De Castro, S.L., (2001). Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review Biomedical Sciences*, 3, 49-83.
- Deng, C., Wang, A., Shen, S., Fu, D., Chen, J. Zhang, X., (2005). Rapid analysis of essential oil from *Fructus Amoni* by pressurized hot water extraction followed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 326-331.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., (1992). Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the watersoluble derivative. *Vaccine*, 10, 817-823.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandiya, P.C., (1991). Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal Of Ethnopharmacology*, 35, 77-82.
- Dominique, C., Larpent, J.P., (1993). *Biochimiluminescence. Principes et applications*, éd. Masson, coll., Biotechnologies, pp. 531.
- Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., Gismondo, M.R., (2007). *In vitro* antimicrobial

- activity of a novel propolis formulation (actichelated propolis). *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1914-1921.
- Du Toit, K., Buthelezi, S., Bodenstein, J., (2009). Anti-inflammatory and antibacterial profiles of selected compounds found in South African propolis. *South African Journal of Science*, 105 (11-12), 470-472.
- Duarte, S., Rosalen, P.L., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Bowen, W.H., Marquis, R.E., Rehder, V.L., Sartoratto, A., Ikegaki, M., Koo, H., (2006). L'influence d' un roman de propolis sur les streptocoques mutans biofilms et le développement des caries chez les rats. *Archives de la biologie buccale*, 51, 15-22.
- Duran, N., Muz, M., Culha, G., and Ozer, B., (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research*, 108 (1), 95–105.
- EI-Fadaly, H., EI-Badrawy, E.E.Y., (2001). Flavonoids of Propolis and Their Antibacterial Activities. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 21, 204-207.
- Engelmann, B., (2004). Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochemical Society Transactions*, 32 (Pt 1), 147-150.
- Eraslan, G., Murat. K., Sibel, S., (2007). Evaluation of propolis eVects on some biochemical parameters in rats treated with sodium Xuoride Pesticide. *Biochemistry and Physiology*, 88, 273-228.
- Esteban, M.A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer, J., (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research*, 293, 133-141.
- Evans, J., Martin, J. D. (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 41 (5), 336-340.
- Faisal, M., Ahmed, I.I., Peters, G., Cooper, E.L., (1989). Natural cytotoxicity of tilapia leukocytes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7, 17-22.
- Falcao, S., I., Vale, N., Cos, P., Gomes, P., Freire, C., Maes, L., Vilas-Boas, M., (2014). In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity. *Phytotherapy Research*, 28 (3), 437-443.

- Falcao, S., I., Vale, N., Gomesetal, P., (2013). Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical Analysis*, 24 (4), 309–318.
- Falcao, S., I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L., M., Barros, C., Domingues, M., R., M., and Cardoso, S., M., (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (2), 887-897.
- FAO. (2004) : La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, Rome, Italie. pp. 14-17.
- Farnesi, A.P., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J.K., Soares, A.E.E., (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics Molecular Research*, 8, 635-640.
- Fearnley, J., (2001). Bee propolis: natural healing from the hive. Souvenir Press London, pp. 172.
- Feng, L., Suresh, A., Yasuhiro, T., Shigetoshi, K., (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 5434-5440.
- Filip, I.H., Gál, E., Lupan, I., Perde-Schrepler, M., Lönnecke, P., Surducan, M., Găină, L.I., Hey-Hawkins, E., Silaghi-Dumitrescu, L., (2015). Tuning the coordination properties of phenothiazine by regioselective introduction of diphenylphosphanyl groups. *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 44, 615-629.
- Fischer, G., Conceição, F., R., Leite, F., P., Dummer, L., A., Vargas, G., D., Hübner Sde, O., Dellagostin, O., A., Paulino, N., Paulino., A., S., Vidor, T., (2007). Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25, 1250-1256.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A., M., Cunha, A., and Aguiar, C., (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Microbiology Book. A.Mendez-Vilas Ed., 1 (2), 481-493.
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., Rediers, H., (2011).

- Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34, 643–661.
- Freitas, S., F., Shinohara, L., Sforcin, J., M., Guimaraes, S., (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, 13 (3), 170-175.
- Frion-Herrera, Y., Diaz-Garcia, A., Rodriguez-Sanchez, H., Ruiz-Fuentes, J., Monzote-Fidalgo, L., (2013). Cytotoxic effect of Cuban propolis extracts against tumor cells lines. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 1, 112-117.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., Mathor, M.B., (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 206-212.
- Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I., (2004). Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. *Thermochimica Acta*, 422, 115-124.
- Gekker, G., S., Hu, M., Spivak, J., R., Lokensgard, and Peterson, P., K., (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4 lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102 (2), 158-163.
- Ghisalberti, E.L. (1979): Propolis: A Review. *Bee World*, 60 (2), 59-84.
- Ghisalberti, E.L., Jefferies, P.R., Lanteri, R. Matisons, J., (1978). Constituents of propolis. *Experientia*, 34 (2), 157-158.
- Golder, W., (2004). Propolis. The bee glue as presented by the graeco roman literature. *Wurzburger Medizinhistorische Mitteilungen journal*, 23, 133-145.
- Gonzalez, R., Corcho, I., Remirez, D., Rodriguez, S., Ancheta, O., Merino, N., Gonzalez, A., (1995). tetrachloride-induced liver injury in rats 1073. *Phytotherapy Research*, 9 (2), 114-117.
- Gordaliza M, García PA, del Corral JM, Castro MA, Gómez-Zurita MA (2004). Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*, 44 (4), 441-459.
- Grange, J.M., Davey, R.W., (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83 (3), 159-160.

- Gressler, L., T., Da Silva, A., S., Machado, G., Dalla Rosa, L., Dorneles, F., Gressler, L., T., Oliveira, M., S., Zanette, R., A., De Vargas, A., C., Monteiro, S., G., (2012). Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. *Research in Veterinary Science*, 93 (3), 1314-1317.
- Gschwendt, M., Dieterich, B., Rennecke, J., Kittstein, W., Muller, H.J., Johannes, F.J., (1996). Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Letters*, 392, 77-80.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J., Christo, L., (2005). Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 131-134.
- Hausen, B., M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B., (1987). Propolis allergy II. the sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis*, 17, 171-177.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 527-584.
- Held, S., Schieberle, P., Somoza, V., (2007). Characterization of alpha-Terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by *in vitro* studies using oral buccal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (20), 8040-8046.
- Holt, H.M., Gahrn-Hansen, B., Bruun, B., (2005). *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 347-352.
- <http://www.encyclopedie-universelle.net/abeille1/abeille-apis-mellifera-propolis-ruche-entree.jpg> (consulté le: janv 2017).
- <http://atechimie.univ-lille1.fr/Techniques/CPG-SM/Principe-fonctionnement> (consulté le : janv 2017).
- <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi> (consulté le : janv 2017).
- Hu, D., Coats, J., (2008). Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethyl propionate in the laboratory, *Pest. Management Science*, 64, 775-779.
- Ichai, C., Fenouil, E., Grimaud, D., (1994). Osmolalité et cerveau. *Annales Françaises*

d'Anesthésie et de Réanimation, 13 (1), 68-79.

- Inui, S., Hosoya, T., and Kumazawa, S., (2014). Hawaiian propolis: comparative analysis and botanical origin. *Natural Product Communications*, 9 (2), 165-166.
- Isidorov, V., A., Szczepaniak, L., and Bakier, S., (2014). Rapid GC/MS determination of botanical precursors of eurasian propolis. *Food Chemistry*, 142, 101-106.
- Issa, R., (2007). *Schistosoma mansoni*: The prophylactic and curative effects of propolis in experimentally infected mice. *Rawal Medical Journal*, 32 (2), 94-98.
- Ivanovska, N., Stefanova, Z., Valeva, V., Dimov, V., Bankova, V., and Popov, S., (1993), Immunomodulatory action of lysine derivatives of cinnamic acid. In: *Immunotherapy of Infections* (K. N. Masihi, ed.). Marcel Dekker Inc, New York, USA, 177-182.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., (2003). Antioxidant activity and total phenol content of Iranian *Ocimum* accession. *Food Chemistry*, 101, 410-550.
- Kabran, F.A., Okpekon, T.A., Roblot, F., Seon-Meniél, B., Leblanc, K., Bories, C., Champy, P., Yolou, S.F., Loiseau, P.M., Djakoure, L.A., Figadere, B., Maciuk, A., (2015). Bioactive phloroglucinols from *Mallotus oppositifolius*. *Fitoterapia*, 107, 100-104.
- Kälviäinen, R., Eriksson, K., Parviainen, I., (2005). Refractory generalised convulsive status epilepticus : a guide to treatment. *CNS Drugs*. 19, (9): 759-768.
- Kartal, M., Yildiz, S., Kaya, S., Kurucu, S., Topçu, G., (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 69-73.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., (2006). Screening of 70 medicinal plant extract for antioxidant capacity and total phenol. *Food Chemistry*, 94, 550-557.
- Khalil, M.L., (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7 (1), 22-31.
- Khayyal, M.T., El-Ghazaly, M.A., El-Khatib, A.S., (1993). Mechanisms involved in the anti-inflammatory response of propolis extract. *Drugs under Experimental and Clinical Research journal*, 19 (5),197-203.

- Kimoto, T., Arai, S, Kohguchi, M., (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection and Prevention*, 22, 506-515.
- Kittakoop, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S., (2014). Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14 (2), 239-252.
- Kleitton, B., (2011). Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 34 (2), 310-314.
- Koc, A.N., Sillici, S., Mutlu-Sariguzel, F., Sagdic, O., (2007). Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (1), 57-61.
- Koc, A.N., Sillici, S., Kasap, F., Hormet-Oz, H.T., Mavus-Buldu, H., Ercal, B.D., (2011). Antifungal Activity of the Honeybee Products against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* *Journal of Medicinal Food*, 14 (1-2), 128-134.
- Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C.H., Tunca, Y.M., Baysallar, M., Guclu, A.U., Akca, E., Tuylu, A.O., Sorkun, K., Tanyuksel, M., Salih, B., (2007). *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, 13, 140-145.
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., (2007). Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z Naturforsch [C]*, 62 (7-8), 507-513.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., S., Chritov, R; Popov, S., (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64 (3), 235-240.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T., (2004a). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68 (1), 260–262.
- Kumazawa, S.H., Nakayama, T., (2004b). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84, 329-339.
- Kurata, O., Okamoto, N., Ikeda, Y., (1995). Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 19, 315-325.

- Kurek-Gorecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Gorecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Swierczek-Zieba, G., (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19 (1), 78-101.
- Lahouel, M., boutabet, K., kebsa, W., alyane, M., (2010). Polyphenolic reactions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, 712-720.
- Lampronti, I., Saab, A.M., Gambari, R., (2006). Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *International Journal of Oncology*, 29 (4), 989-995.
- Lancelin, C., Boyer, M., Biset, K., (2003). Influence de la carbamazépine-10,11-époxyde dans le dosage de la carbamazépine : Dimension Flex Carbamazépine. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée*, 18 (6), 354-359.
- Lavoie, S., Gauthier, C., Legault, J., Mercier, S., Mshvildadze, V., Pichette, A., (2013). Lanostane- and cycloartane-type triterpenoids from *Abies balsamea* oleoresin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9, 1333-1339.
- Leandro, M., Luis, G., Diase, J.A.P., Leticia, E., (2008). Antioxydant properties, total phenol and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*, 46, 3482-3485.
- Lecoeur, H., (2002). Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Experimental Cell Research*, 277 (1), 1-14.
- Lefèvre-Houillier, W., Delattre, M.-D., (2004). Neuromyotonie post-radique du masséter. *Revue Neurologique*, 160 (11), 1075-1077.
- Leonhardt, S.D., Wallace, H.M., Schmitt, T., (2011) .Thecuticular profiles of Australian stingless bees are shaped by resin of the eucalypt tree *Corymbia torelliana*. *Austral Ecology*, 36 (5), 537-543.
- Li, F., Awale, S., Zhang, Tezuka H.Y., Esumi, H., Kadota, S., (2009). Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer celline. *Journal of Natural Products*, 72 (7), 1283-1287.

- Li, H., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y., (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102, 771-776.
- Lin, S.C., Lin, Y-H., Chan, C-F., Chung, C.Y., Hsu, S-H., (1997). The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *American Journal of Chinese Medicine*, 25 (3/4), 325-332.
- Looi, C.Y., Arya, A., Cheah, F.K., Muharram, B., Leong, K.H., Mohamad, K., Wong, W.F., Rai, N., Mustafa, M.R., (2013). Induction of apoptosis in human breast cancer cells via caspase pathway by vernodalin isolated from *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds, *PLoS One*, 8(2), e56643.
- Lu, L.C., Chen, Y.W., Chou, C.C., (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 213-220.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P., (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/sciences*, 54, 458-463.
- Marcucci, M.C., (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Maruyama, H., Sumitou, Y., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H., (2009). Antihypertensive effects of flavonoids isolated from Brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1244-1250.
- Massaro, C., F., Katouli, M., Grkovic, T., (2014). Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). *Fitoterapia*, 95, 247-257.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Mulero, V., (1996). Nonspecific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanisms. *Anatomical Record*, 244, 499-505.
- Miguel, M.G., (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15, 9252-9287.

- Mirzoeva, O.K., Calder, P.C., (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 55 (6), 441-449.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C., (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 52, 239-246.
- Missima, F., Pagliarone, A.C., Orsatti, C.L., Sforcin, J.M., (2009). The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 11-15.
- Missima, F., Pagliarone, A.C., Orsatti, C.L., Araújo Jr., J.P., Sforcin, J.M., 2010. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines' expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytotherapy Research* 24, 1501-1507.
- Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., Ostad, S.N., (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103, 1097-1103.
- Molyneux, P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity songklanakarin. *Journal of science technology*, 26 (2), 211-219.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Campos, A.C., Lisboa, S.F., Terzian, A.L., Resstel, L.B., Guimaraes, F.S., (2008). Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1. *Neuropharmacology*, 54, 141-150.
- Müller-Lissner, S.A., (1993). Adverse effects of laxatives: fact and fiction. *Pharmacology*, 47 (1), 138-145.
- Najafi, M.F., Vahedy, F., Seyyed, M., (2007). Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology*, 54, 49-56.
- Nieva Moreno, M.I., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109-114.
- Numpaque, M.A., Oviedo, L.A., Gil, J.H., García, C.M., Durango, D.L., (2011). Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant

- pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. *Tropical Plant Pathology*, 36, 3-13.
- Onlen, Y., Duran, N., Atik, E., Savas, L., Altug, E., Yakan, S., Aslantas, O., (2007). Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism with topical mupirocin. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13 (7), 713-718.
- Orsi, R.O., Funari, S.R.C., Barbattini, R., Giovani, C., Frilli, F., Sforcin, J.M., Bankova, V., (2006). Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76, 637-640.
- Orsolich, N., (2010). A review of propolis antitumour action *in vivo* and *in vitro*. *Journal of ApiProduct and ApiMedicalScience*, 2 (2), 1-20.
- Orsolich, N., Basic, I., (2005). Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 37-45.
- Orsolich, N., Bendelja, K., Brbot-Saranoivic, A., Basic, I., (2004). Effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester, an antioxidants from propolis, on inducing apoptosis in HeLa human cervical carcinoma and Chinese hamster lung V79 fibroblast cells. *Periodicum Biologorum*, 106 (4), 367-372.
- Orsolich, N., Saranovic, A., B., Basic, I., (2006). Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Medica*, 72, 20-27.
- Oyaizu, M., Ogihara, H., Fujimoto, Y., (1999). Antioxidative activity of extracts from propolis. *The Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 49, 135-138.
- Ozcan, M., Sagdic, O., Ozcan, G., (2004). Antibacterial effects of Turkish pollen and propolis extracts at different concentrations 171-464. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 55 (2), 39-40.
- Paintz, M., Metzner, J., (1979). Zur lokalanästhetischen Wirkung von Propolis und einigen Inhaltsstoffen. *Pharmazie*, 34, 839-841.
- Papachroni, D., Graikou, K., Kosalec I., Damianakos, H., Ingram, V., Chinou, I., (2015). Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples from Cameroon and Congo. *Natural Product Communications*, 10 (1), 67-70.

- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2502–2516.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Abreu, J.A.S., Ikegaki, M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*, 36, 24-28.
- Paviani, L.C., Dariva, C., Marcucci, M.C., Cabral, F.A., (2009). Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from dry ethanolic extract of propolis. *Journal of Food Engineering*, 33, 15-27.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 240 (1), 111-116.
- Petrova A., Popova M., Kuzmanova C., (2010). New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia*, 81 (6), 509-514.
- Pham-huy, L., He, H., Pham-huy, C., (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 89-96.
- Piccinelli, A., L., Mencherini, T., Celano R., (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (21), 5080-5088.
- Pietta, P., G., Gardana, C., Pietta, A., M., (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 73, 7-20.
- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N., Tzakou, O., (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (23), 6688-6691.
- Popova, M., Silic, S. i, Kaftanoglu, O., Bankova, V.S., (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12, 221-228.
- Popova, M., Bankova, V., Bogdanov, S., Tsevetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G.L., Sabatini, A-G., (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38, 306-311.

- Popova, M.P., Graikou, K., Chinou, I., Bankova, V.S., (2010a). GCMS profiling of diterpene compounds in mediterranean propolis from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (5), 3167-3176.
- Popova, M., Chen, C.N., Chen, P.Y., Huang, C.Y., Bankova, V., (2010b). A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in Pacific propolis from Taiwan. *Phytochemical Analysis*, 21, 186-191.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126 (3), 1431–1435.
- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H.T., Tsvetkova I., Najdenski, H., Bankova, V., (2013). Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and newpropolis plant sources. *Chemistry Central Journal*, 7, 1, article158.
- Qiu, S., Sun, H., Zhang, A.H., Xu, H.Y., Yan, G.L., Han, Y., Wang, X.J., (2014). Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12 (6), 401-406.
- Quade, M.J., Roth, J.A., (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 58, 239-248.
- Ransome, H.M., (1937). *The sacred bee in ancient times and folklore*. George Allen and Unwin, London, pp. 308.
- Remirez, D., Gonzalez, R., Rodrigues, S., Ancheta, O., Bracho, J.C., Rosado, A., Rojas, E., Ramos, M.E., (1997). Protective effects of Propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice. *Phytomedicine*, 4 (4), 309-314.
- Ribéreau-Gayon, P., (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, Paris, pp.254.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P., (1972). *Sciences et techniques du vin. Tome1, analyse et contrôle des vins*. Ed. Dunod, Paris, pp.671.
- Rice-Evans, C.-A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Romalde, J.L., (2002). *Photobacterium damsela* subsp. piscicida: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5, 3-9.

- Rucinska, A., Roszczyk, M., Gabryelak, T., (2008). Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biology International*, 32, 1019-1023.
- Rushdi, A.I., Adgaba, N., Bayaqoob, N.I., (2014). Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *Springer Plus*, 3, (1), article 253.
- Russo, P., Frustaci, A., Del Bufalo, A., Fini, M., Cesario, A., (2013). Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 20 (13), 1686-1693.
- Saarinen., N., Joshi. S.C., Ahotupa, M., Li, X., Ammälä, J., Mäkelä, S., Santti, R., (2001). No evidence for the *in vivo* activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78 (3), 231-239.
- Sanchez-Moreno, C., (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- Santos, F.A., Bastos, E.M.A., Uzeda, M., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Moreira, E.S.A., Braga, F.C., (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 1-7.
- Sartori, G., Pesarico, A.P., Pintonetal, S., (2012). Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Cell Biochemistry and Function*, 30 (1), 1-10.
- Savka, M., Dailey, L., Popova, M., Mihaylova, R., Merritt, B., Masek, M., Le, P., Nor, S., Ahmad, M., Hudson, H., Bankova, V., (2015). Chemical Composition and Disruption of Quorum Sensing Signaling in Geographically Diverse United States Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2015, Article ID 472593, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/472593>.
- Sayed., S.M., El-Ella, G.A.A., Wahba, N.M., El-Nisr, N.A., Raddad, K., El Rahman, M., F.A., Hafeez, A., Aamer, A.A.E.F., (2009). Immune Defense of Rats Immunized with Fennel Honey, Propolis, and Bee Venom Against Induced Staphylococcal Infection. *Journal Medicinal Food*, 12, 569-575.

- Scazzocchio, F., D'auria, F., D., ALESSANDRINI, D., PANTANELLA, F., (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161 (4), 327-333.
- Scheller, S., Wilczok, T., & Imielski, S. (1990). Free radical scavenging by ethanolic extract of propolis. *International Journal of Radiation Biology*, 57, 461-465.
- Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., Fearnley, J., (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy Research*, 22, 1256-1263.
- Sforcin, J. M., and Bankova, V., (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (92), 253-260.
- Sforcin, J.M., (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1-14.
- Sforcin, J.M., Fernandes Jr., A., Lopes, C.A., Bankova, V., Funari, S.R., (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 243-249.
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H., Hara, H., (2005). Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 201-207.
- Schanubelt, K., (1995). *Advanced aromatherapy: The science of essential oil therapy*, Pacific Institute of Aromatherapy. Healing Arts Press, Rochester, pp. 54.
- Shorvon, S., (2001). Pyrrolidone derivatives. *PubMed Lancet*. Dec 1, 358 (9296), 1885-1892.
- Silici, S., Kutluca, S., (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 69-73.
- Silici, S., Unlu, M., Vardar-Unlu, G., (2007). Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (12), 1797-1803.

- Silva, B., B., Rosalen, P., L., Cury, J., A., (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 5 (3), 313-316.
- Silva, J.F.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R., Vidal, F.V.N., (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. Food Chemistry, 99, 431-435.
- Speciale, A., Costanzo, R., Puglisi, S., Musumeci, R., Catania, M., R., Caccamo, F., Iauk, L (2006). Antibacterial activity of Propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. Journal of Chemotherapy, 18 (2), 164-171.
- Stepanovic, S., Antic, N., Dakic, L., Svabic-Vlahovic, M., (2003). In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiological Research, 158 (4), 353-357.
- Subasinghe, R.P., (2005). Approches épidémiologiques pour la gestion de la santé des animaux aquatiques : opportunités et défis pour les pays en développement à accroître la production aquatique par l'aquaculture. Preventive Medicine, 67, 117-124.
- Sun, L.P., Chen, A.L., Hung, H.C., (2012). Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (47), 11748-11758.
- Sunderland, M.R., Cruickshank, R.H., Leighs, S.J., (2014). The efficacy of antifungal azole and antiprotozoal compounds in protection of wool from keratin-digesting insect larvae. Textile Research Journal, 84 (9), 924-931.
- Sunyer, J.O., Tort, L., (1995). Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream Sparus aurata serum are affected by the alternative complement pathway. Veterinary Immunology and Immunopathology, 45, 333-345.
- Takaisi-Kikuni, N.B., Schilcher, H., (1994). Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta Medica, 60, 222-227.
- Talas, Z.S., and Gulhan, M.F., (2009). Effects of various propolis concentrations

- biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1994-1998.
- Tchernof, A., Labrie, F., (2004). Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies], *European Journal of Endocrinology*, 151, 1-14.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., Sokmen, A., (2006). Screening of the antioydan potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food chemistry*, 95, 200-204.
- Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F., (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical from Venezuela. *Phytochemistry*, 34, 191-196.
- Tomašić, T., Peterlin Mašič, L., (2012). Rhodanine as a scaffold in drug discovery: A critical review of its biological activities and mechanisms of target modulation. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7 (7), 549-560.
- Tossoun, Z.A., Rashed, A., Hegazi, A.G., (1997). Honey and propolis as management of chronic skin ulcers. *International Symposium on Apitherapy*, Cairo 8-9th, March.
- Traish, A.M., Kang, H.P., Saad, F., (2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA)—a precursor steroid or an active hormone in human physiology [archive], *Journal of Sexual Medicine*, 8, 2960-2982.
- Tran, V.H., Duke, R.K., Abu-Mellal, A., Duke, C.C., (2012). Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry*, 81, 126-132.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M.C., Miorin, P.L., da Rocha Pasin, F., Tsvetkova, I., (2006). Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 3, 249-254.
- Trusheva, B., Popova, M., Koendhori, E., B., Tsvetkova, I., Naydenski, C., and Bankova, V., (2011). Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. *Natural Product Research*, 25 (6), 606-613.
- Trusheva, B., Popova, M., Naydenski, H., Tsvetkova, I., Rodriguez, J., G., Bankova, V., (2004). New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*, 75 (7-8), 683-689.

