

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – مختار

ANNABA عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE D'EXCELLENCE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUÉE

Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat LMD

Domaine : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Animale

Intitulé

Qualité des produits dérivés des abeilles domestiques locales
(Hymenoptera, Apidae) : Caractérisation chimique, valorisation
biologique et thérapeutique

Présentée par : AYAD Ahmed Sabri

Devant un jury composé de :

Pr. BOUDJELIDA Hamid	Président	Université d'Annaba
Pr. DAAS Tarek	Directeur de thèse	Université d'Annaba
Pr. SMAGGHE Guy	Co-Directeur de thèse	Université de Ghent-Belgique
Pr. BOURENANE Naziha	Examineur	Université d'Annaba
Pr. TINE-DJEBAR Fouzia	Examineur	Université de Tébessa
Pr. HOUHAMDI Moussa	Examineur	Université de Guelma

REMERCIEMENTS

J'exprime ma gratitude à mon directeur de thèse, le Professeur *DAAS Tarek* d'avoir accepté de diriger ce travail.

Je témoigne également ma gratitude à mon co-directeur de thèse, le Professeur *SMAGGHE Guy* pour sa précieuse collaboration et son soutien.

Je remercie le Professeur *BOUDJELIDA Hamid* d'avoir accepté de présider ce jury de soutenance. Je remercie les professeurs *BOURENANE Naziha*, *TINE-DJEBAR Fouzia* et *HOUHAMDI Moussa* d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit de thèse de doctorat.

Je remercie le Professeur *SURETTE Marc* et son équipe et le Professeur *TOUAIBIA Mohamed* de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires à l'Université de Moncton, Canada. Je les remercie infiniment pour leur aide précieuse, leur confiance et leur accompagnement scientifique durant mon séjour.

J'exprime mes remerciements au Docteur *ALBURAKI Mohamed* pour sa précieuse contribution dans la réalisation de l'analyse génétique au niveau du laboratoire de recherche sur les abeilles aux Etats-Unis.

Je remercie les membres de l'Association des Apiculteurs Professionnels ANAP pour leur serviabilité et leur collaboration.

Je remercie aussi le Docteur *BARHOUCHE Badra* de m'avoir accueilli au niveau du laboratoire de microbiologie, Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques, Constantine et pour son aide dans la réalisation de la partie microbiologie de la thèse.

Enfin, j'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	01
CHAPITRE I : Valorisation biologique et thérapeutique de la propolis	
1. INTRODUCTION	04
2. MATERIEL ET METHODES	06
2.1. Présentation de l'abeille et organisation sociale	06
2.2. Choix des stations d'étude	08
2.3. Echantillonnage des abeilles	08
2.4. Analyse moléculaire	09
2.4.1. Extraction de l'ADN	09
2.4.2. Amplification de la région intergénique COI-COII par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose	09
2.4.3. Digestion enzymatique et électrophorèse sur gel de polyacrylamide	10
2.5. Collecte et extraction de la propolis	10
2.5.1. Collecte de la propolis	10
2.5.2. Extraction de la propolis	12
2.6. Dosage des composés phénoliques de la propolis	12
2.6.1. Dosage des polyphénols totaux	12
2.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux	13
2.7. Caractérisation chimique des extraits de propolis	14
2.8. Activité antiradicalaire	15
2.9. Activité anti-oxydante	16
2.10. Activité anticancéreuse	16
2.10.1. Culture cellulaire	16
2.10.2. Comptage des cellules	17
2.10.3. Isolement et culture des lymphocytes	17
2.10.4. Test de l'apoptose	17
2.10.5. Test de la viabilité cellulaire	18
2.11. Activité anti-inflammatoire	18
2.11.1. Culture cellulaire	18
2.11.2. Test de la biosynthèse des produits 5-LO dans les cellules HEK293	18
2.12. Activité acaricide	19
2.12.1. Collecte de <i>Varroa destructor</i>	19
2.12.2. Réalisation du test anti-varroa	20
2.13. Activité antibactérienne	21