- Tsao, R., Deng, Z., (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99.
- Uzel, A., Sorkun, K., Oncag, O., Cogulu, D., Gencay, M., Salih, B., (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160 (2), 189-195.
- Van Meeuwen, J.A., Korthagen, N., de Jong, P.C., Piersma, A.H., van den Berg, M., (2007). (Anti) estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15, 221 (3), 372-383.
- Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung [C]*, 55, 785-789.
- Victorino, F., R., Franco, S., L., Svidzinski, T., I., E., Avila-Campos, M., J., Cuman, R., K., N., Hidalgo, M., M., Bersani-Amado, C., A., (2007). Pharmacological evaluation of Propolis solutions for endodontic use. *Pharmaceutical Biology*, 45 (9), 721-727.
- Viel, C., Dore JC., (2003). History and uses of honey, mead and hive products. *Revue d'histoire de la pharmacie*, (Paris), 51 (337), 7-20.
- Vit, P., Huq, F., Barth, O., Campos, M., Perez-Perez, E., Tomas-Barberan, F., Santos, E., (2015). Use of Propolis in Cancer Research. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 8, 88-109.
- Volpi, N., Bergonzini, G., (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 354-361.
- Warley de Souza, B., Mônica Tallarico, P., (2006). Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17 (5),
- Watanabe, M., A., E., Amarante, M., K., Conti, B., J., Sforcin, J., M., (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63 (11), 1378-1386.

- Weng, M., Liao, C., Chen, C., Wu, C., Lin, J., (2007). Propolin H from Taiwanese propolis induces G1 arrest in human lung carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5289-5298.
- Wu, Z., Zhu, A., Q., Takayama, F., Okada, R., Liu, Y., C., Harada, Y., W., S., Z., Nakanishi, H., (2013). Brazilian Green Propolis Suppresses the Hypoxia-Induced Neuroinflammatory Responses by Inhibiting NF-kappa B Activation in Microglia. Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2013, Article ID 906726, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/906726>
- Yamauchi, R., Kato, K., Oida, S., Kanaeda, J., Ueno, Y., (1992). Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 1321-1322.
- Yang, H., Y., Chang, C., M., Chen, Y., W., Chou, C., C., (2006). Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (6), 937-943.
- Yang, H.Y., Ho. W.L., Chang, C.M., Chou, C.C., (2007). Antibacterial Activity of Propolis Ethanol Extract against *Streptococcus mutans* as Influenced by Concentration, Temperature, pH and Cell Age. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15, 75-81.
- Yildirim, Z., Süleyman, H., Nurettin, O. K., Nasuhi, E. A., Mine, K., Mustafa, I., Riza, D., (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacological Research*, 49, 287-292.
- Zarrini, G., Bahari-Delgosha, Z., Mollazadeh-Moghaddam, K., Shahverdi, A.R., (2010). Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical biology*, 48 (6), 633-636.
- Zerroug, K., (2012). Elaboration d'un système d'information géographique (flore) dans la Wilaya de Sétif. Mémoire de magister, UFAS-1, Algérie.
- Zhang, G., Gong, S., Yu, D. and Yuan, H., (2009). Propolis and *Herba Epimedii* extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 26, 467-472.

- Zhang, T., Omar, R., Siherietal, W., (2014). Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation anddereplication of African propolis. *Talanta*, 120, 181-190.
- Zong, D., Hååg, P., Yakymovych, I., Lewensohn, R., Viktorsson, K., (2011). Chemosensitization by phenothiazines in human lung cancer cells: impaired resolution of γ H2AX and increased oxidative stress elicit apoptosis associated with lysosomal expansion and intense vacuolation. *Cell Death & Disease*, 2 (7), article181.

Annexes

Annexe I

Tableau 1: Composition chimique des extraits éthanoliques de propolis Algérienne prélevés à Babor (BE) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	5.081	0.02	Succinate d'éthyle (triméthylsilyle)	Ester éthylique
2	5.493	0.24	Ether de glycérol	Lipide d'éther
3	5.981	0.15	Acide butanedioïque	Acide dicarboxylique
4	8.237	0.03	Acétophénone	Cétone aromatique
5	8.568	0.05	Acide malique	Acide dicarboxylique
6	13.242	0.52	D-Fructose	Glucide
7	13.336	0.29	Sorbopyranose	Glucide
8	13.729	18.97	Acide pyrido [3', 4': 5,6] cyclohept [1,2-b] indole-5-carboxylique, 2-acétyle 1,2,3,4,4a,5,6,11,12,12a - décahydro-12a-hydroxy-5- (hydroxyméthyl) -12 méthyle, γ -lactone, acétate (ester)	Ester acétate
9	14.354	0.17	beta.-D-Glucopyranose	Glucide
10	14.979	1.08	Tetracosane	Hydrocarbure aliphatique saturé
11	15.323	0.16	Acide Hexadécanoïque	Acides n-alcanoïques
12	15.629	0.19	Mannose	Glucide
13	15.892	0.90	Acide cinnamique	Acide aromatique
14	16.660	0.27	Trimethyl3-methoxy-4-cinnamate	Ester d'acide aromatique
15	17.616	2.98	Trimethylcinnamate	Ester d'acide aromatique
16	17.797	0.37	Acide benzoïque	Acide aromatique
17	18.810	0.84	3,4-Epoxy-4a-ethyl-2,3,4,4a,5,6- hexahydro-1H-pyrido[3,2-C]carbazole	Composé organique hétérocyclique aromatique
18	19.022	0.24	Pagicerine	Alcaloïde
19	19.960	0.69	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	Ester d'acide aromatique
20	21.309	0.71	Docosane	n-alkanes
21	22.990	0.05	2'-O-Methylcajanone	Isoflavonoïdes
22	23.346	0.24	1'H-Cholesta-3,5-dieno[3,4-b]indol	Indole
23	24.215	0.26	Octadecane	n-alkanes
24	25.421	0.33	Cyclotetracosane	Hydrocarbure saturé
25	25.815	0.20	Demecolcine	Alcaloïde
26	26.033	0.46	9-Hexacosène	Alpha-oléfines
27	26.396	1.14	1,6-Dihydroxy-3methylantraquinone	Anthraquinone
28	26.633	2.08	1,8-Dihydroxy-3-(hydroxyméthyl) anthraquinone	Anthraquinone
29	34.863	5.36	Lanostan-3-one, 11.beta.,18-epoxy-	Triterpène
30	37.400	6.07	Pregn-4-en-3-one, 17-hydroxy-, (17 .alpha.)	Triterpène

RT: temps de rétention

Tableau 2: Composition chimique des extraits éthanoliques de propolis Algérienne prélevés à Sétif (SE) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	5.131	0.89	1,3-Dioxolane, 2-(4-methoxyphenyl)-2-methyl	Dioxolane
2	5.493	0.99	Ether de glycérol	Lipide d'éther
3	5.974	0.30	Acide butanedioïque	Acide dicarboxylique
4	9.268	0.26	Acide 2-propénoïque, ester 3-phénylique	Phényl ester
5	10.917	0.24	Naphthalène	Hydrocarbure aromatique polycyclique
6	13.329	1.07	Sorbose	Glucide
7	14.348	0.26	D-Mannopyranose	Glucide
8	14.667	0.93	Nifénazone	Composé organique hétérocyclique aromatique
9	15.042	0.43	Galactose benzyloxime	Glucide
10	15.623	0.29	D-Glucose	Glucide
11	15.891	1.31	Acide cinnamique	Acide aromatique
12	16.654	1.48	Triméthylcinnamate	Ester d'acide aromatique
13	17.597	2.91	1-(Phénylthioxométhyl)-2,5-pyrrolidinedione	Pyrrolidones
14	18.622	0.82	Acide Oleique	Acide gras monoinsaturé
15	21.484	1.14	2,5-Cyclohexadiène-1,4-dione, 2,5-dihydroxy-3-octadecyl	Isoprène
16	22.890	0.54	8H-Dinaphtho[2,3-c:2',3'-h]phénothiazine	Hydrocarbure aromatique polycyclique
17	24.265	0.19	Demecolcine	Alcaloïde
18	24.353	4.52	Acide benzoïque	Acide aromatique
19	25.277	4.10	Papaverine	Alcaloïde
20	26.008	2.60	Podofilox	Composé organique hétérocyclique
21	26.383	8.01	1,6-Dihydroxy-3-méthylanthraquinone	Anthraquinone
22	26.615	9.70	1,3,8-Trihydroxy-6-méthylanthraquinone	Anthraquinone
23	27.146	2.45	Aspidospermidine	Alcaloïde
24	32.639	0.85	Brallobarbital	Barbiturates
25	33.288	0.48	Cyclobarbital	Barbiturates

Tableau 3: Composition chimique des extraits éthanoliques de propolis Algérienne prélevés à Ain-Abbassa (AbE) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	5.493	1.06	éther de glycérol	Lipide d'éther
2	5.974	0.29	Acide butanedioïque	Acide dicarboxylique
3	8.561	0.65	DL- acide Malique	Acide dicarboxylique
4	10.911	0.09	bêta.-Guaiène	Sesquiterpènes
5	13.235	2.21	D-Fructose	Glucide
6	13.329	1.77	Sorbopyranose	Glucide
7	14.348	0.33	Talose	Glucide
8	14.716	0.19	N-(3-Allyl-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-6-yl)acétamide	Acétamide
9	15.623	0.45	alpha.-D-Mannopyranose	Glucide
10	15.891	0.47	Acide Cinnamique, 3,4-diméthoxy-ester	Ester d'acide aromatique
11	16.085	0.58	Acide Hexadecanoïque	Acide gras saturé
12	16.647	0.64	Triméthyl-3-méthoxy-4-cinnamate	Ester d'acide aromatique
13	16.891	0.19	Acide Cinnamique, 4-méthoxy-3-ester	Ester d'acide aromatique
14	17.597	1.91	Triméthylcinnamate	Ester d'acide aromatique
15	18.622	1.06	Acide Oléique	Acide gras monoinsaturé
16	19.822	0.13	Morphinan-6-one-2-ol	Alcaloïde
17	20.384	1.09	Acide Pimarique	Diterpène
18	20.853	4.84	5(4H)-Thebenidinone	Dérivés d'Alcaloïde
19	21.103	1.01	4-(Phenylthioxométhyl) morpholine	Dérivés d'Alcaloïde
20	21.297	0.37	Acide Dehydroabietique	Diterpène
21	21.653	6.29	phenol, 4-méthyl-2,6-bis (4-morpholylméthyl)	Dérivés d'Alcaloïde
22	21.728	0.30	Acide Abietique	Diterpène
23	22.878	1.25	3-[(Trimethylsilyl)oxy]4,5.alpha.-epoxy-14-hydroxy-17-(2-propenyl) morphinan-6-one	Dérivés d'Alcaloïde
24	23.090	1.40	Coumarin, 3-(3,4-diméthoxyphenyl)-6-nitro	Agent aromatisant aromatique
25	23.340	0.59	Acide Hexadecandioïque	Acide gras saturé
26	24.059	0.30	Thébaïne	Alcaloïde
27	24.352	4.96	acide Benzoïque, 2-méthyl ester	Ester d'acide aromatique
28	25.546	10.74	2,3,4-acide Trihydroxybenzoïque	Acide aromatique
29	26.383	8.76	Chrysin	Flavanoïdes
30	26.489	1.29	1,6-Dihydroxy-8-méthoxy-3-méthylanthraquinone	Anthraquinone
31	26.621	7.85	1,8-Dihydroxy-3-(hydroxyméthyl) anthraquinone	Anthraquinone

Tableau 4: Composition chimique des extraits éthanoliques de propolis Algérienne prélevés à Boutaleb (Bo E) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	8.965	0.16	3,7-Dioxa-2,8-disilanonan-5-one	Dioxacétone
2	9.751	2.19	Ether de glycérol	Lipide d'éther
3	10.729	0.12	3-Cyclohexène-1-methanol, .alpha..	α -Terpinéol
4	11.611	0.33	Benzènepropanoicacide, triméthyle ...	Ester d'acide aromatique
5	11.955	0.24	Acide Fumarique	Les acides dicarboxyliques insaturés
6	12.699	0.18	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ène, 2-isopr...	Bicyclique
7	12.892	1.23	Butane	n-alkanes
8	13.030	0.25	Naphthalène	Hydrocarbure aromatique polycyclique
9	14.111	0.30	Talose	Glucide
10	15.069	0.55	3,5-Cyclohexadiène-1,2-dione, 3,...	o-Benzoquinone
11	15.337	1.00	Ether de glycérol	Ether lipid
12	15.427	0.72	Xylitol	Alcool de sucre
13	16.440	5.24	D-Fructose	Glucide
14	16.522	1.83	Sorbopyranose	Glucide
15	16.929	0.55	alpha.-D-Glucopyranoside	Glucides dérivés
16	17.170	0.49	3,4,5-Triphenylpyrazole	Hydrocarbure aromatique polycyclique
17	17.528	0.25	Acide L-Gluconique	Glucide acid
18	17.962	0.37	Acide hexadécanoïque, ester éthylique	Ethyl ester
19	18.472	1.22	Acide hexadécanoïque, ester triméthylque	Triméthylester
20	19.595	0.44	EthylOleate	Ester d'acide gras
21	20.049	1.23	11-cis-octadécénoïque	Acide gras
22	20.421	0.30	Acide Dehydroabietique	Diterpène
23	20.545	0.55	1-Ethoxy-4'-méthoxy-2,2'-binaphthyl-1,4-dione	Hydrocarbure aromatique polycyclique
24	20.986	0.51	Ester méthylique d'acide 2,4,6-trichloro-5-nitro-nicotinique	Méthyl ester
25	21.103	0.50	3-(4-Methoxyphenyl)benzo[f]quinazoline	Hydrocarbure aromatique polycyclique
26	21.165	4.69	Acide Pimarique	Diterpène
27	21.730	2.50	Acide Dehydroabietique	Diterpène
28	21.965	4.65	Acide Abietique	Diterpène
29	22.385	2.37	2-p-Tolyloindole-1,3-dione	Indole
30	22.585	0.74	Furo[3,2-c]quinoline, 2,3-dihydro-2-hydroxyméthyl-4,8-diméthyl acide	Dérivés d'Alkaloïde
31	22.750	1.65	1-Naphthalenecarboxylique, 2-benzoyl	Hydrocarbure aromatique polycyclique
32	23.012	0.83	gamma.-Elemène	Sesquiterpènes
33	23.363	0.38	Androst-5-en-17-one	Stéroïde
34	23.480	0.47	Acide Hydroxydehydrostevique	Diterpène
35	23.783	1.00	1-O-hexadecylglycérol	Lipide d'éther

Tableau 5: Composition chimique des extraits aqueux de propolis Algérienne prélevés à Babor (BA) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	5.131	0.11	Triméthyl-, benzoate	Ester
2	5.493	3.82	Ether de glycérol	Lipide d'éther
3	5.824	0.07	L-Proline	Acide aminé- α
4	5.974	1.25	Acide butanedioïque	Acide dicarboxylique
5	8.230	0.19	Acetophenone	Cétone aromatique
6	8.561	0.15	Acide malique	Acide dicarboxylique
7	8.855	0.10	Acide hexanedioïque	Acide dicarboxylique
8	10.436	0.14	Acide benzoïque	Acide aromatique
9	13.236	6.52	D-Fructose	Glucide
10	13.567	0.33	beta.-D-Galactopyranoside	Glucoside
11	13.904	0.19	10H-Phenothiazine, 10-butyl-3,7-dinitro	Composé hétérocyclique
12	14.348	0.85	alpha.-D-Galactopyranose	Glucide
13	14.485	0.46	D-Altro-2-Heptulose	Glucide
14	14.666	7.91	6,13-Pentacenedione	Dérivés d'Anthraquinone
15	14.716	0.47	Germane, [(pentafluorophenyl)thio] triphenyl	Hydrocarbure aromatique polycyclique
16	15.398	1.24	Triméthycinnamate	Ester d'acide aromatique
17	15.616	1.37	D-Glucose	Glucide
18	15.885	0.67	Acide cinnamique	Acide aromatique
19	17.628	60.27	Trimethyl 3,4-bis(trimethyloxy)cinnamate	Ester d'acide aromatique
20	23.109	0.13	Isoquinoline, 6,7,8-trimethoxy-	Composé organique aromatique hétérocyclique

Tableau 6: Composition chimique des extraits aqueux de propolis Algérienne prélevés à Sétif (SA) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	5.130	5.05	Triméthyl-, benzoate	Ester
2	5.499	8.75	Ether de glycérol	Lipide d'éther
3	5.980	0.47	Acide butanedioïque	Acide dicarboxylique
4	7.455	0.32	Benzènepropanoicacid	Acide aromatique
5	8.567	1.27	Acide butanoïque	Acid carboxilique
6	9.267	0.62	Acide 2-propénoïque, 3-phényl-, ester triméthylque	Triméthyl ester
7	10.442	0.58	Acide benzoïque	Acide aromatique
8	13.248	11.59	D-Fructose	Glucide
9	13.335	3.93	beta.-D-Galactopyranose	Glucide
10	14.354	2.65	D-Glucose	Glucide
11	14.491	2.75	D-Altro-2-Heptulose	Glucide
12	14.729	0.96	2-(4-Methoxyphenyl)-4-[(2-propyn-1-yl)thio] quinazoline	Composé organique hétérocyclique aromatique
13	15.410	1.72	Trimethylcinnamate	Ester d'acide aromatique
14	15.629	2.43	alpha.-D-Galactopyranose	Glucide
15	15.904	1.39	Acide cinnamique, 3,4-diméthoxy-	Acide aromatique
16	16.004	0.49	Acide D-Gluconique	Glucide acide
17	16.091	0.77	Acide Hexadécanoïque	Acide gras saturé
18	16.660	2.32	Acide cinnamique, 4-méthoxy-3-	Acide aromatique
19	17.603	20.03	Triméthylcinnamate	Ester d'acide aromatique
20	19.009	0.25	Acide Octadécanoïque	Acide gras saturé
21	25.283	0.49	Thebaine	Alcaloïde

Tableau 7: Composition chimique des extraits aqueux de propolis Algérienne prélevés à Ain-Abassa (AbA) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
1	5.131	0.34	Acide benzoïque	Acide aromatique
2	5.493	8.19	Ether de glycérol	Lipide d'éther
3	5.824	0.64	L-Proline	Acide aminé-α
4	5.974	1.06	Acide butanedioïque	Acide dicarboxylique
5	6.293	0.16	Acide propanoïque	Acide carboxylique
6	6.706	0.10	Acide benzoïque, 2-méthyl-	Acide aromatique
7	9.461	0.10	5-(4-Diéthylaminobenzylidène)rhodanine	Composé organique hétérocyclique
8	9.699	0.14	Acide 2,3,4-dihydroxybutyrique	Acide polyol
9	10.380	0.12	Lyxose	Glucide
10	10.436	0.24	Acide benzoïque, 4-triméthyle	Acide aromatique
11	11.042	0.07	D-Xylose	Glucide
12	11.986	0.64	Xylitol	Alcool de sucre
13	12.623	0.17	Nicotinaldehyde semicarbazone ditm	Dérivés d'Alcaloïde
14	12.911	0.14	L(-)-Fucose	Glucide
15	13.242	18.45	D-Fructose	Glucide
16	13.329	8.57	Sorbopyranose	Glucide
17	13.567	1.53	Morpholine	Alcaloïde
18	14.348	2.85	Talose	Glucide
19	15.042	0.29	Éther de glucitol	Lipide d'éther
20	15.504	0.21	Acide 2,4,6-trihydroxybenzoïque	Acide aromatique
21	15.616	3.92	D-Glucose	Glucide
22	15.991	1.63	Acide D-Gluconique	Glucide acide
23	16.648	1.52	Acide cinnamique, 4-méthoxy-3-	Acide aromatique
24	17.591	7.17	Triméthylcinnamate	Ester d'acide aromatique
25	24.946	0.94	Scopolin	Glucoside
26	25.733	0.32	Thymol	Monoterpène phénol

Tableau 8: Composition chimique des extraits aqueux de propolis Algérienne prélevés à Boutaleb (BoA) identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse.

No	R.T	Surface du pic %	Nom du composé	Nature du composé
2	4.956	0.19	Formamide, N,N-diéthyl ester	Diéthyl ester
3	5.838	1.39	Acide 3-buténoïque, ester 3-méthylque	Méthyl ester
4	9.744	0.39	Ether de glycérol	Lipide d'éther
5	10.012	0.51	Butane	n-alkanes
6	10.315	0.39	Isoquinoline, 1-butyl-	Composé organique hétérocyclique
7	11.342	0.89	Cinnoline, 4-ethyl-3-methyl-	Composé organique hétérocyclique
8	11.611	1.09	Acide benzènepropanoïque	Acide aromatique
9	12.437	0.71	Acide 3-méthoxybenzoïque	Acide aromatique
10	12.795	2.72	Xylitol	Alcool de sucre
11	13.278	0.64	1-(3H-Imidazol-4-yl)-éthanone	Composé organique hétérocyclique
12	13.732	0.67	Acide Coumarin-3-carboxylique, l'ester 8-allylique, cyclohexylique	Agent aromatisant aromatique
13	14.029	0.52	Acide 3-chloro-2-fluorobenzoïque	Acide aromatique
14	14.552	0.57	L-Proline	Acide aminé-α
15	15.592	0.81	Morphinan-6-one, 3,4-diméthoxy-	Dérivés d'Alcaloïde
16	16.171	1.59	l-Mannopyranose	Glucide
17	16.522	1.69	D-Glucose	Glucide
18	16.998	1.13	alpha.-l-Galactofuranoside	Glucide
19	17.211	0.75	Carbamazepine	Composé organique hétérocyclique
20	17.501	0.67	Acide 4-Hydroxymandelique	Acide aromatique
21	17.735	1.04	3-Methyl-1-phenyl-2-azafluorène	Composé organique hétérocyclique
22	18.548	0.82	4-Aminobenzo[g]quinazoline	Composé organique hétérocyclique
23	18.782	4.12	Acide 2,3,4-triméthyl-mandélique	Acide aromatique
24	19.974	0.39	gamma.-Elemène	Sesquiterpenes
25	20.704	0.37	Acide 2,3,5-triméthyl-mandélique	Acide aromatique
26	21.551	0.79	Acide Pimarique	Diterpène
27	22.378	0.73	Méthylène bisaspidinol	Hydroxycétone aromatique
28	22.771	0.42	Acide cinnamique	Acide aromatique

Annexe II

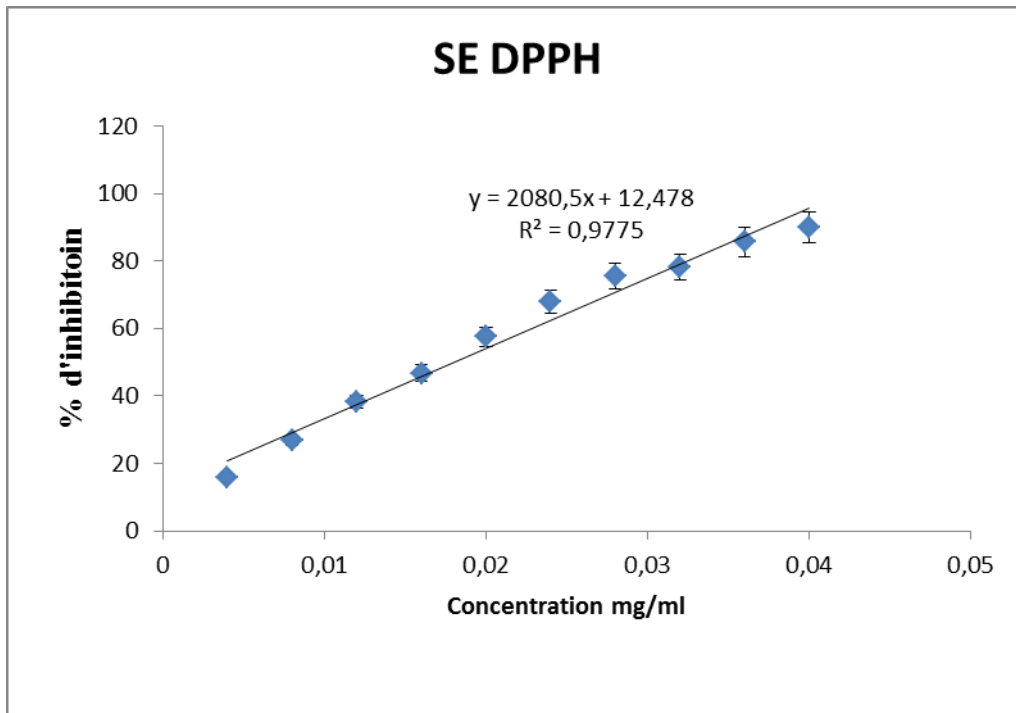


Figure 1: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait SE.

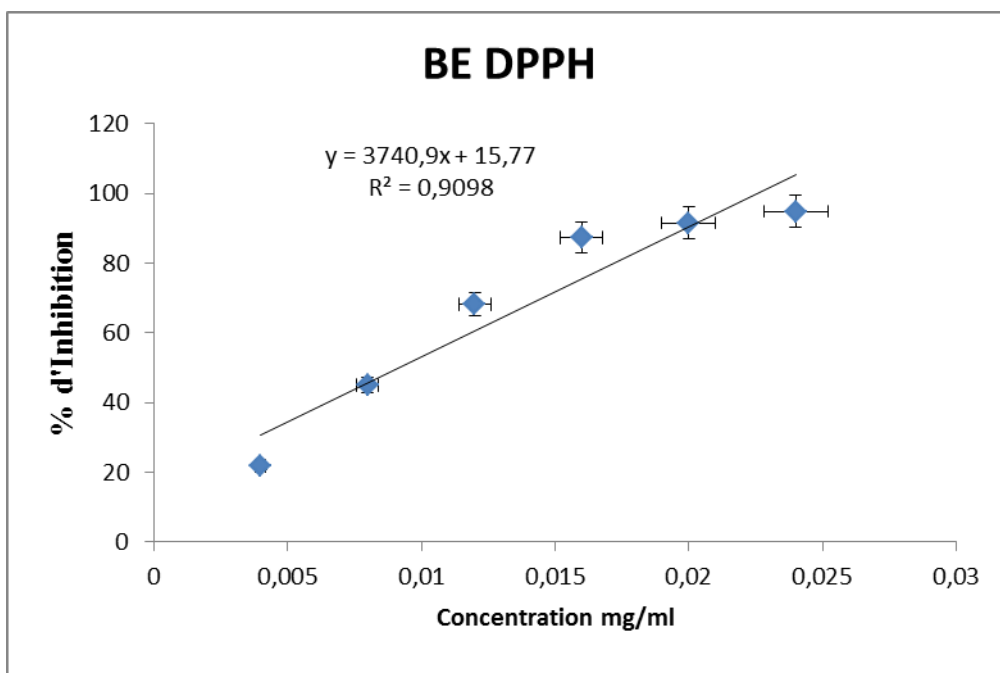


Figure 2 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait BE.

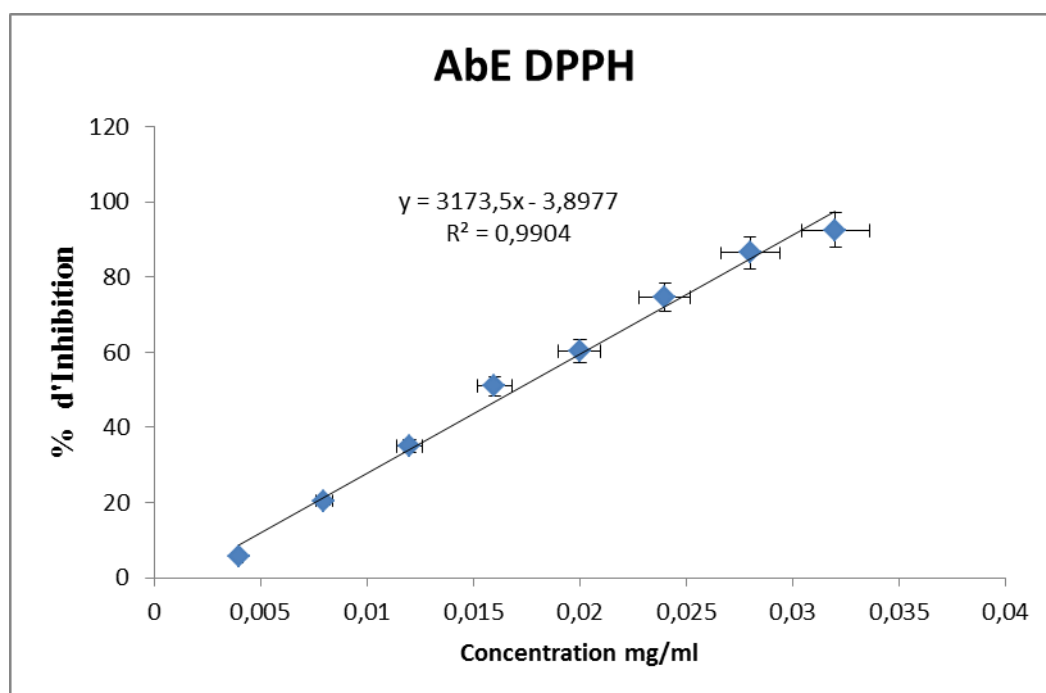


Figure 3 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait AbE.

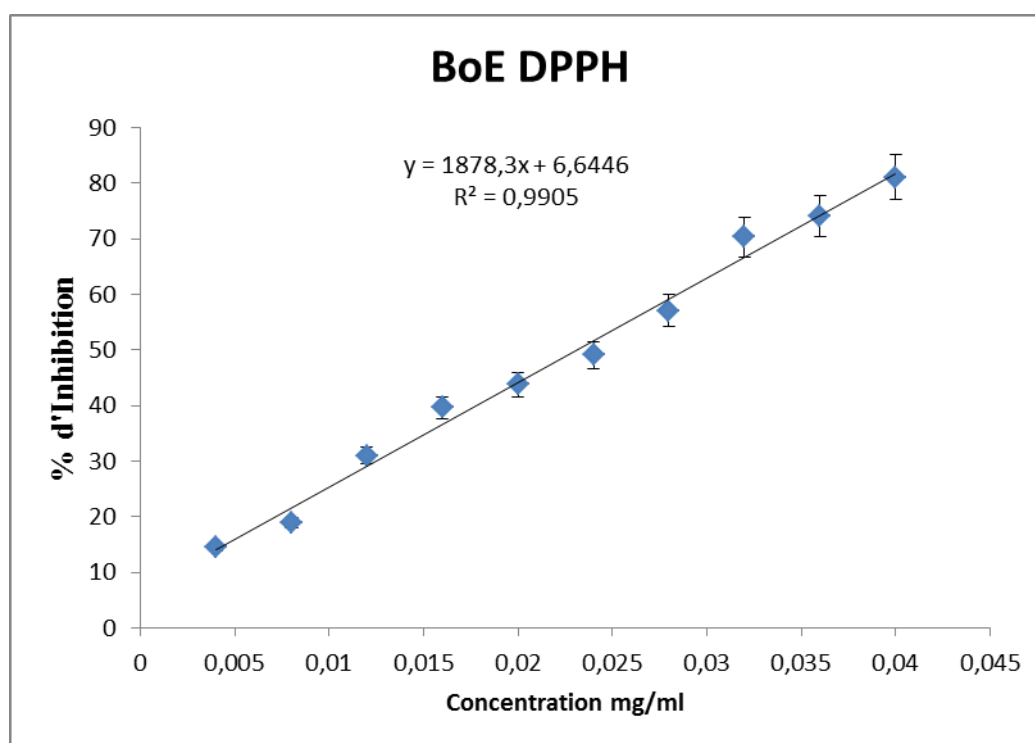


Figure 4 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait BoE.

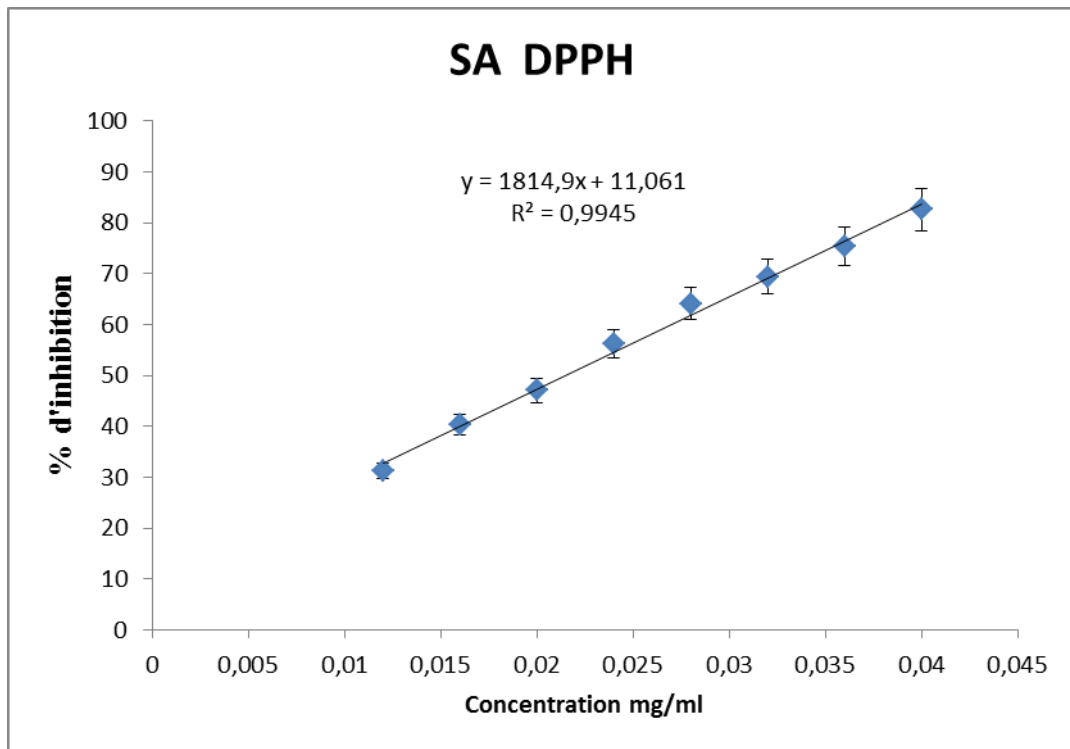


Figure 5 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait SA.

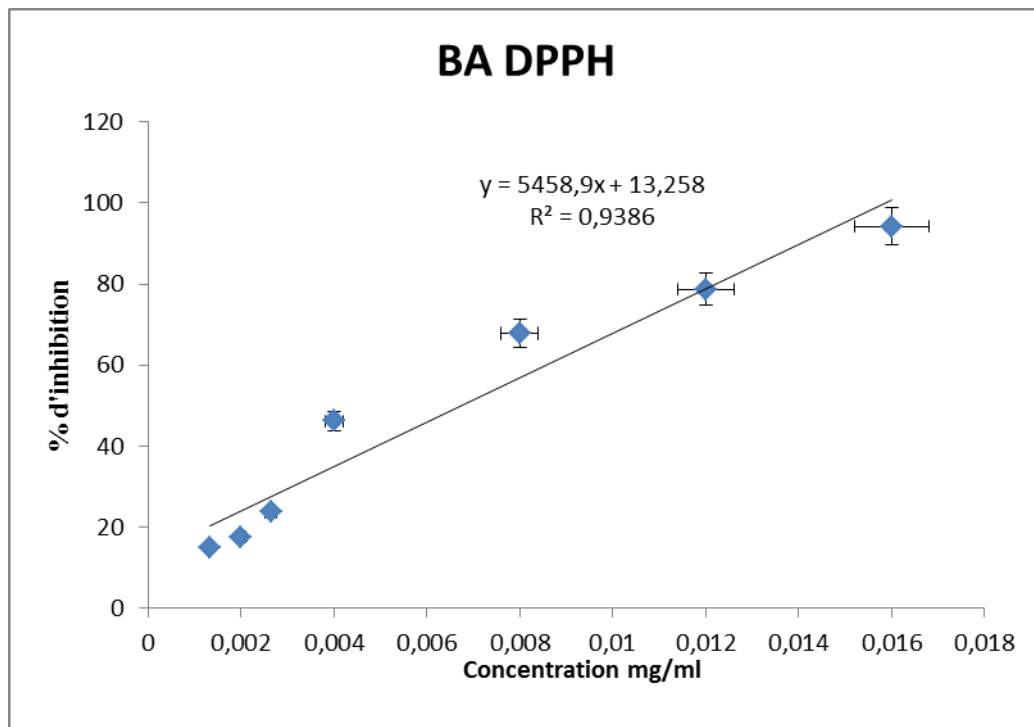


Figure 6 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait BA.

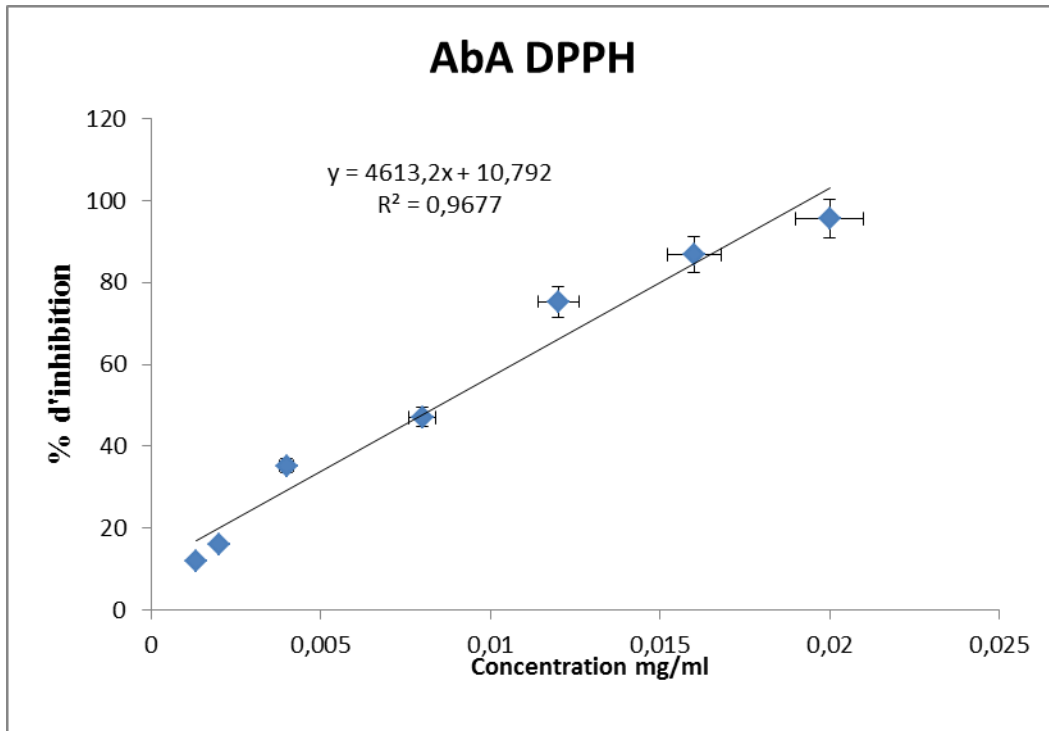


Figure 7 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait AbA.

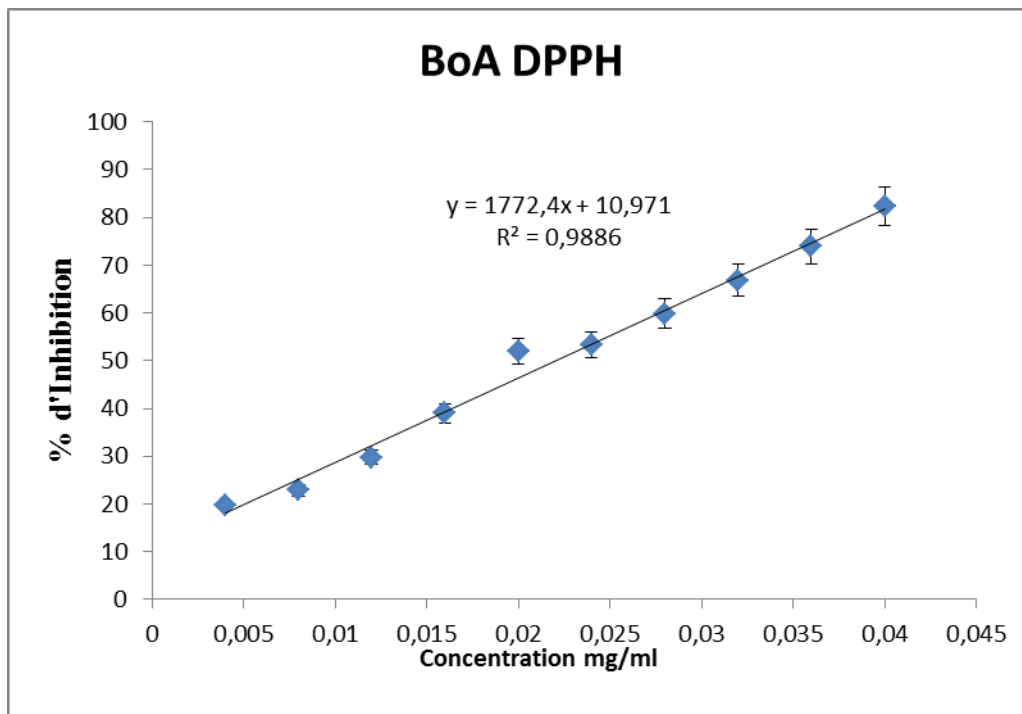


Figure 8 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait BoA.

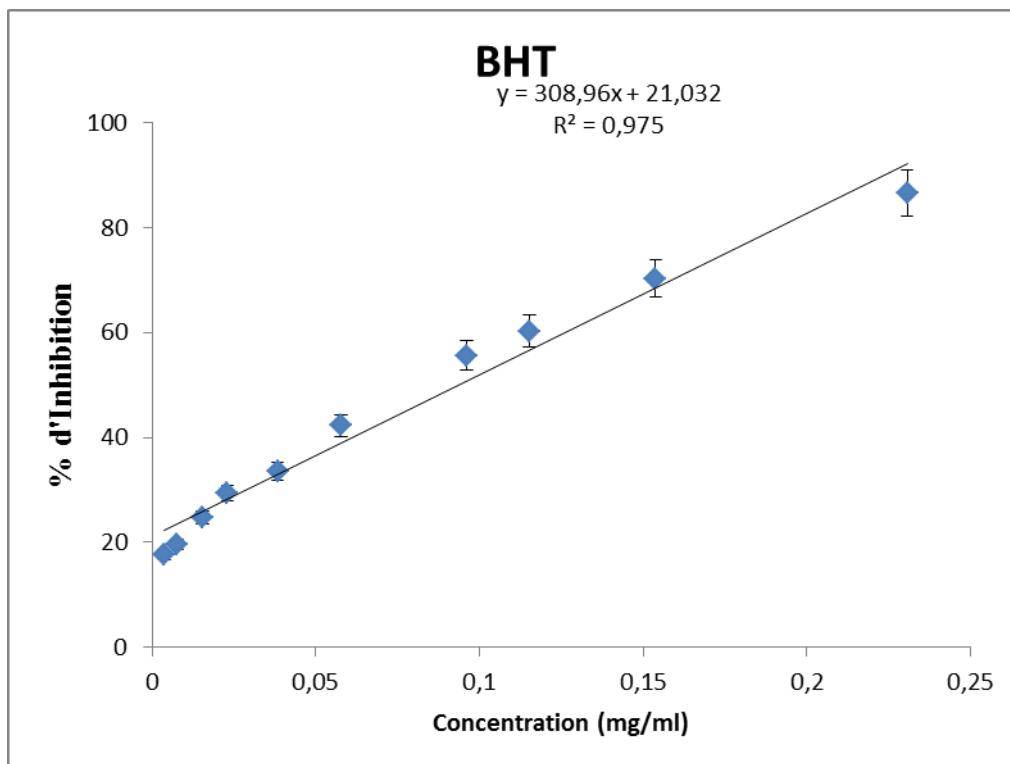


Figure 9 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHT.