2.13.1. Souches bactériennes	21
2.13.2. Mesure de l'activité antibactérienne	21
2.13.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	22
2.14. Analyses statistiques	22
3. RESULTATS	23
3.1. Identification moléculaire des abeilles	23
3.2. Teneurs en polyphénols totaux de la propolis	24
3.3. Teneurs en flavonoïdes totaux de la propolis	25
3.4. Caractérisation chimique des extraits de propolis	25
3.5. Activité antiradicalaire de la propolis	27
3.6. Activité antioxydante de la propolis	28
3.7. Analyse de la mort cellulaire apoptotique	29
3.8. Viabilité cellulaire	35
3.9. Biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293	35
3.10. Analyse de l'activité antibactérienne de la propolis	37
3.10.1. Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes	37
3.10.2. Concentration minimale inhibitrice de la propolis	37
3.11. Effet acaricide de la propolis	38
4. DISCUSSION	42
5. CONCLUSION	52
CHAPITRE II : Valorisation biologique et thérapeutique de la gelée royale	
1. INTRODUCTION	53
2. MATERIEL ET METHODES	55
2.1. Collecte et préparation des échantillons de gelée royale	55
2.2. Quantification de l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA) dans la gelée royale	55
2.3. Dosage des polyphénols totaux	56
2.4. Dosage des flavonoïdes totaux	57
2.5. Activité antiradicalaire	57
2.6. Activité antioxydante	58
2.7. Activité anticancéreuse	58
2.7.1. Test de la mort cellulaire apoptotique	58
2.7.2. Test de la viabilité cellulaire	59
2.8. Activité anti-inflammatoire	59
2.9. Analyses statistiques	60

3. RESULTATS	61
3.1. Teneurs en acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA)	61
3.2. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, activités antiradicalaire et antioxydante	62
3.3. Activité anticancéreuse	63
3.4. Test de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans des cellules HEK293	65
4. DISCUSSION	67
5. CONCLUSION	72
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	73
RESUMES	75
7.1. Français	75
7.2. Anglais	77
7.3. Arabe	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80
ANNEXES	
Production scientifique	