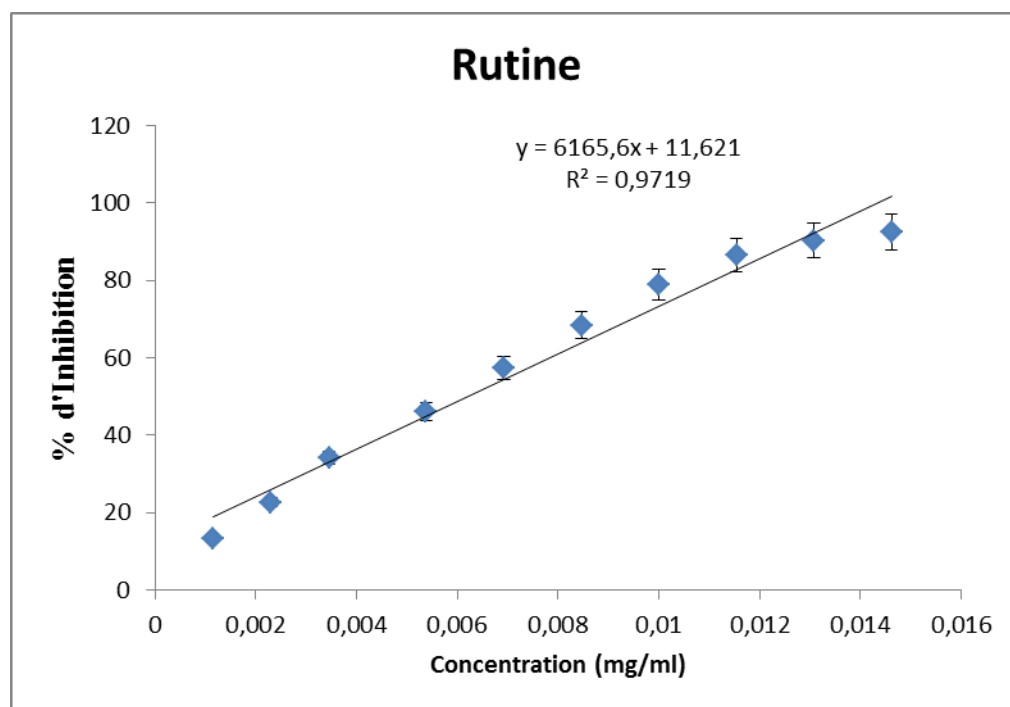


Figure 10 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de Rutine.

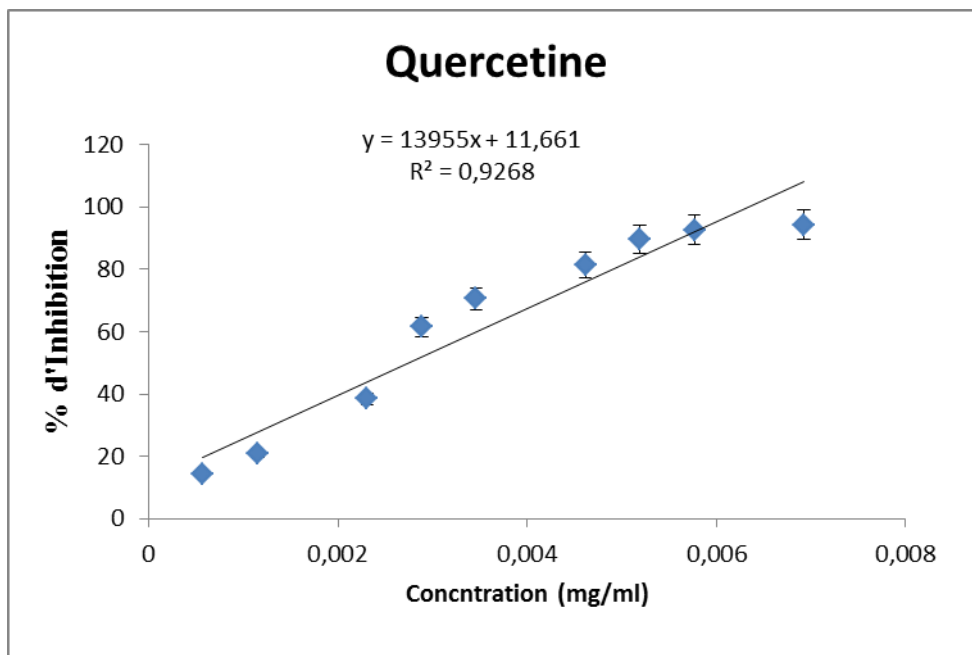


Figure 11 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de Quercetine.

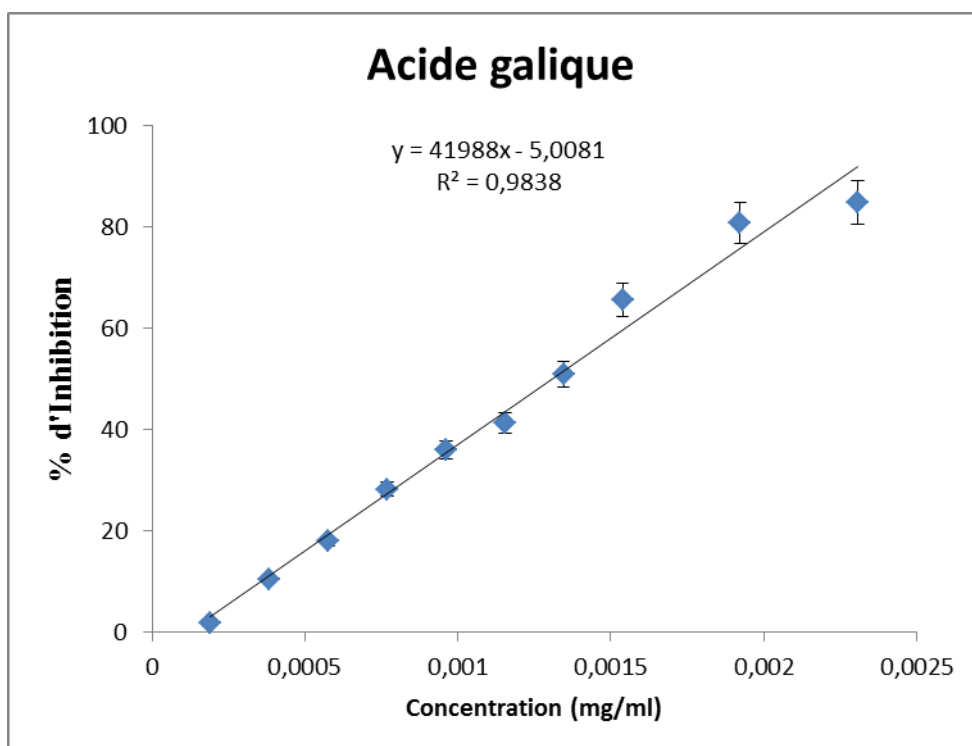
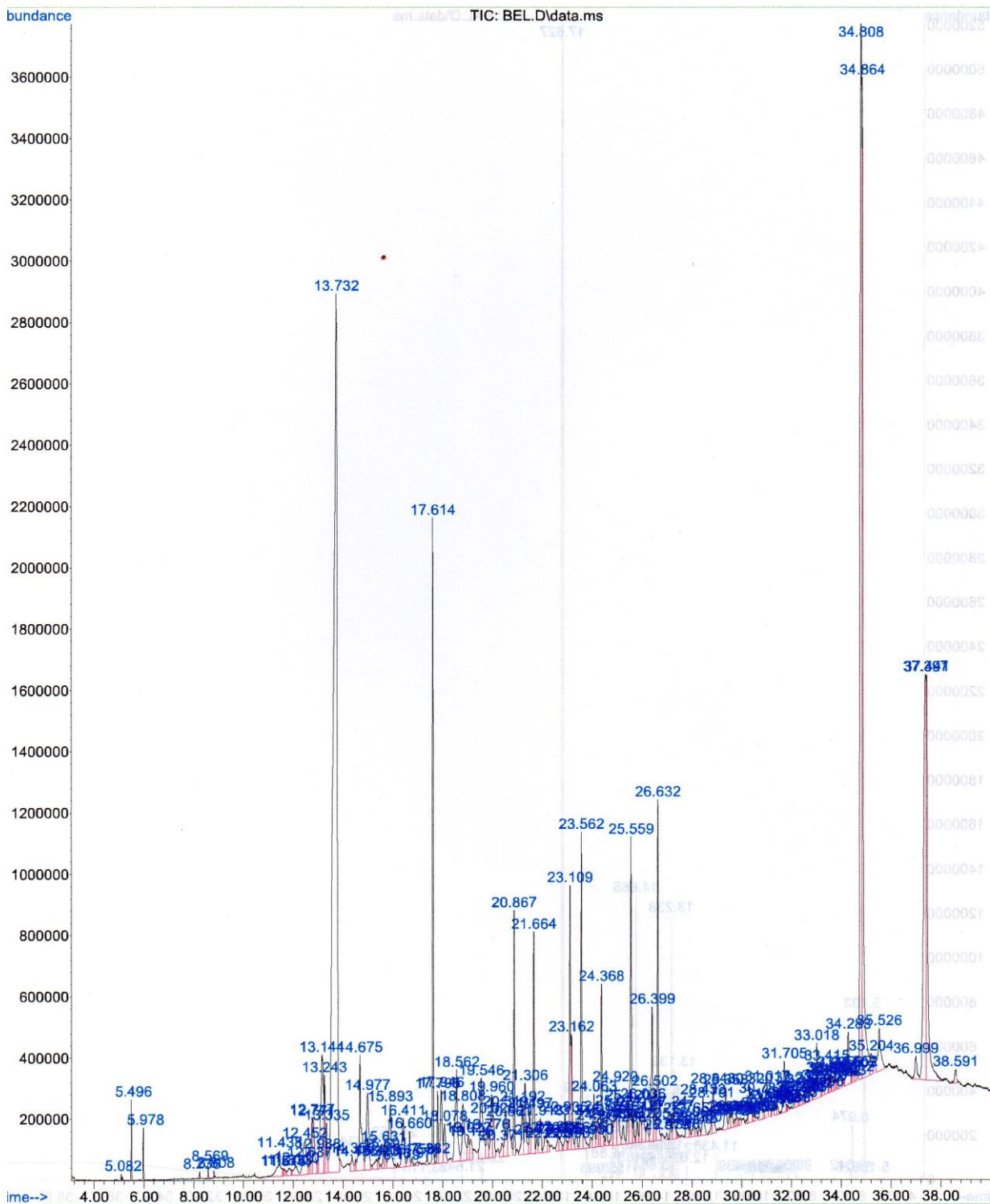


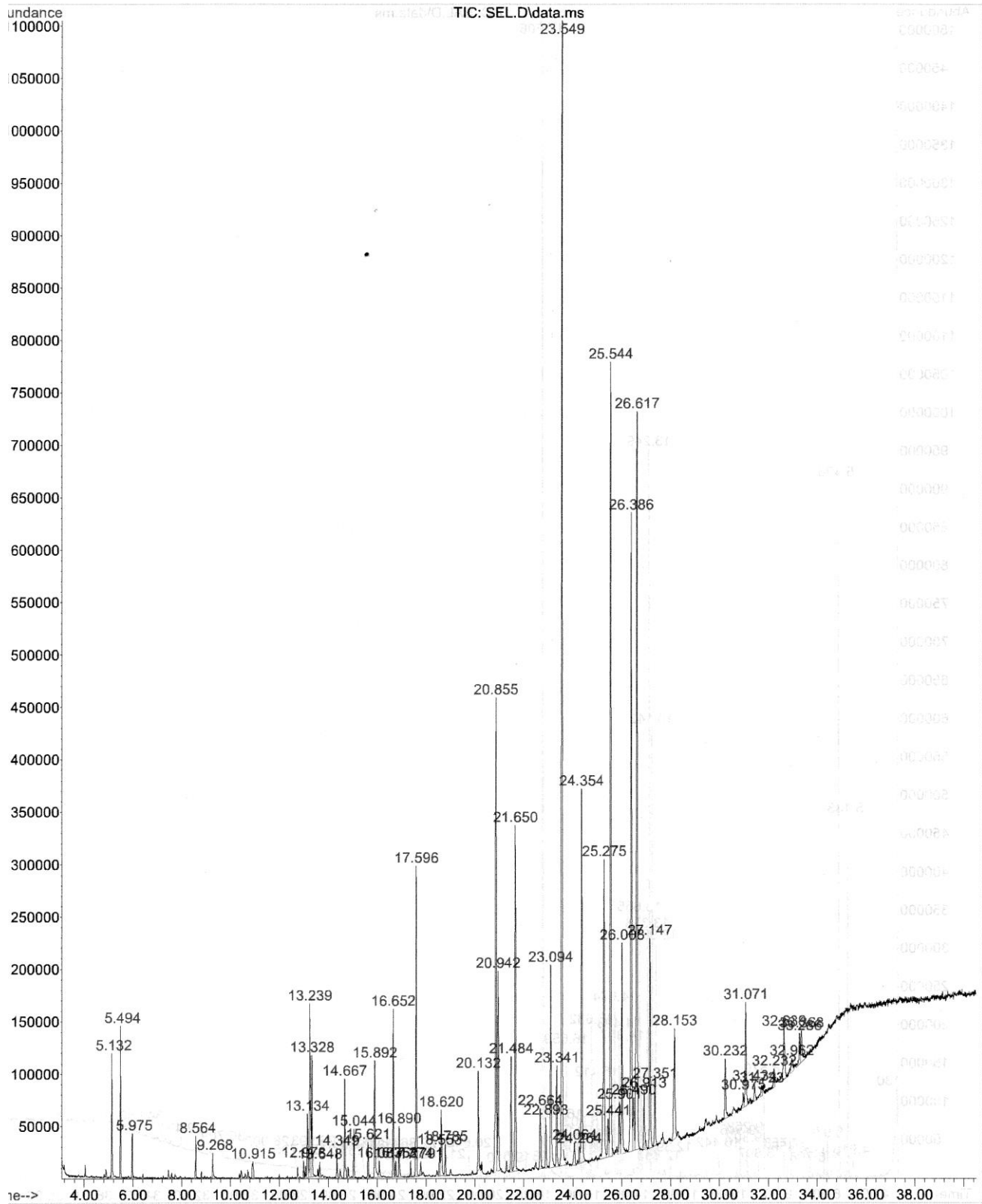
Figure 12 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration d'acide gallique.

acquired : 27 Jun 2013 14:38:10 using AcqMethod PROPOLEO.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: BEL
 Disc Info :
 File Number: 3

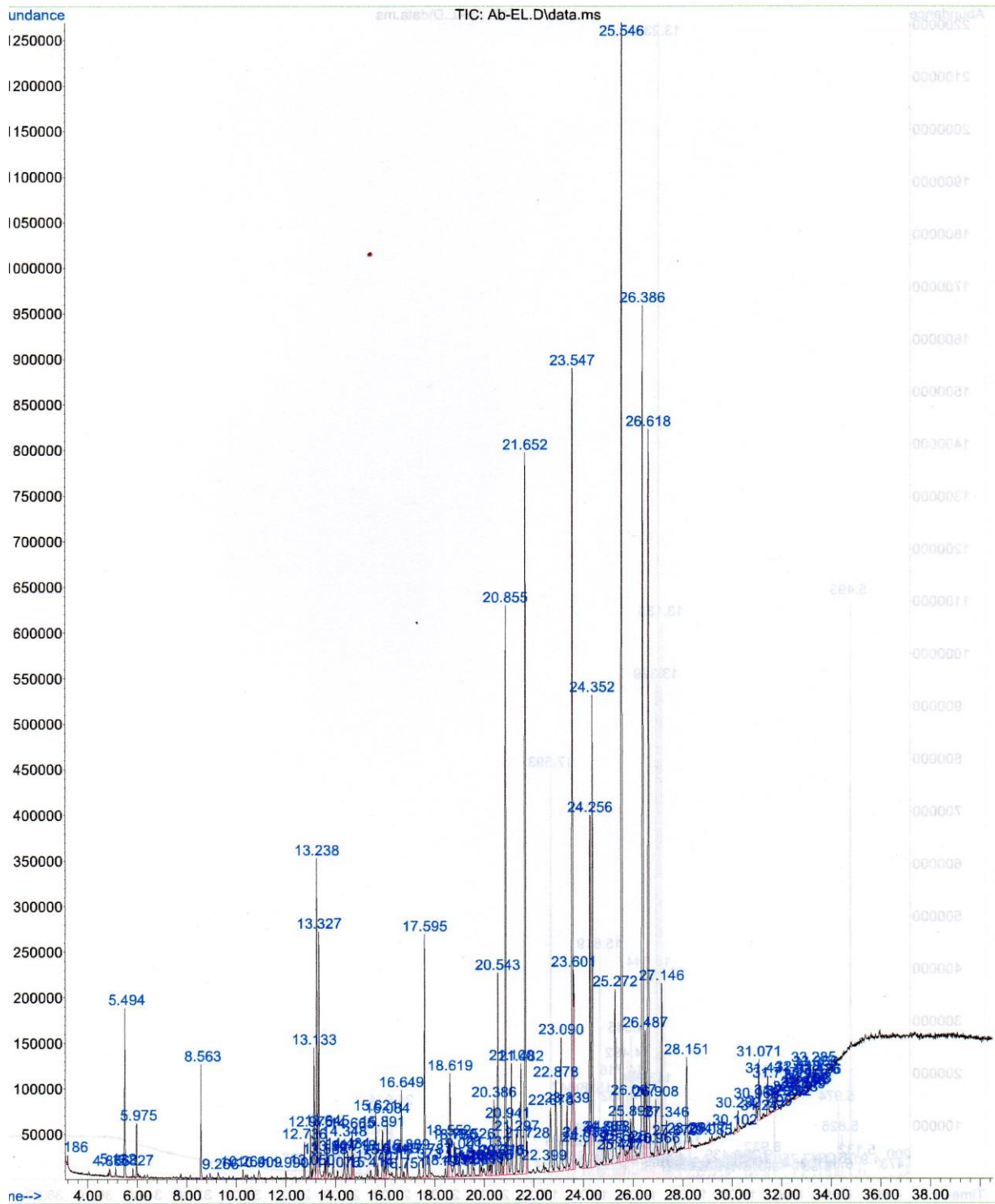


Required : 27 Jun 2013 17:44 using AcqMethod PROPOLEO.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name : SEL
 Sample Info :
 Sample Number : 7

File Name :
 File Path :
 File Size :
 File Date :
 File Time :



Required : 27 Jun 2013 19:14:33
 Instrument : GCMSD
 Sample Name : Ab-EL
 Misc Info :
 Vial Number : 1



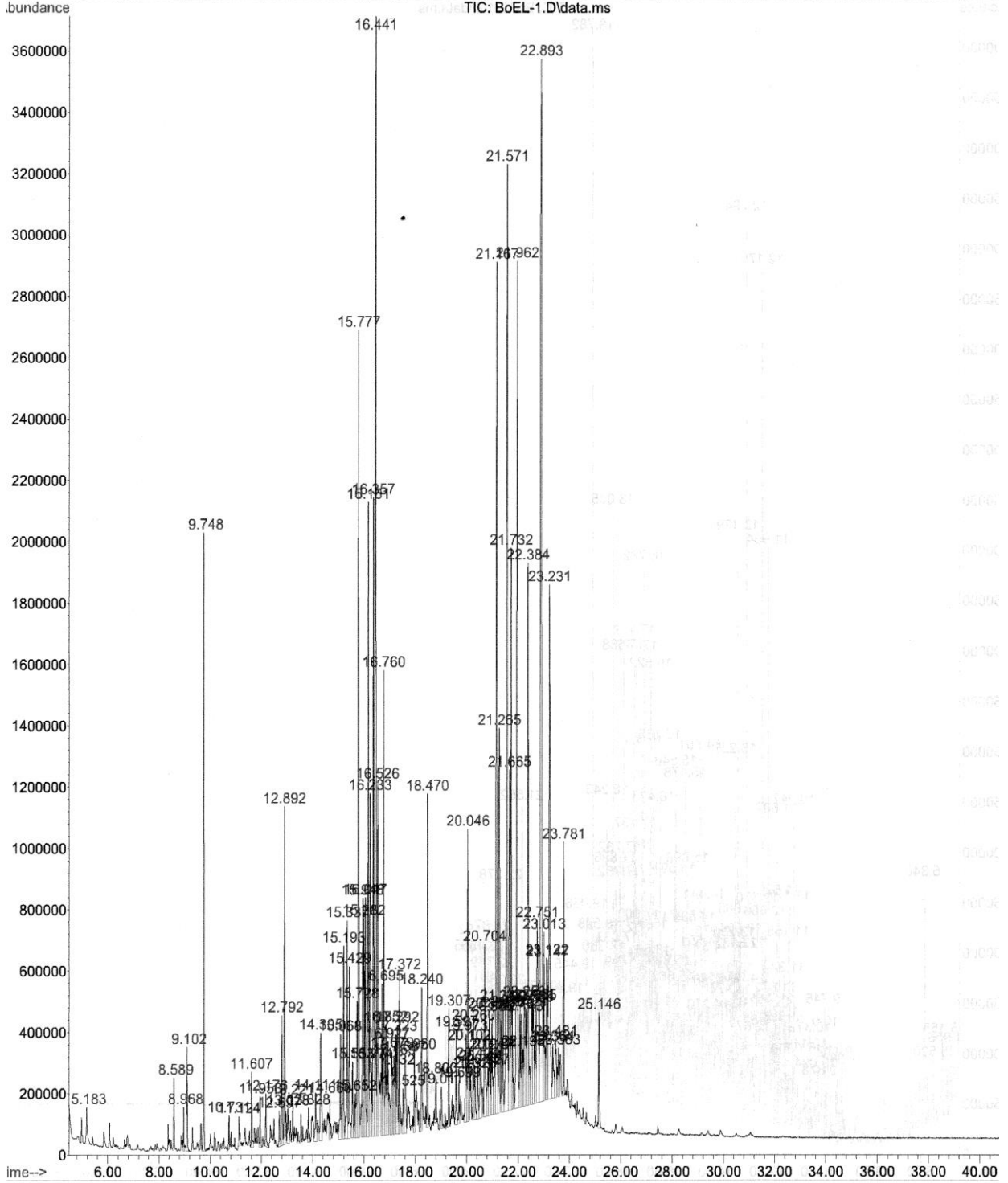
Sample : BoEL
Misc :
ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST08.L