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Taxonomie d' <i>Apis mellifera intermissa</i> et d' <i>Apis mellifera sahariensis</i> .	06
Figure 2. Différentes castes d' <i>A. mellifera intermissa</i> .	07
Figure 3. Cycle de développement des trois castes.	07
Figure 4. Situation géographique des stations de prélèvement de la propolis.	08
Figure 5. Dispositif de la collecte de la propolis.	11
Figure 6. Méthode de collecte de la propolis à partir des grilles à propolis.	11
Figure 7. Courbe standard du dosage des polyphénols (acide gallique).	13
Figure 8. Courbe standard du dosage des flavonoïdes (quercétine).	14
Figure 9. Collecte de <i>Varroa destructor</i> à partir d'un cadre à couvain.	19
Figure 10. Evaluation de l'activité acaricide des extraits de propolis par application topique sur <i>Varroa destructor</i> et par pulvérisation sur les abeilles et <i>V. destructor</i> .	20
Figure 11. Réseau des haplotypes de la région COI-COII de l'ADNmt.	23
Figure 12. Teneurs en polyphénols totaux des extraits de propolis.	24
Figure 13. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de propolis.	25
Figure 14. Activité anti-oxydante des échantillons de propolis.	29
Figure 15. Pourcentages moyens de cellules Jurkat vivantes après traitement avec différentes concentrations de propolis pendant 3 jours.	30
Figure 16. Pourcentages moyens de cellules Reh vivantes après traitement avec différentes concentrations de propolis pendant 3 jours.	30
Figure 17. Pourcentages moyens des lymphocytes vivants et apoptotiques après 3 jours de traitement avec des extraits de propolis.	34
Figure 18. Inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293 par différentes concentrations de propolis.	36
Figure 19. Evaluation de l'activité acaricide des extraits de propolis sur <i>Varroa destructor</i> par application topique.	39
Figure 20. Evaluation de l'effet des extraits de propolis sur la survie de <i>Varroa destructor</i> et des abeilles par la méthode de pulvérisation.	40
Figure 21. Courbe standard de la teneur en polyphénols (acide gallique).	56
Figure 22. Courbe standard de la teneur en flavonoïdes (quercétine).	57
Figure 23. Viabilité cellulaire des cellules cancéreuses Jurkat et Reh après traitement avec des échantillons de gelée royale pendant 3 jours.	64
Figure 24. Inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293 par des échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée.	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Identification des haplotypes mitochondriaux.	24
Tableau 2. Détermination de la composition chimique des extraits de propolis algérienne par LC-MS/MS.	26
Tableau 3. Activité antiradicalaire des extraits de propolis mesurée par piégeage des radicaux libres.	28
Tableau 4. Valeurs des CI_{50} de l'activité anti-oxydante des extraits de propolis.	29
Tableau 5. Pourcentages moyens de cellules Jurkat vivantes et apoptotiques après traitement avec des extraits de propolis.	31
Tableau 6. Pourcentages moyens de cellules Reh vivantes et apoptotiques après traitement avec des extraits de propolis.	32
Tableau 7. Valeurs des CI_{50} de l'apoptose des cellules Jurkat et Reh après traitement avec des extraits de propolis.	33
Tableau 8. Pourcentages moyens des lymphocytes vivants et apoptotiques après traitement avec des extraits de propolis.	34
Tableau 9. Valeurs des CI_{50} de la viabilité des cellules Jurkat et Reh après incubation avec des extraits de propolis.	35
Tableau 10. Valeurs des CI_{50} de l'inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO par des extraits de propolis.	36
Tableau 11. Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de propolis sur des bactéries de référence.	37
Tableau 12. Concentration minimale inhibitrice des extraits de propolis ($\mu\text{g/mL}$) pour chaque souche bactérienne testée.	38
Tableau 13. Teneur en acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10HDA) dans la gelée royale fraîche et lyophilisée.	61
Tableau 14. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, activités antiradicalaire (DPPH) et anti-oxydante des échantillons de gelée royale.	63
Tableau 15. Pourcentages moyens de cellules Jurkat et Reh vivantes et apoptotiques après traitement avec des échantillons de gelée royale ($200 \mu\text{g/mL}$).	65

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

De nombreux ordres d'insectes participent à la pollinisation, notamment les Diptères, les Lépidoptères, les Coléoptères et les Hyménoptères. Parmi ces derniers, les abeilles, principalement les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) jouent un rôle prédominant en tant que pollinisateurs. Grâce à la pollinisation, les abeilles domestique participant au maintien de la biodiversité végétale et à l'équilibre des écosystèmes (Anderson *et al.*, 2011; Krupke *et al.*, 2012).

Malgré leur importance, un déclin des abeilles a été enregistré à l'échelle mondiale. Les causes de ce déclin sont multifactorielles et sont en relation avec des facteurs environnementaux et anthropiques auxquels sont exposées les populations d'abeilles. Aussi, les différents pathogènes et parasites pouvant affecter le cheptel apicole contribuent à l'affaiblissement et aux mortalités des colonies d'abeilles (Vanengeldorp *et al.*, 2009; Vanengledrop & Meixner, 2010). L'utilisation des pesticides en agriculture et des acaricides et autres traitements à l'intérieur des ruches exposent également les abeilles à des risques toxicologiques (Loucif *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2014; Menail *et al.*, 2020; Benchaabane *et al.*, 2022).

Au cours de la dernière décennie, l'apiculture en Algérie s'est remarquablement développée grâce aux efforts des associations des apiculteurs amateurs et professionnels et des scientifiques du domaine apicole. Plusieurs études ont été réalisées en Algérie sur les abeilles. Dans un premier temps, il était important de connaître la biodiversité des populations d'abeilles locales. Trois principales approches ont été envisagées. La première a fait appel à la morphométrie classique en effectuant des mensurations sur les différentes parties du corps des abeilles (Loucif-Ayad & Tahar, 2001; Bendjedid & Achou, 2014). La deuxième approche a concerné la morphométrie géométrique basée sur la configuration des points-repères (Landmarks) (Barour *et al.*, 2011; Barour & Baylac, 2016) et enfin la troisième approche a utilisé des marqueurs moléculaires tels que l'ADN mitochondrial (ADNmt) et les microsatellites pour la caractérisation de la diversité génétique des populations d'abeilles locales. Les études réalisées ont permis la confirmation de l'existence de deux sous-espèces d'abeilles mellifères endémiques appartenant à la lignée africaine A en Algérie: *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis* (Chahbar *et al.*, 2013; Loucif-Ayad *et al.*, 2014; Achou *et al.*, 2015).