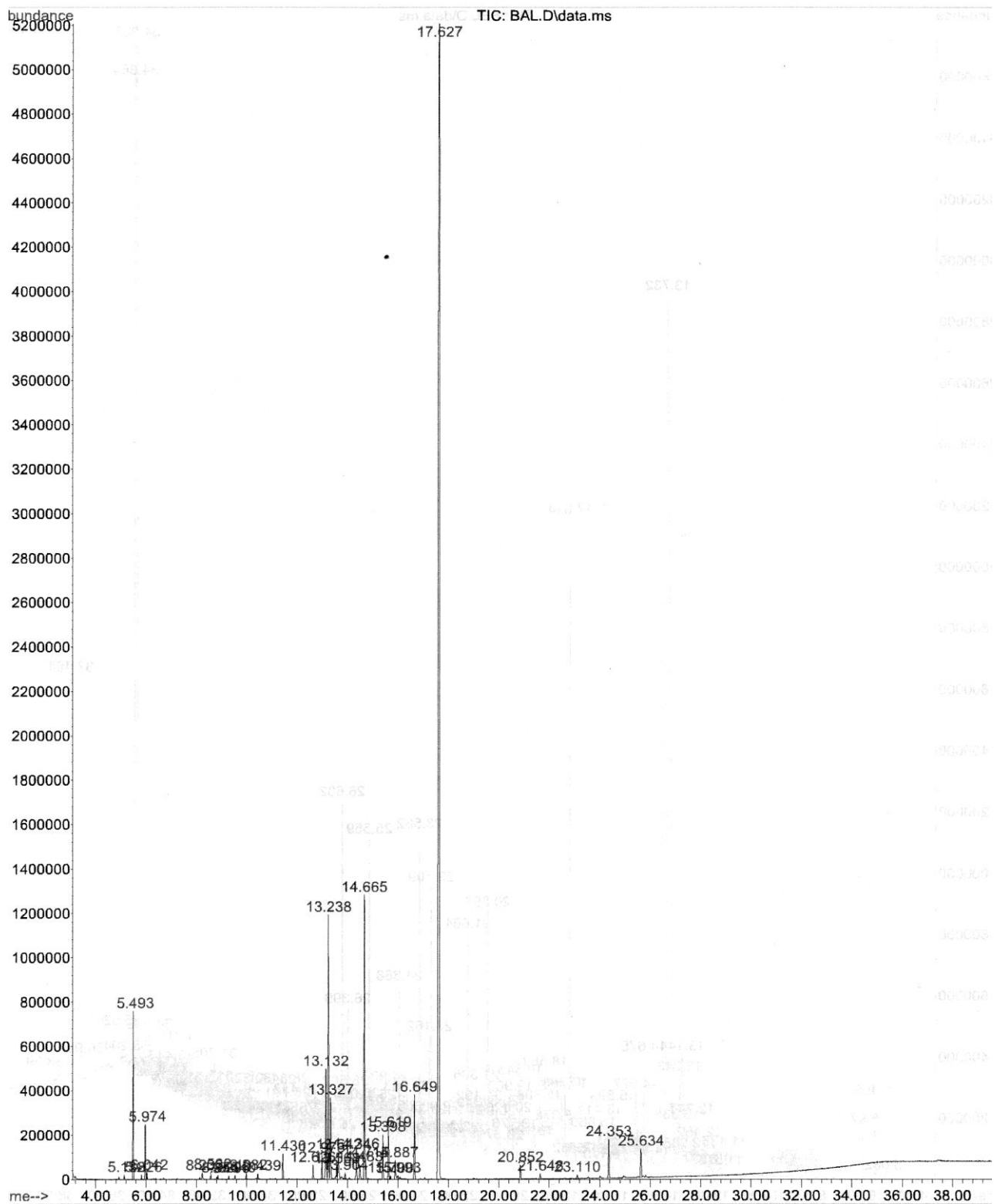
Minimum Quality: 99

Unknown Spectrum: Apex minus start of peak

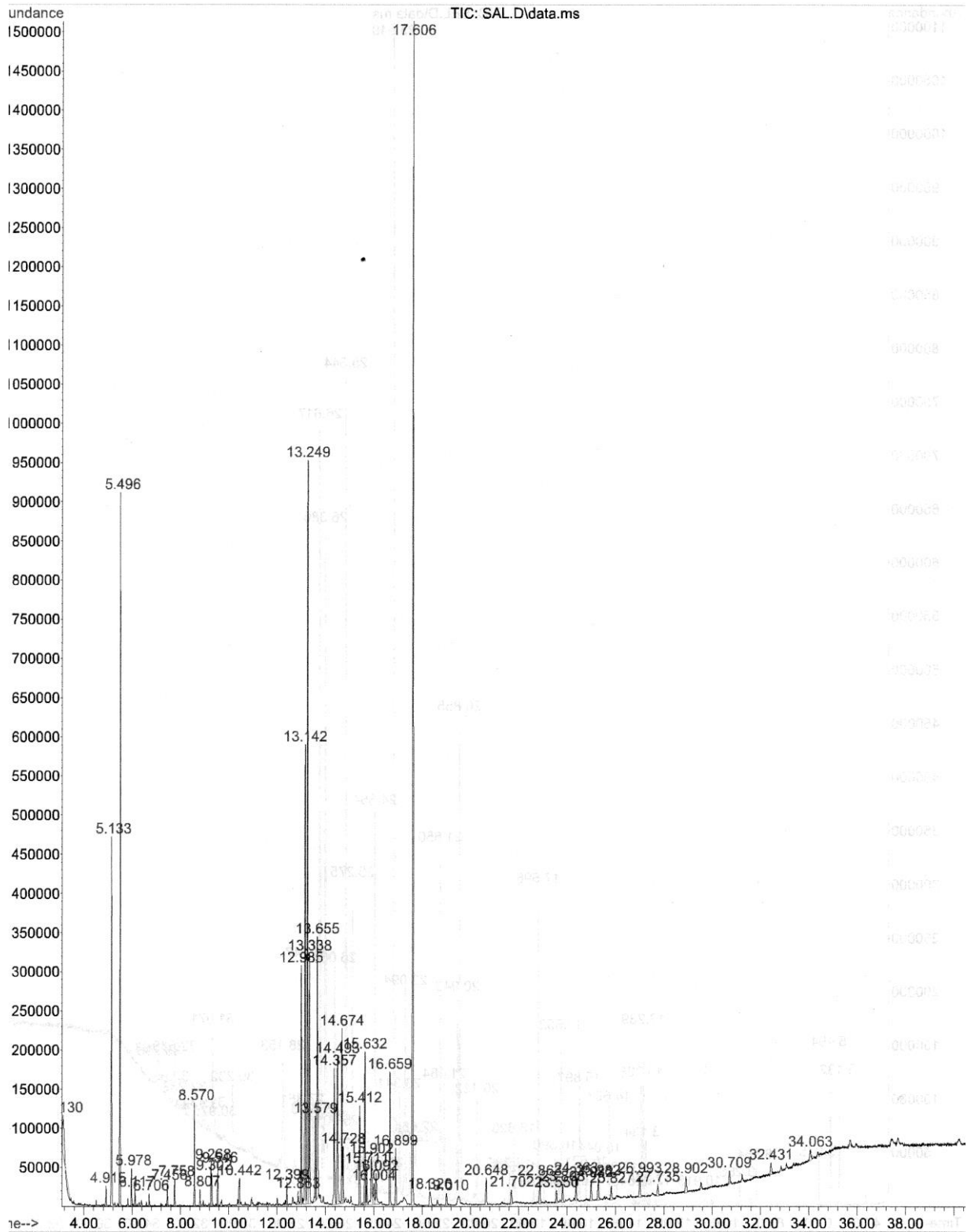
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e



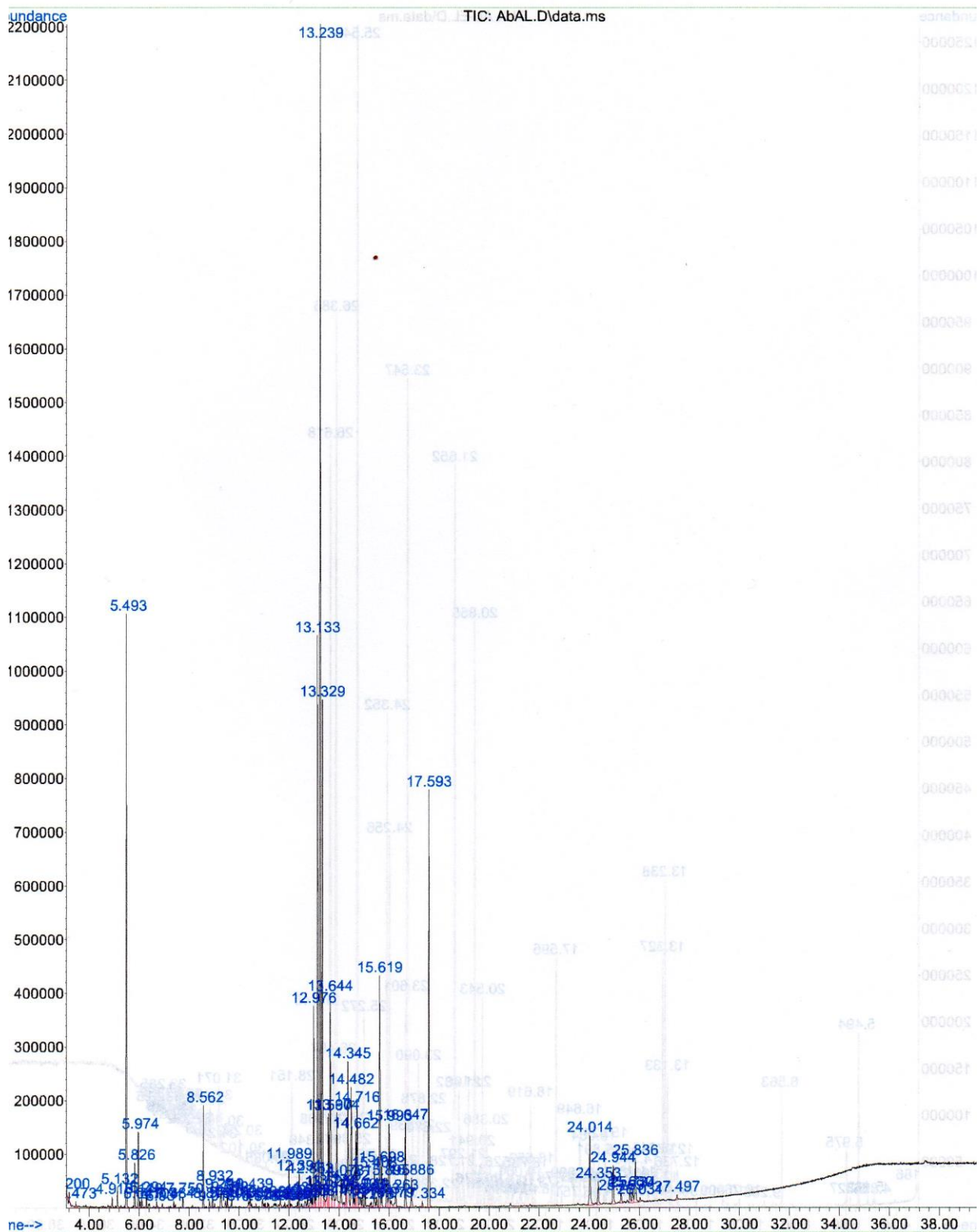
acquired : 28 Jun 2013 19:13:00 using AcqMethod PROPOLEO.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name : BAL
 Disc Info :
 File Number : 5



Required : 1 Jul 2013 9:54 AM using AcqMethod PROPOLEO.M
 Instrument : GCMSD
 Sample Name: SAL
 .sc Info :
 .al Number: 1



Required : 28 Jun 2013 18:28:10 using AcqMethod PROPOLEO.MPI
 Instrument : GCMSD
 Sample Name : AbAL
 Asc Info :
 File Number : 4



Sample : BoAL
Misc :
ALS Vial : 3 Sample Multiplier: 1

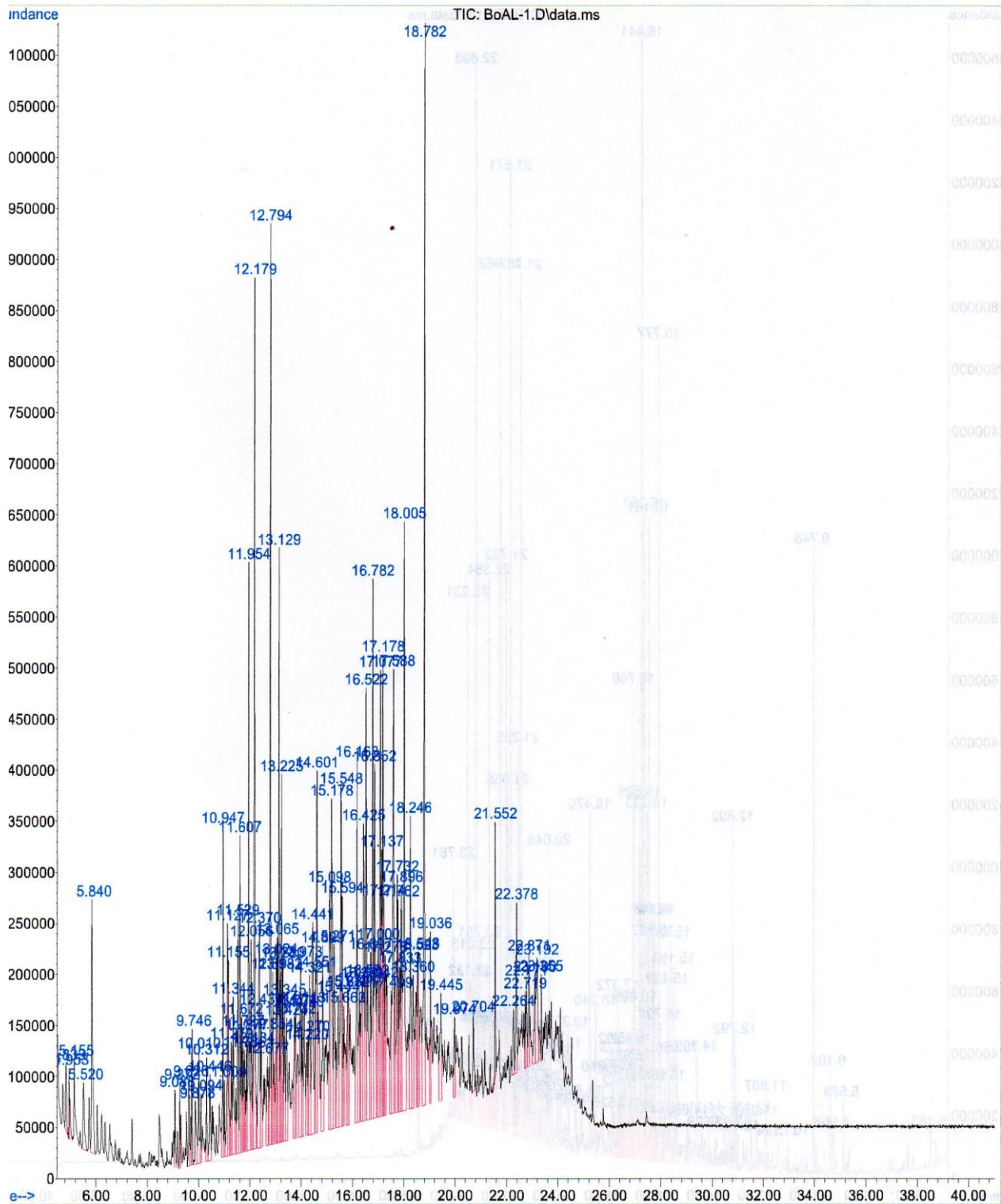
Sample : BoAL
Misc :
ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST08.L

Minimum Quality: 99

Unknown Spectrum: Apex minus start of peak

Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e





Full length article

Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses



EL-Khamsa Soltani ^a, Rebeca Cerezuela ^b, Noureddine Charef ^a,
Samia Mezaache-Aichour ^c, Maria Angeles Esteban ^{b, *}, Mohamed Mihoub Zerroug ^c

^a Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas Setif 1, Algeria

^b Fish Innate Immune System Group, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

^c Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas Setif 1, Algeria

article info

Article history:

Received 9 October 2016

Received in revised form

28 December 2016

Accepted 6 January 2017

Available online 9 January 2017

Keywords:

Algerian propolis extracts

GCeMS analysis

Bactericidal activity

Innate immunity

Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)

Teleosts

abstract

Propolis has been used as a medicinal agent for centuries. The chemical composition of four propolis samples collected from four locations of the Setif region, Algeria, using gas chromatography-mass spectrometry was determined. More than 20 compounds and from 30 to 35 compounds were identified in the aqueous and ethanolic extracts, respectively. Furthermore, the antimicrobial activity of the propolis extracts against two marine pathogenic bacteria was evaluated. Finally, the in vitro effects of propolis on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocyte activities were measured. The bactericidal activity of ethanolic extracts was very high against *Shewanella putrefaciens*, average against *Photobacterium damsela* and very low against *Vibrio harveyi*. The lowest bactericidal activity was always that found for the aqueous extracts. When the viability of gilthead seabream head-kidney leucocytes was measured after 30 min' incubation with the different extracts, both the ethanolic and aqueous extracts of one of the propolis samples (from Babor) and the aqueous extract of another (from Ain-Abbassa) provoked a significant decrease in cell viability when used at concentrations of 100 and 200 mg ml⁻¹. Furthermore, significant inhibitory effects were recorded on leucocyte respiratory burst activity when isolated leucocytes were preincubated with the extracts. This effect was dose-dependent in all cases except when extracts from a third propolis sample (from Boutaleb) were used. Our findings suggest that some of Algerian propolis extracts have bactericidal activity against important bacterial pathogens in seabream and significantly modulate in vitro leucocyte activities, confirming their potential as a source of new natural biocides and/or immunomodulators in aquaculture practice.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Propolis is a natural brownish-green resinous product collected by honey bees. The word is derived from the Greek *pro* (before) and *polis* (city). Propolis is used to make the protective shield at the entrance of beehives and its use by man dates back to ancient times, when the product was employed in embalming bodies in Egypt [1]. It is also used to fill the cracks in the hive, to attach the corners of frames to the grooves in the hive, and also to polish the cells of the honeycomb. The bodies of dead lizards, snakes and mice that are entered hives are sealed into the walls with bee glue, thereby

protecting the colonies against the unpleasant odour and bacterial flora of the putrefying corpses [2]. The chemical composition of propolis is highly variable and complex, due to the biodiversity of the vegetation of each region visited by bees [3e11]. Therefore, the composition of propolis from different phyto-geographical areas are expected to vary and as a consequence, the intensity or presence of some biological activities also vary [9,11]. However, even within the same country, the propolis composition may be qualitatively and quantitatively different depending on the region and time of collection [3]. In Brazil, for instance, some authors have reported that propolis from different regions could be classified chemically into 12 types [12].

Among the numerous groups of substances identified in propolis samples from different localities, the most common are aromatic acids and esters, chalcones, flavonoids, terpenoids, and wax

* Corresponding author.

E-mail address: aesteban@um.es (M.A. Esteban).

acids. Furthermore, most of the biological activities of propolis have been attributed to these compounds, especially the flavonoids [8,12e17]. Furthermore, the antimicrobial activities of propolis have usually been attributed to the flavonoids, although other components present in propolis may also exhibit inhibitory actions against microorganisms [18e20]. In addition to its antimicrobial activity, other biological and pharmacological properties have also been demonstrated to propolis, including anti-inflammatory, anti-tumor, cytotoxic, hepatoprotective, antioxidant, hemato-stimulative, and immunomodulatory activities [21e24]. Aquaculture is the fastest growing sector of food production in the world [25]. In large production facilities, where aquatic animals are exposed to stress conditions, problems related to disease often occur, resulting in serious economic losses. Attempts to prevent or at least control such diseases have also led to a substantial increase in the use of veterinary products and practice [26], including chemotherapeutics and a limited number of vaccines. However, use of antibiotics has been seriously criticized for the antibiotic resistant bacterial strains that may develop; in addition, oxytetracycline can depress the natural immunity of fish, increasing the risk of infection of non-bacterial pathogens such as viruses, fungi and parasites. In this context, vaccines are usually delivered via injection rather than by dietary supplementation or immersion. In the last decade, research into immuno-stimulants in fish has grown because of the wide range of parasites, fungi, viruses and, especially, bacteria that affect fish production [27]. Immuno-stimulants mainly enhance the non-specific immune response of fish and are generally structural components of algal, bacterial or yeast cell walls, the focus on natural products increasing [28]. Taking all these considerations into account, the present work was designed to study the chemical composition, the bactericidal activity and effects on gilthead seabream innate immune responses of eight extracts (ethanolic and aqueous) of Algerian propolis obtained from four sites in the Setif region. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes were used as a model since seabream is one of the most important fish in aquaculture.

2. Material and methods

2.1. Propolis

Four raw Algerian propolis samples were collected from different geographical region during the years 2011e2014, by scraping the sample off from the frames of beehives located in four different sites in Setif region (eastern Algeria): Babor (B), Setif (S), Ain-Abbassa (Ab) and Boutaleb (Bo). The samples were kept in the dark and stored at 4 °C until use.

The ethanolic extraction was developed according to [29]. Briefly, 30 g of propolis sample were kept in 100 mL of 70% ethanol at room temperature for a week and the ethanol phase was filtered, evaporated at 50 °C and then freeze-dried. The resulting powder was used for further studies. These samples were named as B.E, S.E, Ab.E, Bo.E, respectively. For the preparation of aqueous extracts, 50 g of raw propolis were dissolved in 150 mL distilled water, and mixed by magnetic stirrer for 48 h. The resulting aqueous-water extract was filtered and evaporated under vacuum [30]. These samples were named as B.A, S.A, Ab.A, Bo.A, respectively.

2.2. Gas chromatography-mass spectrometry

The Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analysis was carried out according to [31]. Samples of 5 mg of the residue were mixed with 50 mL of dry pyridine and 75 mL N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide, heated at 80 °C for 20 min and analyzed by GC-MS (Hewlett Packard Gas Chromatography 6890 Series II Plus

linked to Hewlett Packard 6972 mass spectrometer system equipped with an HP5-MS capillary column, 30 m long, 0.25 mm i.d. and 0.5 mm film thickness). The temperature was programmed from 100 to 325 °C at a rate of 5 °C min⁻¹. Helium was used as a carrier gas with a flow rate of 20 mL min⁻¹. The split ratio was 50:1 and injector temperature 280 °C.

The identity of the components in the extracts was assigned by the comparison of their retention indices and mass spectra fragmentation patterns with those stored on the computer library and also with those published in the literature. NIST08.LIB [32], WILEY275.LIB [33] library sources were used to match the identified components from the plant material.

2.3. Fish and sampling

Twelve specimens of gilthead seabream (*S. aurata*) were obtained from a local fish farm (Murcia, Spain) and kept in running seawater aquaria (flow rate 1500 l h⁻¹) at 28‰ salinity, 20 °C and with a 12 h light: 12 h dark photoperiod. The animals were fed with a commercial pellet diet (Skretting, Spain) at a rate of 1% bw day⁻¹. Animals were acclimated for 15 days prior to the experiments. The Ethical Committee of the University of Murcia approved the studies described.

For the in vitro study, fish were anaesthetized with 100 mg L⁻¹ MS222 (Sandoz). After bleeding, the head-kidney (HK) leucocytes were isolated from each fish under sterile conditions. Briefly, the HK was excised, cut into small fragments and transferred to 8 mL of sRPMI [RPMI-1640 culture medium (Gibco) supplemented with 0.35% sodium chloride (to adjust the medium's osmolarity to gilthead seabream plasma osmolarity of 353.33 mOs), 2% foetal calf serum (FCS, Gibco), 100 i.u. mL⁻¹ penicillin (Flow) and 100 mg mL⁻¹ streptomycin (Flow)] [34]. Cell suspensions were obtained by forcing fragments of the organ through a nylon mesh (mesh size 100 µm), washed twice (400 g, 10 min), counted and adjusted to 2 × 10⁷ cells mL⁻¹ in sRPMI.

2.4. Effects of propolis extracts on head kidney leucocytes

Isolated HK leucocytes were incubated without (control) or with different concentrations of propolis extracts. For this, aliquots of leucocytes were dispensed into wells of flat-bottomed 96-well microtitre plates (Nunc) and incubated with propolis extracts (100 and 200 mg mL⁻¹) for 30 min at 22 °C, with 85% relative humidity and 5% CO₂ atmosphere.

2.4.1. Viability

To determine whether propolis extracts affect *S. aurata* HK leucocyte viability, HK leucocytes incubated with different propolis extract concentrations, as explained above, were placed in 5 mL tubes (Falcon, Becton Dickinson). Afterwards, 40 mL of propidium iodide (PI) (400 mg mL⁻¹, Sigma) were added to each sample. The tubes were gently mixed before analysis in a FACScan (Becton Dickinson) flow cytometer with an argon-ion laser adjusted to 488 nm. Analyses were performed on 5000 cells, which were acquired at a rate of 300 cells s⁻¹. Data were collected in the form of two-parameter side scatter (granularity) (SSC) and forward scatter (size) (FSC) and red fluorescence (FL2) dot plots or histograms were made on a computerised system. Dead cells were estimated as the percentage of cells with propidium iodide (red-PI fluorescent cells, PI^B).

2.4.2. Respiratory burst activity

The respiratory burst activity of gilthead seabream HK leucocytes was studied by a chemiluminescence method [35]. Briefly, 50 mL of HBSS containing 1 mg mL⁻¹ phorbol myristate acetate

(PMA, Sigma) and 10^{-4} M luminol (Sigma) was added to each HK leucocytes sample (previously incubated with different concentrations of propolis extracts). The plate was shaken and immediately read in a plate reader for 1 h at 2 min intervals. The kinetics of the reactions was analyzed and the maximum slope of each curve was calculated. Luminescence backgrounds were calculated using reagent solutions containing luminol but not PMA.

2.4.3. Peroxidase activity

The peroxidase activity of gilthead seabream HK leucocytes was measured according to [36]. Briefly, HK leucocytes incubated with different propolis extract concentrations were lysed with 50 ml of 0.002% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB; Sigma) before 100 mL of 10 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB, Sigma) and 5 mM H₂O₂ were added. The colour-change reaction was stopped after 2 min by adding 50 ml of 2 M sulphuric acid and the optical density was read at 450 nm in a plate reader. Standard samples without leucocytes were used as blanks.

2.5. Bactericidal activity of propolis extracts

Two marine opportunistic pathogenic bacteria (*V. harveyi* and *P. damsela* subsp. *piscicida*) and one non-pathogenic bacterium (*S. putrefaciens*) for gilthead seabream were used to determine the bactericidal activity present in the propolis extracts. Bacteria were grown in agar plates at 25 °C in tryptic soy (TSB, Sigma). Then, fresh single colonies of 1e2 mm were diluted in 5 mL of appropriate liquid culture medium and cultured for 16 h at 25 °C on an orbital incubator at 200e250 rpm. The antimicrobial activity of the propolis extracts was determined by evaluating their effects on the bacterial growth curves using the method described by Ref. [37] with some modifications. Aliquots (10 mL) of each of the bacterial dilutions (1/10) were placed in flat-bottomed 96-well plates and incubated with equal volumes of propolis extracts (final concentration 500 mg mL⁻¹) for 2 h. The OD of the samples was measured at 620 nm at 30 min intervals during 24 h at 25 °C. Samples without bacteria were used as blanks (negative control). Samples without propolis extracts were used as positive controls (100% growth or 0% bactericidal activity).

2.6. Statistical analysis

Data were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) to test differences between all treatments and a post-hoc test (Student-Newman-Keuls) comparison of means was used to determine the differences between two groups when necessary. The assumptions of homogeneity of variances and normality were checked using the Levene and Kolmogorov-Smirnov/Shapiro Wilk tests respectively. Non-normally distributed data were log-transformed prior to analysis and a non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by a multiple comparison test, was used when data did not meet parametric assumptions. Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics 20 software. Differences were considered statistically significant at a 95% of confidence level.

3. Results

3.1. Chemical composition of Algerian propolis

The GCeMS analysis of the propolis samples identified 30, 25, 31 and 35 compounds in the ethanolic extracts of propolis taken from Babor (BE), Setif (SE), Ain-Abbassa (AbE) and Boutaleb (BoE) (Tables 1e4), respectively. Similarly, 20, 21, 26 and 28 substances, respectively, were determined in the aqueous extracts of propolis from these localizations (Tables 5e8).

Identification of the phytochemical compounds by GC-MS was based on the peak area and retention time. In the present investigation a variety of compounds were detected in the propolis samples, including chrysin (flavonoid), 2⁰-O-methylcajanone (isoflavonoids), dehydroabietic acid, pimaric acid, abietic acid, hydroxydehydrostevic acid (diterpene), docosane, butane, octadecane (alkane hydrocarbon), hexadecanoic acid, nonahexacontanoic acid (n-alkanoic acids), cinnamic acid, benzoic acid, 2,3,5-trimethoxymandelic acid, 3-chloro2-fluorobenzoic acid (aromatic acid), lanostan-3-one, 11.beta.,18-epoxy- and Pregn-4-en-3-one, 17-hydroxy-, (17.alpha.) (tri-terpene), thymol (monoterpene phenol), gamma-elemene, beta-guaiene (sesquiterpenes), pagicerine, demecolcine, papaverine, aspidospermidine, thebaine, N,O-dimethylstephine and morpholine (alkaloids). The highest peak area (%) of 60.27 was obtained for trimethyl 3, 4-bis (trimethoxy) cinnamate (ester of aromatic acid) with a retention time of 17.628 in the BA sample (Table 5). By contrast, the lowest peak area (%) of 0.02 was obtained for ethyl (trimethylsilyl) succinate (ethyl ester) with a retention time of 5.081 in the same sample (Table 1). In addition to all these compounds, a variety of sugars and their acids, several alcohols and other compounds were also identified.

Alkaloids represented the highest proportion (13.82%) in AbE extract (8.68% morpholine and its derivatives and 5.14% thebaine and its derivatives), while the lowest alkaloid value was 0.44% in the BE extract (0.24% pagicerine and demecolcine 0.20%) (see Tables). On the other hand, the percentages of terpenes found in the propolis extracts varied considerably among the BE, AbE, BoE, AbA and BoA extracts. In the case of diterpenes, the percentages were 12.61% in BoE extract (4.69% pimaric acid; 4.65% abietic acid; 2.80% dehydroabietic acid and 0.47% hydroxydehydrostevic acid), 1.76% in AbE (1.09% pimaric acid; 0.30% abietic acid and 0.37% dehydroabietic acid) and just 0.79% of pimaric acid in BoA extract. Sesquiterpenes were present in small amounts in the AbE, BoE and BoA extracts (0.09% beta-guaiene; 0.83% gamma-elemene and 0.39% gamma-elemene, respectively).

3.2. Effects of propolis on head kidney leucocyte viability

The viability of HK leucocytes from gilthead seabream was measured after 30 min of incubation with the different propolis extracts. Our results show that B.E, B.A and Ab.A extracts provoked a significant decrease in leucocyte viability when used at concentrations of 100 and 200 mg mL⁻¹ (Fig. 1).

3.3. Effects of propolis on head kidney leucocyte respiratory burst activity

The respiratory burst activity was significantly lower in leucocytes incubated with any of the propolis extracts compared with the control group (Fig. 2). This effect was dose-dependent in all cases except when leucocytes were incubated with Bo.E or Bo.A extracts.

3.4. Effects of propolis on head kidney leucocyte peroxidase activity

Leucocyte peroxidase activity was also affected by the propolis extracts. The general trend was for the activity to increase after incubation with the propolis extracts at low concentrations and to decrease at high concentrations (compared with leucocytes from the control group) (Fig. 3). These increases were statistically significant in the case of Bo.E and B.A extracts at 1 mg mL⁻¹, whereas the B.A, S.A and Ab.A extracts at 200 mg mL⁻¹ provoked significant decreases in this activity (Fig. 3).

Table 1
Chemical composition of ethanolic extracts of Algerian propolis taken from Babor (BE) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	5.081	0.02	Ethyl(trimethylsilyl) succinate	Ethyl ester
2	5.493	0.24	Ether of glycerol	Ether lipid
3	5.981	0.15	Butanedioic acid	Dicarboxylic acid
4	8.237	0.03	Acetophenone	Aromatic ketone
5	8.568	0.05	Malic acid	Dicarboxylic acid
6	13.242	0.52	D-Fructose	Glucide
7	13.336	0.29	Sorbopyranose	Glucide
8	13.729	18.97	Pyrido[3 ^h :4 ^h :5,6]cyclohept [1,2-b]indole-5-carboxylic acid, 2-acetyl 1,2,3,4,4a,5,6,11,12,12a-decahydro-12a-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-12 methyl, .gamma.-lactone, acetate (ester)	Acetate ester
9	14.354	0.17	beta.-D-Glucopyranose	Glucide
10	14.979	1.08	Tetracosane	Saturated aliphatic hydrocarbon
11	15.323	0.16	Nonahexacontanoic acid	n-alkanoic acids
12	15.629	0.19	Mannose	glucide
13	15.892	0.90	Cinnamic acid	Aromatic acid
14	16.660	0.27	Trimethyl 3-methoxy-4-cinnamate	Ester of aromatic acid
15	17.616	2.98	Trimethyl cinnamate	Ester of aromatic acid
16	17.797	0.37	Benzoic acid	Aromatic acid
17	18.810	0.84	3,4-Epoxy-4a-ethyl-2,3,4,4a,5,6- hexahydro-1H-pyrido[3,2-C]carbazole	Aromatic Heterocyclic organic compound
18	19.022	0.24	Pagicerine	Alkaloid
19	19.960	0.69	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	Ester of aromatic acid
20	21.309	0.71	Docosane	n-alkanes
21	22.990	0.05	2 ^h -O-Methylcajanone	Isoflavonoids
22	23.346	0.24	1 ^h H-Cholesta-3,5-dieno [3,4-b]indol	Indole
23	24.215	0.26	Octadecane	n-alkanes
24	25.421	0.33	Cyclotetracosane	Saturated hydrocarbon
25	25.815	0.20	Demecolcine	Alkaloid
26	26.033	0.46	9-Hexacosene	alpha-olefins
27	26.396	1.14	1,6-Dihydroxy-3 methyl anthraquinone	Anthraquinone
28	26.633	2.08	1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl) anthraquinone	Anthraquinone
29	34.863	5.36	Lanostan-3-one, 11.beta.,18-epoxy	Triterpene
30	37.400	6.07	Pregn-4-en-3-one, 17-hydroxy-, (17 .alpha.)	Triterpene

Table 2
Chemical composition of ethanolic extracts of Algerian propolis taken from Setif (SE) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	5.131	0.89	1,3-Dioxolane, 2-(4-methoxyphenyl)-2-methyl	Dioxolane
2	5.493	0.99	Ether of glycerol	Ether lipid
3	5.974	0.30	Butanedioic acid	Dicarboxylic acid
4	9.268	0.26	2-Propenoic acid, 3-phenyl ester	Phenyl ester
5	10.917	0.24	Naphthalene	Polycyclic aromatic hydrocarbon
6	13.329	1.07	Sorbose	Glucide
7	14.348	0.26	D-Mannopyranose	Glucide
8	14.667	0.93	Nifenzazone	Aromatic heterocyclic organic compound
9	15.042	0.43	Galactose benzyloxime	Glucide
10	15.623	0.29	D-Glucose	Glucide
11	15.891	1.31	Cinnamic acid	Aromatic acid
12	16.654	1.48	Trimethyl cinnamate	Ester of aromatic acid
13	17.597	2.91	1-(Phenylthioxomethyl)-2,5- pyrrolidinedione	Pyrrolidones
14	18.622	0.82	Oleic acid	Monounsaturated fatty acid
15	21.484	1.14	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,5-dihydroxy-3-octadecyl	Isoprene
16	22.890	0.54	8H-Dinaphtho[2,3-c:2',3'-h]phenothiazine	Polycyclic aromatic hydrocarbon
17	24.265	0.19	Demecolcine	Alkaloid
18	24.353	4.52	Benzoic acid	Aromatic acid
19	25.277	4.10	Papaverine	Alkaloid
20	26.008	2.60	Podofilox	Heterocyclic organic compound
21	26.383	8.01	1,6-Dihydroxy-3-methyl anthraquinone	Anthraquinone
22	26.615	9.70	1,3,8-Trihydroxy-6-methyl anthraquinone	Anthraquinone
23	27.146	2.45	Aspidospermidine	Alkaloid
24	32.639	0.85	Brallobarbitol	Barbiturates
25	33.288	0.48	Cyclobarbitol	Barbiturates

3.5. Bactericidal activity of propolis

The bactericidal activities of the eight Algerian propolis extracts against three different Gram negative bacteria (*V. harveyi*,

P. damsela and *S. putrefaciens*) are shown in (Fig. 4). The highest bactericidal activity was observed for the ethanolic extracts against *S. putrefaciens*, and the lowest activity was found in the aqueous extracts against *P. damsela*. In the case of the *V. harveyi* the

Table 3

Chemical composition of ethanolic extracts of Algerian propolis taken from Ain-Abbassa (AbE) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	5.493	1.06	Ether of glycerol	Ether lipid
2	5.974	0.29	Butanedioic acid	Dicarboxylic acid
3	8.561	0.65	DL-Malic acid	Dicarboxylic acid
4	10.911	0.09	beta.-Guaiene	Sesquiterpenes
5	13.235	2.21	D-Fructose	Glucide
6	13.329	1.77	Sorbopyranose	Glucide
7	14.348	0.33	Talose	Glucide
8	14.716	0.19	N-(3-Allyl-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-6-yl)acetamide	Acetamide
9	15.623	0.45	alpha.-D-Mannopyranose	Glucide
10	15.891	0.47	Cinnamic acid, 3,4-dimethoxy-ester	Ester of aromatic acid
11	16.085	0.58	Hexadecanoic acid	Saturated fatty acid
12	16.647	0.64	Trimethyl 3-methoxy-4-cinnamate	Ester of aromatic acid
13	16.891	0.19	Cinnamic acid, 4-methoxy-3-ester	Ester of aromatic acid
14	17.597	1.91	Trimethyl cinnamate	Ester of aromatic acid
15	18.622	1.06	Oleic acid	Monoun Saturated fatty acid
16	19.822	0.13	Morphinan-6-one-2-ol	Alkaloid
17	20.384	1.09	Pimaric acid	Diterpene
18	20.853	4.84	5(4H)-Thebenidinone	Alkaloid derivatives
19	21.103	1.01	4-(Phenylthioxomethyl)morpholine	Alkaloid derivatives
20	21.297	0.37	Dehydroabietic acid	Diterpene
21	21.653	6.29	Phenol, 4-methyl-2,6-bis(4-morpholymethyl)	Alkaloid derivatives
22	21.728	0.30	Abietic acid	Diterpene
23	22.878	1.25	3-[(Trimethylsilyloxy)4,5.alpha.- epoxy-14- hydroxy-17-(2- propenyl) morphinan-6-one	Alkaloid derivatives
24	23.090	1.40	Coumarin, 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-nitro	Aromatic flavoring agent
25	23.340	0.59	Hexadecandioic acid	Saturated fatty acid
26	24.059	0.30	Thebaine	Alkaloid
27	24.352	4.96	Benzoic acid, 2-methyl ester	Ester of aromatic acid
28	25.546	10.74	2,3,4-Trihydroxybenzoic acid	Aromatic acid
29	26.383	8.76	Chrysin	Flavanoids
30	26.489	1.29	1,6-Dihydroxy-8-methoxy-3-methylanthraquinone	Anthraquinone
31	26.621	7.85	1,8-Dihydroxy-3-(hydroxymethyl) anthraquinone	Anthraquinone

Table 4

Chemical composition of ethanolic extracts of Algerian propolis taken from Boutaleb (Bo E) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	8.965	0.16	3,7-Dioxo-2,8-disilanonan-5-one	Dioxaketon
2	9.751	2.19	Ether of glycerol	Ether lipid
3	10.729	0.12	3-Cyclohexene-1-methanol, alpha..	alpha-Terpeneol
4	11.611	0.33	Benzene propanoic acid, trimethyl ...	Ester of aromatic acid
5	11.955	0.24	Fumaric acid	Unsaturated dicarboxylic acids
6	12.699	0.18	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopr ...	Bicyclic
7	12.892	1.23	Butane	n-alkanes
8	13.030	0.25	Naphthalene	Polycyclic aromatic hydrocarbon
9	14.111	0.30	Talose	Glucide
10	15.069	0.55	3,5-Cyclohexadiene-1,2-dione, 3, ...	o-Benzoquinone
11	15.337	1.00	Ether of glycerol	Ether lipid
12	15.427	0.72	Xylitol	Sugaralcohol
13	16.440	5.24	D-Fructose	Glucide
14	16.522	1.83	Sorbopyranose	Glucide
15	16.929	0.55	alpha.-D-Glucopyranoside	Glucide derivatives
16	17.170	0.49	3,4,5-Triphenylpyrazole	Polycyclic aromatic hydrocarbon
17	17.528	0.25	L-Gluconic acid	Glucide acid
18	17.962	0.37	Hexadecanoic acid, ethyl ester	Ethyl ester
19	18.472	1.22	Hexadecanoic acid, trimethyl ester	Trimethylester
20	19.595	0.44	Ethyl Oleate	Fatty acid ester
21	20.049	1.23	11-cis-Octadecenoic acid	Fatty acid
22	20.421	0.30	Dehydroabietic acid	Diterpene
23	20.545	0.55	1-Ethoxy-4 ^β -methoxy-2,2 ^β -binaphthyl-1,4-dione	Polycyclic aromatic hydrocarbon
24	20.986	0.51	2,4,6-Trichloro-5-nitro-nicotinic acid methyl ester	Methyl ester
25	21.103	0.50	3-(4-Methoxyphenyl)benzo[f]quinazoline	Polycyclic aromatic hydrocarbon
26	21.165	4.69	Pimaric acid	Diterpene
27	21.730	2.50	Dehydroabietic acid	Diterpene
28	21.965	4.65	Abietic acid	Diterpene
29	22.385	2.37	2-p-Tolylisoindole-1,3-dione	Indole
30	22.585	0.74	N,O-Dimethyl stephine	Alkaloid
31	22.750	1.65	1-Naphthalene carboxylic acid, 2-benzoyl	Polycyclic aromatic hydrocarbon
32	23.012	0.83	gamma.-Elemene	Sesquiterpenes
33	23.363	0.38	Androst-5-en-17-one	Steroid
34	23.480	0.47	Hydroxy dehydro stevic acid	Diterpene
35	23.783	1.00	1-O-hexadecylglycerol	Ether lipid

Table 7

Chemical composition of aqueous extracts of Algerian propolis taken from Babor (BA) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	5.131	0.11	Trimethyl-, benzoate	Ester
2	5.493	3.82	Ether of glycerol	Ether lipid
3	5.824	0.07	L-Proline	α -amino acid
4	5.974	1.25	Butanedioic acid	Dicarboxylic acid
5	8.230	0.19	Acetophenone	Aromatic ketone
6	8.561	0.15	Malic acid	Dicarboxylic acid
7	8.855	0.10	Hexanedioic acid	Dicarboxylic acid
8	10.436	0.14	Benzoic acid	Aromatic acid
9	13.236	6.52	D-Fructose	Glucide
10	13.567	0.33	beta.-D-Galactopyranoside	Glucoside
11	13.904	0.19	10H-Phenothiazine, 10-butyl-3,7-dinitro	Heterocyclic compound
12	14.348	0.85	alpha.-D-Galactopyranose	Glucide
13	14.485	0.46	D-Altro-2-Heptulose	Glucide
14	14.666	7.91	6,13-Pentacenedione	Anthraquinone derivatives
15	14.716	0.47	Germane, [(pentafluorophenyl)thio] triphenyl	Polycyclic aromatic hydrocarbon
16	15.398	1.24	Trimethylcinnamate	Ester of aromatic acid
17	15.616	1.37	D-Glucose	Glucide
18	15.885	0.67	Cinnamic acid	Aromatic acid
19	17.628	60.27	Trimethyl 3,4-bis(trimethyloxy)cinnamate	Ester of aromatic acid
20	23.109	0.13	Isoquinoline, 6,7,8-trimethoxy-	Heterocyclic aromatic organic compound

Table 6

Chemical composition of aqueous extracts of Algerian propolis taken from Setif (SA) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	5.130	5.05	Trimethyl-, benzoate	Ester
2	5.499	8.75	Ether of glycerol	Ether lipid
3	5.980	0.47	Butanedioic acid	Dicarboxylic acid
4	7.455	0.32	Benzene propanoic acid	Aromatic acid
5	8.567	1.27	Butanoic acid	Carboxylic acid
6	9.267	0.62	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, trimethyl ester	Trimethyl ester
7	10.442	0.58	Benzoic acid	Aromatic acid
8	13.248	11.59	D-Fructose	Glucide
9	13.335	3.93	beta.-D-Galactopyranose	Glucide
10	14.354	2.65	D-Glucose	Glucide
11	14.491	2.75	D-Altro-2-Heptulose	Glucide
12	14.729	0.96	2-(4-Methoxyphenyl)-4-[(2-propyn-1-yl)thio] quinazoline	Heterocyclic aromatic organic compound
13	15.410	1.72	Trimethylcinnamate	Ester of aromatic acid
14	15.629	2.43	alpha.-D-Galactopyranose	Glucide
15	15.904	1.39	Cinnamic acid, 3,4-dimethoxy-	Aromatic acid
16	16.004	0.49	D-Gluconic acid	Glucide acid
17	16.091	0.77	Hexadecanoic acid	Saturated fatty acid
18	16.660	2.32	Cinnamic acid, 4-methoxy-3-	Aromatic acid
19	17.603	20.03	Trimethyl cinnamate	Ester of aromatic acid
20	19.009	0.25	Octadecanoic acid	Saturated fatty acid
21	25.283	0.49	Thebaine	Alkaloids

bactericidal activity was higher in the aqueous extracts than in the ethanolic extracts (Fig. 4).

4. Discussion

Propolis chemical composition depends on the phytogeographic characteristics of the site of collection, since bees choose different plants as a source of propolis in different habitats [38]. This aspect hinders propolis standardization and many solvents (ethanol, methanol and water) may extract different compounds, influencing the activity measured [39]. Thus, a universal standardization is impossible, and it has been proposed that propolis biological properties should be linked to a detailed investigation of its chemical composition and to its botanical sources [40]. Algeria has a rich natural heritage and this large country is endowed with a wide variety of landscapes and ecological zones. Considered by many to be the most unique natural country of the Mediterranean, Algeria's distinctive morphology, bioclimate, fauna and flora contribute to its great biodiversity. Indeed, Algeria has a variety of

ecosystems, from coastal areas to desert and mountain [41]. Comparative studies have revealed that, although different propolis may have different chemical composition, always these propolis have considerable high biological activities [4,42]. For this reason, propolis chemical analysis is at all times needed [43]. To the best of our knowledge, the chemical composition of Algerian propolis has not previously been reported, which is the reason for carrying out the present study. Furthermore, the possible application of propolis extracts in fish aquaculture is discussed.