Aussi, l'état sanitaire du cheptel apicole est important et nécessite des contrôles et des observations au niveau des ruchers car une détection précoce des symptômes et la

reconnaissance des maladies permettent de préserver au maximum la santé des abeilles. Les pathologies peuvent présenter des signes cliniques spécifiques ou être asymptomatiques et les agents pathogènes ne sont pas tous observables directement. Pour cela, des techniques de microscopie et de microbiologie associées aux techniques de biologie moléculaire sont nécessaires pour révéler la présence d'acariens, de bactéries, de microsporidies et de virus chez les abeilles. Ces techniques ont permis la détection de plusieurs maladies et agents pathogènes dans les populations d'abeilles locales. Des acariens parasites (*Varroa destructor*, *Acarapis woodi*); des microsporidies [*Nosema ceranae*, *Nosema apis*, *Nosema bombi*]; des protozoaires (*Apicystis bombi*, *Crithidia mellificae*), des bactéries (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*) et plusieurs virus (virus des ailes déformées (DWV), virus du couvain sacciforme (SBV), virus du Cachemire (KBV), virus de la paralysie aiguë (ABPV), virus du lac *Sinai* (LSV), virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV), virus de la paralysie lente (SBPV) et virus de la paralysie chronique (CBPV)] ont été répertoriés. A cela s'ajoute un parasitisme par des diptères *Megaselia scalaris* et *Senotainia tricuspis* (Loucif-Ayad *et al.*, 2013; Adjlane & Haddad, 2014; Haddad *et al.*, 2015; Menail *et al.*, 2016; Loucif-Ayad *et al.*, 2023). Tous ces pathogènes peuvent co-infecter les populations d'abeilles et leur synergie peut mener à la perte des colonies (Cornman *et al.*, 2012).

Les abeilles mellifères sont également importantes grâce aux produits qu'elles élaborent. Ces produits de la ruche sont connus non seulement pour leur importance économique grâce à leur commercialisation mais aussi pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils sont impliqués dans des domaines très variés afin de contenter les exigences d'un public désireux de retrouver des produits naturels et sains. Le miel, le pollen, la gelée royale et la propolis sont particulièrement connus en tant que compléments alimentaires grâce à leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. Le miel possède des propriétés énergétiques, nutritionnelles et antibactériennes. Le pollen possède également des propriétés énergétiques et nutritionnelles. La gelée royale présente des actions stimulantes, antibactériennes et nutritives. La propolis, antivirale, antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire est quant à elle, plutôt employée dans le domaine thérapeutique. Les produits de la ruche, notamment le miel, la propolis et la gelée royale peuvent exercer plusieurs effets positifs sur la santé tels que des effets antioxydants (Yang *et al.*, 2011), antifongiques (Koç *et al.*, 2011), antiviraux (Shimizu *et al.*, 2011), antiparasitaires (Abdel-Fattah & Nada, 2007; Fidalgo *et al.*, 2011), antibactériens (Kim *et al.*, 2011; Ramanauskienė & Inkėnienė, 2011) et cicatrisants (Pessolato *et al.*, 2011). Ces produits, dont la composition est variable, possèdent une certaine richesse

en composants recherchés en thérapeutique humaine. Dès lors, ils présentent un potentiel intéressant dans de nombreux domaines notamment la dermatologie, la microbiologie, la stomatologie et la cancérologie. De ce fait, les abeilles domestiques et les produits de la ruche sont d'une importance primordiale à large contribution dans les domaines agronomique, écologique, économique et thérapeutique (Martinello & Mutinelli, 2021).