Raw propolis contains impurities such as wood, wax, pollen and even dead bees, so that macroscopic observation of any sample is necessary in order to eliminate such impurities before the preparation of extracts. A critical step in the process of testing is the extraction of the propolis samples that will be used in the study. The solvents used for extraction are usually alcohols - methanol or ethanol. The most often used solvent is ethanol containing different percentages of water; for example, 70% ethanol extracts most of the active components of propolis but not waxes [44], and as propolis might contain up to 20e30% wax, this solvent has been applied in

Table 7
Chemical composition of aqueous extracts of Algerian propolis taken from AinAbassa (AbA) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
1	5.131	0.34	Benzoic acid	Aromatic acid
2	5.493	8.19	Ether of glycerol	Ether lipid
3	5.824	0.64	L-Proline	α -amino acid
4	5.974	1.06	Butanedioic acid	Dicarboxylic acid
5	6.293	0.16	Propanoic acid	Carboxylic acid
6	6.706	0.10	Benzoic acid, 2-methyl-	Aromatic acid
7	9.461	0.10	5-(4-Diethylaminobenzylidene)rhodanine	Heterocyclic organic compound
8	9.699	0.14	2,3,4-Trihydroxybutyric acid	Polyol acid
9	10.380	0.12	Lyxose	Glucide
10	10.436	0.24	Benzoic acid, 4-trimethyl	Aromatic acid
11	11.042	0.07	D-Xylose	Glucide
12	11.986	0.64	Xylitol	Sugar alcohol
13	12.623	0.17	Nicotinaldehydesemicarbazoneditm	Alkaloid derivatives
14	12.911	0.14	L(-)-Fucose	Glucide
15	13.242	18.45	D-Fructose	Glucide
16	13.329	8.57	Sorbopyranose	Glucide
17	13.567	1.53	Morpholine	Alkaloids
18	14.348	2.85	Talose	Glucide
19	15.042	0.29	Ether of glucitol	Ether lipid
20	15.504	0.21	2,4,6-Trihydroxybenzoic acid	Aromatic acid
21	15.616	3.92	D-Glucose	Glucide
22	15.991	1.63	D-Gluconic acid	Glucide acid
23	16.648	1.52	Cinnamic acid, 4-methoxy-3-	Aromatic acid
24	17.591	7.17	Trimethyl cinnamate	Ester of aromatic acid
25	24.946	0.94	Scopolin	Glucoside
26	25.733	0.32	Thymol	Monoterpene phenol

Table 8
Chemical composition of aqueous extracts of Algerian propolis taken from Boutaleb (BoA) identified by gas chromatography-mass spectrometry.

S.No	R.T	Peak area %	Name of the compound	Compound nature
2	4.956	0.19	Formamide, N,N-diethyl ester	Diethyl ester
3	5.838	1.39	3-Butenoic acid, 3-methyl ester	Methyl ester
4	9.744	0.39	Ether of glycerol	Ether lipid
5	10.012	0.51	Butane	n-alkanes
6	10.315	0.39	Isoquinoline, 1-butyl-	Heterocyclic organic compound
7	11.342	0.89	Cinnoline, 4-ethyl-3-methyl-	Heterocyclic organic compound
8	11.611	1.09	Benzene propanoic acid	Aromatic acid
9	12.437	0.71	3-Methoxy benzoic acid	Aromatic acid
10	12.795	2.72	Xylitol	Sugar alcohol
11	13.278	0.64	1-(3H-Imidazol-4-yl)-ethanone	Heterocyclic organic compound
12	13.732	0.67	Coumarin-3-carboxylic acid, 8-allyl-, Cyclohexyl ester	Aromatic flavoring agent
13	14.029	0.52	3-Chloro 2-fluorobenzoic acid	aromatic acid
14	14.552	0.57	L-Proline	α -amino acid
15	15.592	0.81	Morphinan-6-one, 3,4-dimethoxy-	Alkaloid derivatives
16	16.171	1.59	l-Mannopyranose	Glucide
17	16.522	1.69	D-Glucose	Glucide
18	16.998	1.13	alpha.-l-Galactofuranoside	Glucide
19	17.211	0.75	Carbamazepine	Heterocyclic organic compound
20	17.501	0.67	4-Hydroxymandelic acid	Aromatic acid
21	17.735	1.04	3-Methyl-1-phenyl-2-azafuorene	Heterocyclic organic compound
22	18.548	0.82	4-Aminobenzo[g]quinazoline	Heterocyclic organic compound
23	18.782	4.12	2,3,4-Trimethoxymandelic acid	Aromatic acid
24	19.974	0.39	gamma.-Elemene	Sesquiterpenes
25	20.704	0.37	2,3,5-Trimethoxymandelic acid	Aromatic acid
26	21.551	0.79	Pimaric acid	Diterpene
27	22.378	0.73	Methylene bisaspidinol	Aromatic Hydroxy ketones
28	22.771	0.42	Cinnamic acid	Aromatic acid

many studies. Water has also been used on many occasions; however, it is important to note that in general, water dissolves a small part of propolis constituents (about 10% of its weight), whereas 70% ethanol may dissolve 50e70%, depending on the amount of wax [17]. In order to investigate the differences between the ethanolic and aqueous extracts of different samples from different regions in Algeria, we used two solvents (ethanol and water) to examine the effect of each solvent. The results confirm different biological properties of each extract due to the different components present

in each of them. Comparing the four propolis using in the present study, the extracts from propolis of Boutaleb Region was those samples having higher number of active components, followed by propolis of Ain-Abbassa, Babor and Setif.

GC-MS was used to explore the major and minor phytoconstituents present in the different propolis extracts. Preliminary phytochemical screening pointed to the presence of saturated and unsaturated fatty acids, hydrocarbons, glycosides, polysaccharides, phenolic compounds, heterocyclic organic compound, alkaloids,

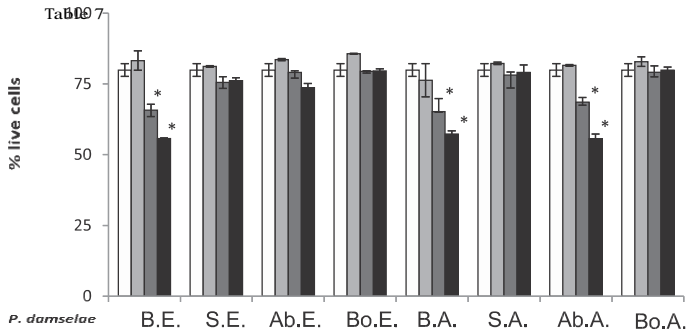


Fig. 1. Viability [percentage (%) of live cells] of head-kidney leucocytes from gilthead seabream (*S. aurata*) specimens following incubation without (control; white bars) or with different concentrations of propolis extracts (light grey bars: 1 mg ml⁻¹; dark grey bars: 100 mg ml⁻¹; black bars: 200 mg ml⁻¹). Bars represent the mean ± S.E. (n = 3). Asterisks denote significant differences with respect to the control group (P < 0.01).

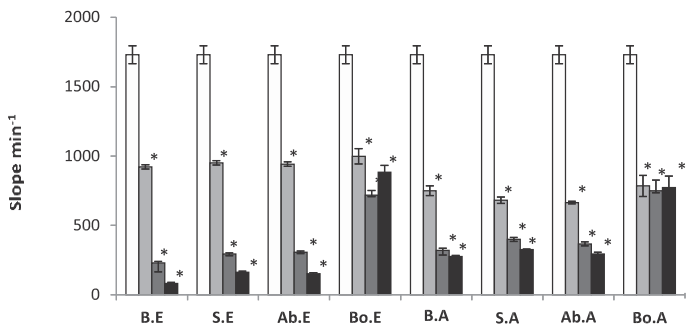


Fig. 2. Respiratory burst activity of head-kidney leucocytes from gilthead seabream (*S. aurata*) specimens following incubation without (control; white bars) or with different concentrations of propolis extracts (light grey bars: 1 mg ml⁻¹; dark grey bars: 100 mg ml⁻¹; black bars: 200 mg ml⁻¹). Bars represent the mean ± S.E. (n = 3). Asterisks denote significant differences with respect to the control group (P < 0.01).

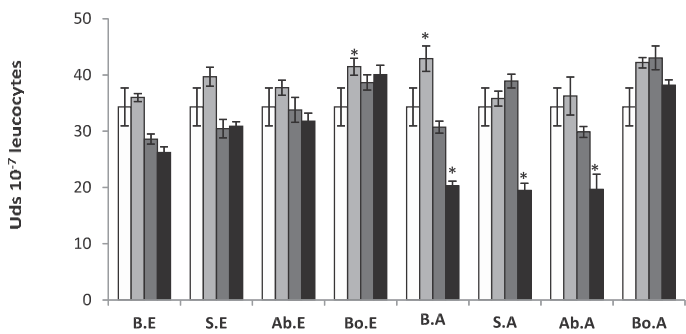


Fig. 3. Peroxidase activity of head-kidney leucocytes from gilthead seabream (*S. aurata*) specimens following incubation without (control; white bars) or with different concentrations of propolis extracts (light grey bars: 1 mg ml⁻¹; dark grey bars: 100 mg ml⁻¹; black bars: 200 mg ml⁻¹). Bars represent the mean ± S.E. (n = 3). Asterisks denote significant differences with respect to the control group (P < 0.01).

flavonoids, phytosterols, monoterpenes, triterpenes, sesquiterpenes, amino acids and anthraquinones. As regard the different number of compounds in the different propolis extracts analyzed, some compounds were found to be common. For example, butanedioic acid, cinnamic acid, benzoic acid and cinnamate and its derivatives were commonly present in six extracts (both the ethanolic and aqueous extracts of the B, S and Ab area). However, cinnamic acid and benzoic acid were only found in the aqueous extract of Bo.

All the compounds present on propolis have important

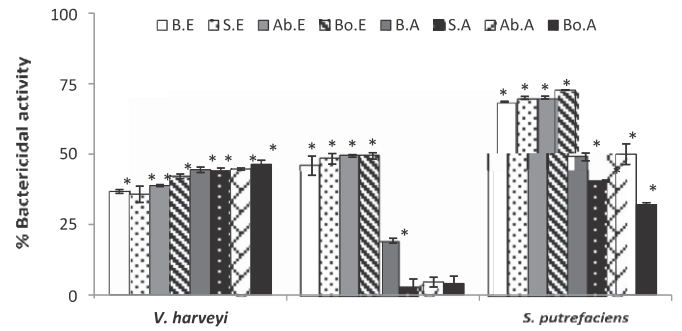


Fig. 4. Bactericidal activity of propolis extracts (B.E., S.E., Ab.E., Bo.E., B.A., S.A., Ab.A., Bo.A.) against *V. harveyi*, *P. damsela* and *S. putrefaciens*. Bars represent the mean ± S.E. (n = 3). Asterisks denote significant differences with respect to the positive control (0% bactericidal activity, P < 0.01).

biological activities. For example, cinnamic acid and benzoic acid (aromatic acids) are used for the treatment of some fungal skin diseases such as tinea, ringworm, and athlete's foot, indicating their antifungal properties [45]. Benzoic acid was also used as an expectorant, analgesic, and antiseptic in the early 20th century [46]. On the other hand, butanedioic acid (dicarboxylic acid) serves as an excipient in pharmaceutical products because of its ability to control acidity [47]. Glycerol ether was also common among the eight studied propolis extracts, an important function of ether lipids being their antioxidant activity. Some protective effects against oxidative stress have been demonstrated in cell cultures and these lipids might therefore play a role in the serum lipoprotein metabolism [48]. This antioxidant activity comes from the enol ether double bond being targeted by a variety of reactive oxygen species [49]. Although there are some paper demonstrating that propolis has important antioxidant effects [50,51], new studies on the antioxidant properties present in the propolis extracts are desirable. Furthermore, anthraquinones, potent antimicrobial and anti-inflammatory agents, were common only among ethanolic extracts (BE, SE and AbE).

Alkaloids have a wide range of pharmacological activities including antimalarial, antiasthma, anticancer, cholinomimetic, vasodilatory, antiarrhythmic, analgesic, antibacterial, and anti-hyperglycemic activities. Many of them have been used in traditional or modern medicine, or as a starting point for the development of new drugs. Other alkaloids possess psychotropic and stimulant activities, and have been used in entheogenic rituals or as recreational drugs [52e56]. For these reasons, the presence of alkaloids in the propolis extracts analyzed is very interesting and merits further study to identify their possible application in pharmaceutical or biotechnological fields. Similarly, sesquiterpenes are known for their wide range of biological activities, including antimicrobial and antigenotoxic activities, although the literature also reports on the induction of DNA damage by sesquiterpene-type compounds with antimicrobial properties [57,58].

On the other hand, saturated fatty acids were common only on SE, AbE, BoE and SA extracts, while some other compounds were found only in one extract. Fatty acids have various effects on immune and inflammatory responses, acting as intracellular and intercellular mediators. To understand the relation between fatty acids and immunology it is therefore necessary to consider their role in inflammation as well as their effect on leucocytes. Fatty acids interfere with many steps of inflammation, such as vascular contraction, chemotaxis, cell adhesion and diapedesis, and cell activation. Fatty acids can modulate leucocyte function, controlling proliferation, production of cytokines and adhesion molecules, and causing cell death [59,60].

Several studies have previously reported immunostimulatory and anti-inflammatory effects of propolis in mammals [61,62]. In fish, propolis has been reported to have an important effect on the aquatic environment [63] and to enhance non-specific immune responses and disease resistance of Nile tilapia through dietary supplementation [64]. Physiological functions of fish may be boosted by propolis and there may also be health benefits for fish consumers [62]. For the present research gilthead seabream was chosen as a fish model because of its importance in commercial marine aquaculture. The possible use of Algerian propolis as a fish immunostimulant was tested and, as a previous step, the effects of such propolis extracts on leucocyte viability were studied. The results suggest that B.E, B.A and Ab.A extracts induce a significant decrease in the cell viability of seabream leucocytes when used at concentrations of 100 and 200 mg mL⁻¹. But none of the tested extracts, when used at 1 mg mL⁻¹, had any significant effect on leucocyte viability. The different results obtained when using different concentrations of the same extracts can probably be explained by the compounds present in each propolis type and extract. Additionally, this effect could be attributed to some synergistic effect between the main constituents of our samples. Several articles report that the flavonoids and derivatives thereof, present in our extracts possess anticarcinogenic activity and exert low cytotoxicity in normal cells, depending on their concentration [65,66]. Our results indicate that additional cell death induction probably due to the different compositions and proportions [17]. According to [67], propolis and a variety of polyphenolic/flavonoid compounds can influence a number of key intracellular targets that are associated with the cancer process and can serve as regulators of gene expression and/or modulate gene products. New studies on gene expression modulation by these propolis extracts are necessary to understand the physiological reasons for the observed effects on fish leucocytes.

The peroxidase activity in leucocytes was also affected by the propolis extracts. Indeed, peroxidase activity, which is related to myeloperoxidase (MPO) and/or eosinophil peroxidase activity, can be considered a good marker for leucocyte activation [68]. The general trend was to increase peroxidase activity when low concentrations of propolis were used, compared with the control group. These increases were statistically significant in the case of Bo.E and B.A extracts at 1 mg mL⁻¹, while B.A, S.A and Ab.A at 200 mg mL⁻¹ provoked a significant decrease in this activity. The role played by propolis in one of the most important functions of macrophages, the production of free radicals, is not clear. Ivanovska et al. [69] demonstrated that two flavonoids present in propolis, cinnamic and caffeic acid, inhibit and induce, respectively, H₂O₂ release by macrophages. The respiratory burst activity reflected an important inhibitory effect when leucocytes were incubated with the extracts. MPO is an enzyme that produces hypochlorous acid from oxidative radicals to destroy bacteria and pathogens. It is released mainly from the azurophilic granules of neutrophils during oxidative respiratory bursts [70]. Unfortunately, there are no previous reports regarding the effects of propolis on MPO activity. However, in the present study, the MPO activity of propolis was significantly lower than that of the control group, and the effect was dose-dependent in all cases except in Bo.E and Bo.A.

Despite the limited evidence available, it seems that the efficacy of propolis in enhancing fish growth rates and feed utilization efficiency may vary depending upon the type of propolis product and/or fish species [71]. Therefore, further investigation is required to elucidate the precise effects of propolis products in different forms, since their content and composition may differ according to their source, as mentioned above.

Fish are susceptible to several bacterial infections, especially when reared in high densities conditions. Diseases outbreaks are

responsible for high mortality rates and decreased productivity efficiency, leading to severe economic losses for fish farmers [71]. Antibiotics are the main treatment applied to control bacterial diseases in fish farms. However, the wide use of antibiotics in aquaculture has been implicated as a potential environmental danger and in the development of resistant bacteria [72,73]. Regarding the problem of microbial resistance, there is an urgent need to discover new drugs and alternative therapies to control bacterial diseases in aquaculture. Owing to the very complex composition, propolis is considered one of the richest sources of new drugs [19,74]. The three bacteria selected in the present study have a great economic impact due to the losses they cause in gilthead seabream farms. The genus *Vibrio*, which is distributed in many marine and brackish environments, can cause vibriosis in fish and shellfish, and several species of the same are responsible for important diseases in marine larviculture and aquaculture [75], including *V. harveyi* and *V. anguillarum*. Moreover, pasteurellosis or pseudotuberculosis is a form of bacterial septicaemia caused by the halophilic bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (formerly *Pasteurella piscicida*) in a wide variety of marine fish [76]. In this paper, the bactericidal activity of the eight extracts against *V. harveyi* followed a very similar pattern. Strikingly, in the case of aqueous extracts, the bacteriolytic activity was very low against *P. damsela* and *S. putrefaciens*. In the case of the *P. damsela* the pattern was also quite similar the lowest bactericidal activity being found for the aqueous extracts and highest in the case of *S. putrefaciens* and *V. harveyi*. By contrast, in ethanolic extracts, the bactericidal activity was very high against *S. putrefaciens* but very low against *V. harveyi*.

Data from numerous studies concerning its antibacterial properties support the fact that propolis is active mainly against Gram-positive bacteria and either displays much lower activity or no activity against Gram-negative bacteria [4,5,13]. Such results can be seen in the work of [4] that tested propolis samples from different geographic regions (tropical and temperate zones) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. All the extracts displayed significant antibacterial activity against *S. aureus* but none was active against *E. coli*. Although it can be argued that only two species were tested, it is also relevant that all 12 samples tested, which came from widely different origins, had the same effect. Grange and Davey [74] reported that ethanol extracts of propolis (EEP) completely inhibited the growth of *S. aureus*, *Enterococcus* spp. and *Bacillus cereus*, partially inhibited *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* growth and had no effect on *Klebsiella pneumoniae*. Sforcin et al. [5] investigated the antibacterial activity of Brazilian propolis collected during the four seasons and observed that low concentrations inhibited the growth of Gram-positive bacteria, while higher concentrations of EEP were needed to inhibit Gram-negative bacteria.

Several periodontal disease-causing anaerobic bacteria are susceptible to propolis aqueous-ethanolic extracts, but, once again, the Gram-negative bacteria were the most resistant [77,78]. Some authors suggested that the increased resistance of Gram-negative bacteria could be due to the presence of plasma membrane efflux pumps that would prevent the intracellular entry of propolis constituents, or promote their extrusion from the cell, or even to the many plant-derived resin constituents of propolis which are secreted to protect plants from Gram-positive pathogens [79].

Propolis antibacterial activity has been correlated with flavonoids, among which galangin, pinocembrin and pinostrobin are recognized as the most effectives [80]. However, there are reports of propolis samples containing only traces of flavonoids but still displaying antibacterial action [81]. Ferulic and caffeic acid, prenylated coumaric acid and benzophenone derivatives or diterpenic acids are also bioactive compounds [4,18,38]. The bactericidal effect

of flavonoids may therefore be originated from the metabolic perturbation of ion channels as a result of impaired phosphorylation/dephosphorylation reactions [82]. Caffeic acid, benzoic acid, and cinnamic acid probably act on the microbial membrane or cell wall sites as well, causing functional and structural damages [13]. Some diterpenes and phenolic compounds possess activity against *Helicobacter pylori* [83], a Gram-negative bacterium that causes peptic ulcer disease and gastric cancer. Until now, no single propolis component has been shown to possess antibacterial activity higher than that of the total extract [84]. Some authors cite the highly complex and variable composition of propolis as a reason for its antimicrobial activity and the data gathered to date suggest that such activity can be linked to multiple targets, with several constituents acting in synergy [18,85]. Propolis affects the cytoplasmic membrane, inhibits bacterial motility and enzyme activity, exhibits bacteriostatic activity against different bacterial genera and can act as a bactericide at high concentrations [86]. Synergism between EEP and antibiotics, with a clear reduction of MIC values, has been reported for several strains [85].

This study is the first report to describe the chemical composition and antibacterial activity of four different Algerian propolis samples. The observed bactericidal activities as well as the immunomodulatory properties of the different propolis extracts seem to validate the classical medicinal uses of these extracts in fish due to their therapeutic importance in the management of diseases. The demonstrated effects of propolis extracts would be due to the cumulative effects of the abundant compounds with important biologically active phytochemicals such as alkaloids, phenols, flavonoids and tannins that they contain.

Acknowledgements

This work was partly supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness co-funded with Fondos Europeos de Desarrollo Regional/European Regional Development Funds (Grant no. AGL2014-51839-C5-1-R) and Fundacion Seneca de la Region de Murcia (Grupo de Excelencia. Grant no. 19883/GERM/15).

References

- [1] E.L. Ghisalberti, Propolis: a review, *Bee World* 60 (1979) 59e84.
- [2] E.L. Ghisalberti, P.R. Jefferies, R. Lanteri, J. Matison, *Const. propolis. Exp.* 34 (2) (1978) 157e158.
- [3] H. Koo, P.L. Rosalen, J.A. Cury, Y.K. Park, M. Ikegaki, A. Sattler, Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats, *Caries Res.* 33 (1999) 393e400.
- [4] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *J. Ethnopharmacol.* 64 (1999) 235e240.
- [5] J.M. Sforcin, A. Fernandes Jr., C.A. Lopes, V. Bankova, S.R. Funari, Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.* 73 (2000) 243e249.
- [6] M. Velikova, V. Bankova, M.C. Marcucci, I. Tsvetkova, A. Kujumgiev, Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae, *Z. für Naturforsch. [C]* 55 (2000) 785e789.
- [7] V. Bankova, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005a) 114e117.
- [8] A. Salatino, E.W. Teixeira, G. Negri, D. Message, Origin and chemical variation of Brazilian propolis, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2 (2005) 33e38. [9] H. Katircioglu, N. Mercan, Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions, *Afr. J. Biotechnol.* 5 (2006) 1151e1153.
- [10] E. Melliou, I. Chinou, Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis, *Planta Med.* 70 (2004) 515e519.
- [11] S. Mohammadzadeh, M. Shariatpanahi, M. Hamedi, R. Ahmadvani, N. Samadi, S.N. Ostad, Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis, *Food Chem.* 103 (2007) 1097e1103.
- [12] Y.K. Park, S.M. Alencar, C.L. Aguiar, Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2502e2506.
- [13] M.C. Marcucci, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie* 26 (1995) 83e99.
- [14] M.C. Marcucci, F. Ferreres, C. Garcia-Viguera, V.S. Bankova, S.L. De Castro,

- A.P. Dantas, P.H. Valente, N. Paulino, Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities, *J. Ethnopharmacol.* 74 (2001) 105e112.
- [15] V. Bankova, Recent trends and important developments in propolis research, *Evid. based Complement. Altern. Med.* 2 (2005b) 29e32.
- [16] J.F.M. Silva, M.C. Souza, S.R. Matta, M.R. Andrade, F.V.N. Vidal, Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities, *Food Chem.* 99 (2006) 431e435.
- [17] B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, S. Simova, M.C. Marcucci, P.L. Miorin, F. da Rocha Pasin, I. Tsvetkova, Bioactive constituents of Brazilian red propolis, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 3 (2006) 249e254.
- [18] G.A. Burdock, Review of the biological properties and toxicity of bee propolis(propolis), *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 347e363.
- [19] A.H. Banskota, Y. Tezuka, Sh Kadota, Recent progress in pharmacological research of propolis, *Phytother. Res.* 15 (2001) 561e571.
- [20] S. Duarte, P.L. Rosalen, M.F. Hayacibara, J.A. Cury, W.H. Bowen, R.E. Marquis, V.L. Rehder, A. Sartoratto, M. Ikegaki, H. Koo, The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats, *Archiv. Oral Biol.* 51 (2006) 15e22.
- [21] A.H. Banskota, Y. Tezuka, I.K. Adnyana, Biological evaluation of propolis from Brazil, Peru, The Netherlands and China, *J. Ethnopharmacol.* 72 (2000) 239e246.
- [22] M.R. Ahn, S. Kumazawa, T. Hamasaka, K.S. Bang, T. Nakayama, Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7286e7292.
- [23] N. Orsolich, L. Sver, S. Terzic, I. Basic, Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity, *Veterinary Res. Commun.* 29 (2005) 575e593.
- [24] J.M. Sforcin, Propolis and the immune system: a review, *J. Ethnopharmacol.* 113 (2007) 1e14.
- [25] R.P. Subasinghe, Epidemiological approaches to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture, *Prev. Vet. Med.* 67 (2005) 117e124.
- [26] FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture, 2004, pp. 14e17. Rome, Italy.
- [27] D.P. Anderson, A.K. Siwicki, O.W. Dixon, E.F. Lizzo, Immunostimulation by levamisole in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in vivo, in: W. Ahne, E. Kurstak (Eds.), *Viruses of Lower Invertebrates*, Springer-Verlag, New York, 1992, 1989, 469e578pp.
- [28] J.S. Clark, D. Zarate, Y. Toride, D. Dycheepuat, The Use of Peptidoglycan as an Immune Stimulant for tilapia, ISTAV-Riodejaneiro-RJ, Brazil, 2000, pp. 461e463.
- [29] G. Eraslan, K. Murat, S. Sibel, Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium Xuoride Pesticide, *Biochem. Physiol.* 88 (2007) 273e328.
- [30] Z. Yildirim, H. Süleyman, O.K. Nurettin, E.A. Nasuhi, K. Mine, I. Mustafa, D. Riza, Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in Guinea-pigs, *Pharmacol. Res.* 49 (2004) 287e292.
- [31] M. Popova, S. i Silic, O. Kaftanoglu, V.S. Bankova, Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition, *Phytomedicine* 12 (2005) 221e228.
- [32] S.E. Stein, National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Database and Software, Version 3.02, USA, 1990.
- [33] M.F.W. Lafferly, Registry of Mass Spectral Data, fifth ed., Wiley, New York, 1989.
- [34] M.A. Esteban, V. Mulero, J. Munoz, J. Meseguer, Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy, *Cell Tissue Res.* 293 (1998) 133e141.
- [35] C.J. Bayne, S. Levy, Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotropic hormone and catecholamines: mechanisms of action, *J. Leukoc. Biol.* 50 (1991) 554e560.
- [36] M.J. Quade, J.A. Roth, A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58 (1997) 239e248.
- [37] J.O. Sunyer, L. Tort, Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45 (1995) 333e45.
- [38] M. Popova, C.N. Chen, P.Y. Chen, C.Y. Huang, V. Bankova, A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in Pacific propolis from Taiwan, *Phytochem. Anal.* 21 (2010) 186e191.
- [39] I.B.S. Cunha, A.C.H.F. Sawaya, F.M. Caetano, M.T. Shimizu, M.C. Marcucci, F.T. Drezza, G.S. Povia, P.O. Carvalho, Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 964e970.
- [40] R.O. Orsi, S.R.C. Funari, R. Barbatini, C. Giovani, F. Frilli, J.M. Sforcin, V. Bankova, Radionuclides in honeybee propolis (*Apis mellifera* L.), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76 (2006) 637e640.
- [41] <http://www.algeria.com/national-parks/>: 28/09/2016.
- [42] V. Seidel, E. Peyfoon, D.G. Watson, J. Fearnley, Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones, *Phytother. Res.* 22 (2008) 1256e1263.
- [43] V. Bankova, Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds, *J. Api Product ApiMed. Sci.* 1 (2009) 23e28.
- [44] V.S. Bankova, S.L. De Castro, M.C. Marcucci, Propolis: recent advances in

- chemistry and plant origin, *Apidologie* 31 (2000) 3e15.
- [45] S. Budavari, *The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, twelfth ed., 1996, ISBN 0911910123. Merck.
- [46] O.W. Charles, e G. Ol, H.B. John, Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, ISBN 0-7817-34819, p. 234.
- [47] L. Lachman, B.S. Joseph, *Pharmaceutical Dosage Formsetablets*, 1990, ISBN 9780824780449, p. 288.
- [48] T. Brosche, D. Platt, The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage, *Exp. Gerontol.* 33 (5) (1998) 363e369.
- [49] B. Engelmann, Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic anti-oxidants, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (Pt 1) (2004) 147e150.
- [50] Z.S. Talas, M.F. Gulhan, K. Erdogan, I. Orun, Antioxidant effects of propolis on carp *Cyprinus carpio* exposed to arsenic: biochemical and histopathologic findings, *Dis. Aquat. Organ* 108 (2014) 241e249.
- [51] O.S. Aldemir, Z.S. Talas, M.F. Gulhan, O. Cakir, S.D. Dastan, H. Dogan, Role of propolis on oxidative stress in various tissues of fish, *Fresenius Environ. Bull.* 23 (2014) 3546e3550.
- [52] P. Kittakoop, C. Mahidol, S. Ruchirawat, Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation, *Curr. Top. Med. Chem.* 14 (2) (2014) 239e252.
- [53] P. Russo, A. Frustaci, A. Del Bufalo, M. Fini, A. Cesario, Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease, *Curr. Med. Chem.* 20 (13) (2013) 1686e1693.
- [54] S. Raymond, Sinatra, S. Jonathan, J. Jahr, Watkins-Pitchford Michael, *The Essence of Analgesia and Analgesics*, Cambridge University Press, 2010, pp. 82e90.
- [55] T.P. Cushnie, B. Cushnie, A.J. Lamb, Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities, *Int. J. Antimicrob. Agents* 44 (5) (2014) 377e386.
- [56] S. Qiu, H. Sun, A.H. Zhang, H.Y. Xu, G.L. Yan, Y. Han, X.J. Wang, Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives, *Chin. J. Nat. Med.* 12 (6) (2014) 401e406.
- [57] C.Y. Looi, A. Arya, F.K. Cheah, B. Muharram, K.H. Leong, K. Mohamad, W.F. Wong, N. Rai, M.R. Mustafa, Induction of apoptosis in human breast cancer cells via caspase pathway by vernodalin isolated from *Centratherum anthelminticum* (L.) seeds, *PLoS One* 8 (2013) e56643.
- [58] N. Arghiani, M.M. Matin, A.R. Bahrami, M. Iranshahi, A. Sazgarnia, F.B. Rassouli, Investigating anticancer properties of the sesquiterpene ferutinol on colon carcinoma cells, in vitro and in vivo, *Life Sci.* 109 (2014) 87e94.
- [59] C. Pompeia, L.R. Lopes, C.K. Miyasaka, J. Procopio, P. Sannomiya, R. Curi, Effect of fatty acids on leukocyte function, *Braz J. Med. Biol. Res.* 33 (11) (2000) 1255e1268.
- [60] S. Cunningham-Rundles, Is the fatty acid composition of immune cells the key to normal variations in human immune response? *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 1096e1097.
- [61] G. Zhang, S. Gong, D. Yu, H. Yuan, Propolis and *Herba epimedii* extracts enhance thenon-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, *Myxocyprinusasiaticus*, *Fish. Shellfish Immunol.* 26 (2009) 467e472.
- [62] Z.S. Talas, M.F. Gulhan, Effects of various propolis concentrations biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*), *Eco- tox. Environ. Safe* 72 (2009) 1994e1998.
- [63] D. Christyapapita, M. Divyagnaneswari, R.D. Michael, Oral administration of *Eclipta Albaleafa*aqueous extract enhances thenon specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*, *Fish. Shellfish Immunol.* 23 (2007) 840e852.
- [64] A.M.M. Abd-El-Rhman, Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromisniloticus*, *Fish. Shell- fish Immunol.* 27 (2009) 454e459.
- [65] L. Feng, A. Suresh, T. Yasuhiro, K. Shigetoshi, Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structureactivity relationship, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 5434e5440.
- [66] B. Kleiton, Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis glioblastoma cell lines, *Genet. Mol. Biol.* 34 (2) (2011) 310e314.
- [67] N. Orsolio, A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro, *J. Api Product. Api Med. Sci.* 2 (2) (2010) 1e20.
- [68] A. Rodríguez, M.A. Esteban, J. Meseguer, Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells, *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272 (2003) 415e423.
- [69] N.D. Ivanovska, V.B. Dimov, V.S. Bankova, S.S. Popov, Immunomodulatory action of Propolis. IV. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo, *J. Ethnopharmacol.* 47 (1995) 145e147.
- [70] A. Das, K. Nakhro, S. Chowdhury, D. Kamilya, Effects of potential probiotic *Bacillus Amyloliqifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*), *Fish. Shellfish Immunol.* 35 (2013) 1547e1553.
- [71] A. Cuesta, A. Rodríguez, M.A. Esteban, J. Meseguer, In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses, *Fish. Shellfish Immunol.* 18 (2005) 71e80.
- [72] M. Hatha, A.A. Vivekanandhan, G.J. Joice, L. Christo, Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish, *Int. J. Food Microbiol.* 98 (2005) 131e134.
- [73] S.B.R. Castro, C.A.G. Leal, F.R. Freire, D.A. Carvalho, D.F. Oliveira, H.C.P. Figueredo, Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria, *Braz. J. Microbiol.* 39 (2008) 756e760.
- [74] J.M. Grange, R.W. Davey, Antibacterial properties of propolis (bee glue), *J. R. Soc. Med.* 83 (3) (1990) 159e160.
- [75] S. Chisada, K. Shimizu, H. Kamada, N. Matsunaga, N. Okino, M. Ito, Vibrios adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream, *Pagrus major*, utilizing GM4 as an attachment site, *FEMS Microbiol. Lett.* 341 (2013) 18e26.
- [76] J.L. Romalde, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen, *Int. Microbiol.* 5 (2002) 3e9.
- [77] N. Volpi, G. Bergonzini, Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC/electrospray mass spectrometry, *J. of Pharm. Biomed. Analysis.* 42 (2006) 354e361.
- [78] O. Kuru, F. Toksoy, C.H. Acikel, Y.M. Tunca, M. Baysallar, A.U. Guclu, E. Akca, A.O. Tuylu, K. Sorkun, M. Tanyuksel, B. Salih, In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens, *Anaerobe* 13 (2007) 140e145.
- [79] A. Garedeu, E. Schmolz, I. Lamprecht, Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach, *Thermochim. Acta* 422 (2004) 115e124.
- [80] V. Dimov, N. Ivanovska, V. Bankova, S. Popov, Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water soluble derivative, *Vaccine* 10 (1992) 817e823.
- [81] F.A. Tomas-Barberan, C. Garcia-Viguera, P. Vit-Olivier, F. Ferreres, F. Tomas-Lorente, Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical from Venezuela, *Phytochemistry* 34 (1993) 191e196.
- [82] A.P. Farnesi, R. Aquino-Ferreira, D. De Jong, J.K. Bastos, A.E.E. Soares, Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria, *Genet. Mol. Res.* 8 (2009) 635e640.
- [83] L. Boyanova, G. Gergova, R. Nikolov, S. Derejian, E. Lazarova, N. Katsarov, I. Mitov, Z. Krastev, Activity of Bulgarian propolis against *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods, *J. Med. Microbiol.* 54 (2005) 481e483.
- [84] J.S. Bonvehi, F.V. Coll, R.E. Jorda, The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 529e532.
- [85] F. Scaccocchio, F.D. D'Auriaa, D. Alessandrinia, F. Pantanella, Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis, *Microbiol. Res.* 161 (2006) 327e333.
- [86] O.K. Mirzoeva, R.N. Grishanin, P.C. Colder, Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria, *Microbiol. Res.* 52 (1997) 239e246.

Publications scientifiques

- 1) **EL-Khamsa Soltani**, Rebeca Cerezuela, Nouredine Charef, Samia Mezaache-Aichour, Maria Angeles Esteba, Mohamed Mihoub Zerroug. Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 62 (2017) 57-67.
- 2) **El-Khamsa Soltani**, Samia Mezaache-Aichour, Nouredine Charef,, Juan Pedro De Haro, Mohamed Mihoub Zerroug and Maria Angeles Esteban. Chemical composition and bactericidal activity of aqueous extracts of Algerian propolis. En cours de publication

Communications Internationales

- 1) E. SOLTANI, S. MEZAACHE, M.M. ZERROUG, N. CHAREF (2012).Extraction methods of phenolics from raw propolis. 2nd AFRICAN CONGRESS ON BIOLOGY AND HEALTH (ACBH 2012) : 10-12 November 2012, Setif, Algeria.
- 2) E. SOLTANI, S. MEZAACHE, N. CHAREF, M.M. ZERROUG (2013). ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF PROPOLIS FROM SÉTIF, ALGERIA, 11th International Ethnobotany Symposio”, November 2-5, 2013, Antalya, Turkey.
- 3) M.M. ZERROUG, E. SOLTANI, S. MEZAACHE, N. CHAREF (2015). POLYPHENOL CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF PROPOLIS FROM SÉTIF, ALGERIA, 3rd International chemical engineering and chemical technologies conference” (CHEMTECH 15), November 30, 2015, Turkey.
- 4) E. SOLTANI, N. CHAREF, S. MEZAACHE, M.M. ZERROUG (2016). CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF PROPOLIS COLLECTED FROM SÉTIF, ALGERIA, 1er séminaire international de pharmacie de sétif” (SIPS2016), Mai 11-12, 2016, SETIF, ALGERIE.
- 5) A. BENSLIM, E. SOLTANI, S. MEZAACHE N. CHAREF, N. HAICHOIR, M.M. ZERROUG (2016). CHEMICAL COMPOSITION AND BACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS PROPOLIS EXTRACT FROM BABOR (ALGERIA), séminaire international” (VRNZSA, 2016), Novembre 22-23, 2016, M’SILA, ALGERIE.

Communications nationales

- 1) E. SOLTANI, S. MEZAACHE, N. CHAREF, M.M. ZERROUG (2013). Polyphenol contents and antioxidant activity of aqueous extract of propolis from Sétif, Algeria Journée des Doctorants, 22-25 Avril 2013, Sétif, Algérie.
- 2) E. SOLTANI, M.M. ZERROUG (2014). Chemical characterization of baborian propolis samples and assessing their antioxidant potentials. 40ème anniversaire de la création de l’U.S.T.H.B.: 20-24 Septembre 2014, Alger, Algérie.

تم تحضير مستخلصات مائية وإيثانولية من العكبر (AEP و EEP) جمعت من أربعة مواقع في منطقة سطيف بالجزائر، وتمت دراسة تركيبها الكيميائي باستخدام كروماتوغرافيا غازية مزوجة بمطياف الكتلة (GC/MS) ونشاطيتها البيولوجية. تم التعرف على 20 إلى 28 مركبا ومن 30 إلى 35 مركبا في المستخلصات المائية والإيثانولية على التوالي. تمتلك جميع عينات العكبر نشاطية ضد تأكسدية قوية نسبيا والتي ترتبط بالمحتوى الفينولي والفلافونويدي للمستخلصات. مجموع محتويات الفلا فونويد وعدادات الفينول من مستخلصات عينات العكبر، كانت في حدود $3,047 \pm 0.004 - 132,952 \pm 0,016$ مغ/غ و $96,833 \pm 0,027 - 600 \pm 0,017$ مغ/غ مستخرج الخام من العكبر على التوالي. علاوة على ذلك، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات من مستخلصات العكبر ضد اثنين من البكتيريا الممرضة للأسماك وأخرى غير ممرضة. أبدت المستخلصات الإيثانولية نشاطية ضد بكتيرية جد عالية ضد *Shewanella putrefaciens* ومتوسطة ضد *Photobacterium damsela* ومنخفضة جدا ضد *Vibrio harveyi* بينما أبدت المستخلصات المائية نشاطية ضد بكتيرية ضعيفة. بالإضافة إلى ذلك تم مخبريا اختبار تأثير العكبر ضد نشاط الكريات البيضاء لسلمكة (Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*))، حيث سجل انخفاض كبير في حيوية الخلايا الدموية البيضاء عند استعمال المستخلصات الإيثانولية والمستخلصين المائتين لكل من عينتي بابور وعين عباسية عند استخدامها بتركيز 100 و 200 ميكروغرام / مل. علاوة على ذلك، سجلت آثار مثبطة كبيرة على نشاط انفجار الكريات البيضاء التنفسي. كان هذا التأثير مرتبطا بالجرعة في جميع الحالات إلا في حالة استعمال مستخلص عينة بوطالب. تشير النتائج المتحصل عليها أن بعض مستخلصات العكبر الجزائرية لها نشاط ضد مسببات الأمراض البكتيرية المهمة لسلمكة (la dorade) كما كان لها نشاطية في تعديل أنشطة الكريات البيضاء مخبريا، مما قد يجعل منها مصدرا لمضادات حيوية طبيعية جديدة و / أو معدلات مناعة في الاستزاع المائي للأسماك.

الكلمات المفتاحية: العكبر الجزائري؛ تحليل GC-MS؛ محتوى البوليفينول؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ النشاط ضد بكتيري؛ Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*)؛ المناعة الفطرية

Abstract

Aqueous and ethanolic extracts of propolis (AEP and EEP) samples collected from four locations of the Setif region, Algeria, were prepared and evaluated for the chemical composition by GC/MS and biological activities. 20 to 28 compounds and 30 to 35 compounds were identified in the aqueous and ethanolic extracts respectively. All propolis samples had relatively strong antioxidant activities, and were also correlated with the total polyphenol and flavonoid contents. Total flavonoid and polyphenol contents of extracts of propolis samples, were in the range of $3,047 \pm 0.004 - 132,952 \pm 0,016$ mg/g and $96,833 \pm 0,027 - 600 \pm 0,017$ mg/g crude extract of propolis, respectively. Furthermore, the antimicrobial activity of the propolis extracts against two marine pathogenic and one no pathogenic bacteria was evaluated. The bactericidal activity of ethanolic extracts was very high against *Shewanella putrefaciens*, average against *Photobacterium damsela* and very low against *Vibrio harveyi*. The lowest bactericidal activity was always found for the aqueous extracts. Finally, the in vitro effects of propolis on gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) leucocyte activities were measured. Both the ethanolic and two aqueous extracts (from Babor and Ain-Abbassa) provoked a significant decrease in cell viability when used at concentrations of 100 and 200 μ g/ml. Furthermore, significant inhibitory effects were recorded on leucocyte respiratory burst activity. This effect was dose-dependent in all cases except for Boutaleb extracts sample. Our findings suggest that some of Algerian propolis extracts have bactericidal activity against important bacterial pathogens in seabream and significantly modulate *in vitro* leucocyte activities, confirming their potential as a source of new natural biocides and/or immunomodulators in aquaculture practice.

Keywords: Algerian propolis; GC-MS analysis; Polyphenol content; Antioxidant activity; bactericidal activity; Gilthead seabream (*Sparus aurata L.*); Innate immunity.

Résumé

Des extraits aqueux et éthanoliques d'échantillons de propolis (AEP et EEP) récoltés dans quatre localités de la région de Sétif, en Algérie, ont été préparés et évalués pour leurs compositions chimiques par GC/MS et activités biologiques. 20 à 28 et 30 à 35 composés ont été respectivement identifiés dans les extraits aqueux et éthanoliques. Tous les échantillons de propolis ont montré des activités antioxydantes relativement fortes, qui étaient également corrélés avec le contenu total en polyphénols et en flavonoïdes. Les teneurs totales en flavonoïdes et en polyphénol des extraits d'échantillons de propolis se situaient dans la gamme de $3,047 \pm 0,004 - 132,952 \pm 0,016$ mg/g et $96,833 \pm 0,027 - 600 \pm 0,017$ mg/g d'extrait brut de propolis, respectivement. L'activité bactéricide des extraits éthanoliques était très élevée contre *Shewanella putrefaciens* (non pathogène), alors qu'elle était moyenne contre *Photobacterium damsela* et très faible contre *Vibrio harveyi* deux bactéries pathogènes marines. La plus faible activité bactéricide était toujours celle trouvée pour les extraits aqueux. Enfin, les effets *in vitro* de la propolis sur les activités des leucocytes de la dorade dorée (*Sparus aurata L.*) ont été étudiés. Les extraits éthanoliques et deux extraits aqueux (de Babor et de Ain-Abbassa) ont provoqué une diminution significative de la viabilité cellulaire lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations de 100 et 200 μ g / ml. En outre, des effets inhibiteurs significatifs ont été enregistrés sur l'activité du Burst respiratoire des leucocytes. Cet effet était dose-dépendante dans tous les cas sauf dans le cas de l'échantillon de Boutaleb. Les résultats obtenus suggèrent que certains des extraits de propolis algériennes ont une activité bactéricide contre d'importants agents pathogènes bactériens de la dorade et des activités de leucocytes *in vitro* significativement modulables, confirmant leur potentiel en tant que source de nouveaux biocides naturels et / ou immunomodulateurs dans la pratique de l'aquaculture.

Mots-clés: Propolis algérienne; Analyse GC-MS; Teneur en polyphénol; Activité antioxydante; Activité bactéricide; Dorade dorée (*Sparus aurata L.*) ; Immunité innée.