Pour cela, la conservation des abeilles autochtones constitue une priorité urgente étant donné qu'elles sont des réservoirs importants d'attributs souhaités tels que l'adaptation locale à l'environnement local et la résistance aux facteurs de stress biotiques et abiotiques locaux. Ainsi, des stations de fécondation et d'élevage de reines ont été créées en Algérie afin de permettre aux apiculteurs de s'acquérir des reines d'abeilles de souche contrôlée et de promouvoir leurs produits naturels tels que la propolis et la gelée royale.

Deux principaux chapitres ont fait l'objet de cette étude.

Le premier chapitre est relatif à la valorisation biologique et thérapeutique de la propolis récoltée par les deux sous-espèces d'abeilles locales algériennes (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) au niveau de trois stations de fécondation contrôlées des reines (Annaba, Médéa et Ghardaïa).

- Dans un premier temps, une confirmation de l'appartenance des abeilles situées dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines à la lignée Africaine a été faite par l'emploi des outils moléculaires.
- Par la suite, la valorisation de la propolis a été effectuée par la détermination :
 - des teneurs en composés phénoliques
 - des activités biologiques: antiradicalaire, antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antibactérienne et acaricide.

Le second chapitre concerne la valorisation biologique et thérapeutique de la gelée royale par la détermination :

- des teneurs en composés phénoliques et en acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA)
- des activités biologiques: antiradicalaire, antioxydante, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

Chapitre I

Valorisation biologique et thérapeutique de la propolis

1. INTRODUCTION

La propolis est un mélange complexe formé de matières résineuses et balsamiques provenant de diverses parties des plantes, telles que les bourgeons, les pousses et les feuilles, et qui est recueillie par les abeilles mellifères puis mélangée à leur salive (Ahn *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2019). Elle est utilisée par les abeilles comme barrière protectrice afin de sceller la ruche contre les conditions climatiques défavorables (Wilson-Rich *et al.*, 2008), de stériliser la ruche pour empêcher la prolifération de micro-organismes envahissants et d'éloigner les agents pathogènes et les prédateurs (Bankova *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2014). La propolis est composée de 50% de résines, 30% de baumes, 10% de cire, 5% d'huiles essentielles et aromatiques, 5% de pollen et d'autres substances dont les dérivés des acides phénoliques, l'acide cinnamique, les acides benzoïques substitués, les acides aminés et les flavonoïdes (Bankova *et al.*, 2000; Rufatto *et al.*, 2017). La composition chimique de la propolis dépend de la source des plantes, de la situation géographique (Dantas Silva *et al.*, 2017), de la sous-espèce d'abeilles (Silici *et al.*, 2005) et de la saison de la collecte (Tagliacollo *et al.*, 2011). La propolis présente un large éventail d'activités biologiques, notamment antibactériennes (Nedji *et al.*, 2014), antifongiques (Silici *et al.*, 2005), immunomodulatrices (Cheung *et al.*, 2011), antivirales (Yildirim *et al.*, 2016) antiparasitaires (Dantas *et al.*, 2006), anti-oxydantes (Yangi *et al.*, 2018; Kocot *et al.*, 2018), anti-inflammatoires (Hu *et al.*, 2005; Yangi *et al.*, 2018) et anticancéreuses (Szliszka *et al.*, 2013; Dogan *et al.*, 2020). Les flavonoïdes et les polyphénols sont les familles des molécules les plus bioactives présentes dans la propolis à l'origine de ces activités.

Compte tenu des diverses applications de la propolis et de son utilisation accrue, les objectifs de cette étude étaient tout d'abord

- (1) d'évaluer le statut génétique des populations d'abeilles mellifères situées dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines d'abeilles en Algérie.
- (2) de déterminer la composition chimique ainsi que les teneurs en composés phénoliques des extraits de propolis recueillis auprès des deux sous-espèces d'abeilles locales dans les trois stations
- (3) de tester les activités biologiques :
 - antioxydante et antiradicalaire,

- pro-apoptotique et antiproliférative contre des lignées cellulaires de leucémie lymphocytaire aiguë humaine,
- anti-inflammatoire et antibactérienne,
- acaricide à l'encontre de l'ectoparasite de l'abeille : *Varroa destructor*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de l'abeille et organisation sociale

L'abeille mellifère algérienne appartenant à la lignée Africaine A est représentée par *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) et *Apis mellifera sahariensis* (Baldensperger, 1924).

La position systématique d'*A. mellifera intermissa*/ *A. mellifera sahariensis* est la suivante:
Embranchement : Arthropoda

Sous embranchement : Antennata

Classe : Insecta

Sous-classe : Pterygota

Ordre : Hymenoptera

Sous-ordre : Apocrita

Section : Aculeata

Famille : Apidae

Genre : *Apis*

Espèce : *Apis mellifera*

Sous-espèce : *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906)

Sous-espèce : *Apis mellifera sahariensis* (Baldensperger, 1924)

Figure 1. Taxonomie d'*Apis mellifera intermissa* et d'*Apis mellifera sahariensis*.

Chaque colonie d'abeilles est composée de trois castes : la reine (femelle reproductrice), les faux-bourdons (mâles) et les ouvrières (femelles non fertiles) ainsi que le couvain renfermant des œufs, des larves et des nymphes (Fig. 2). Chaque caste présente des fonctions particulières qui sont indispensables à la survie de la colonie (Martin, 2001).

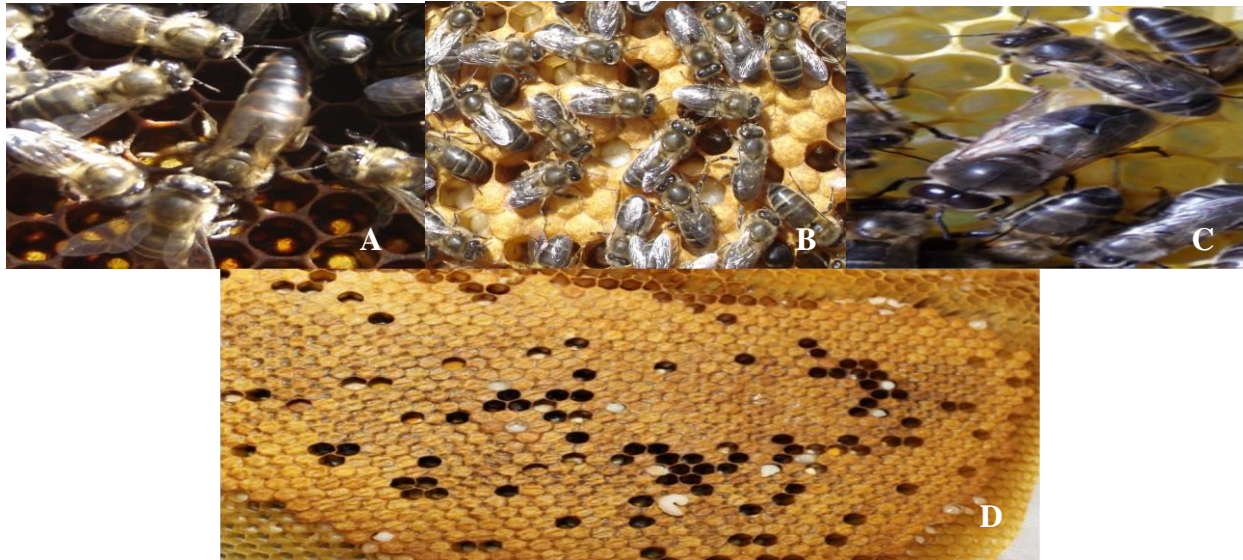


Figure 2. Différentes castes d’*A. mellifera intermissa*. A: Reine (*Grx3*); B: Ouvrière (*Grx1,2*); C: Faux bourdon (*Grx4*); D: Couvain (photos personnelles).

Le cycle de développement diffère en fonction de la caste (Fig.3). La reine possède un cycle de développement de 16 jours contre 21 jours pour les ouvrières et 24 jours pour les faux-bourdon (Caron, 1999). L’espérance moyenne de vie est de 3 ans pour la reine, de 15 à 70 jours pour les abeilles d’été et de 170 à 243 jours pour celles d’hiver et de 60 jours pour les mâles (Page & Peng, 2001).

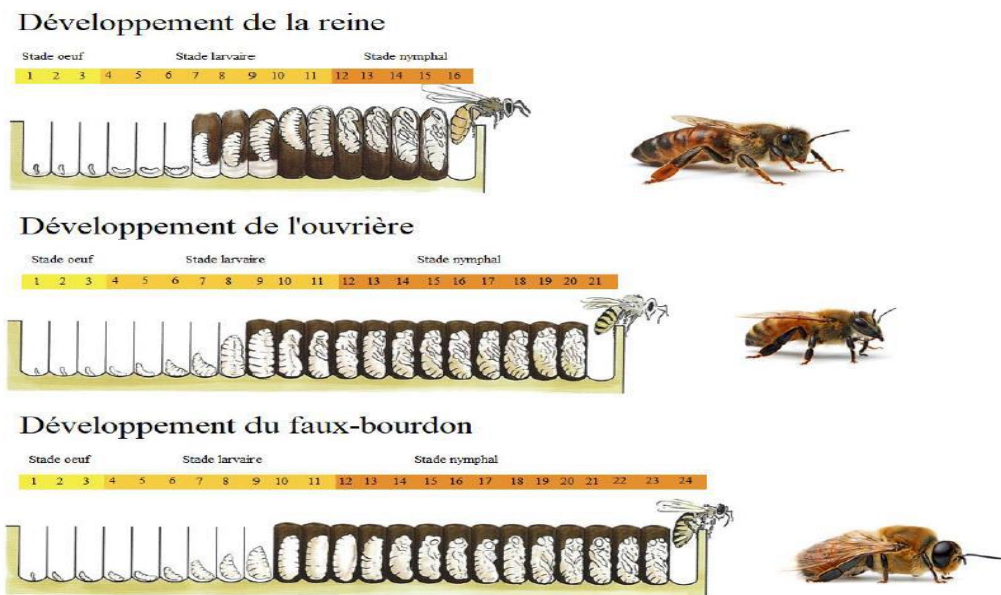


Figure 3. Cycle de développement des trois castes (Riva, 2017).

2.2. Choix des stations d'étude

Trois stations de fécondation contrôlée des reines situées à Annaba ($36^{\circ}54'40.8''\text{N}$, $7^{\circ}41'46.5''\text{E}$), Médéa ($36^{\circ}14'12.9''\text{N}$, $2^{\circ}57'22.6''\text{E}$) dans le nord-est et le centre de l'Algérie respectivement et Ghardaïa ($32^{\circ}44'54.5''\text{N}$, $4^{\circ}31'10.9''\text{E}$) dans le sud de l'Algérie ont été sélectionnées (Fig. 4).



Figure 4. Situation géographique des stations de prélèvement de la propolis.

Les stations de fécondation de Médéa et de Ghardaïa ont été mises en place par l'Association Nationale des Apiculteurs Professionnels (ANAP) et permettent de sélectionner et de préserver le patrimoine génétique des abeilles autochtones et de maîtriser l'élevage des reines d'abeilles et des mâles. Au niveau de la station d'Annaba, des reines fécondées en provenance de la station de fécondation de Médéa ont été introduites dans un rucher présélectionné.

2.3. Echantillonnage des abeilles

Pour l'étude génétique, des abeilles ouvrières, d'âge indéterminé, ont été prélevées à l'intérieur des ruches, à raison de quatre ouvrières par colonie dans 24 colonies réparties dans les trois stations d'étude durant l'hiver 2022. Les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol (97%) jusqu'au processus de l'extraction de l'ADN.

2.4. Analyse moléculaire

2.4.1. Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait selon la méthode Chelex à partir des pattes d'ouvrières (Walsh *et al.*, 2013) avec de légères modifications (Madella *et al.*, 2020). Pour chaque abeille, après broyage des pattes, chaque broyat obtenu a été additionné de 100 µl de solution chaude (60°C) de Chelex à 10 % et placé dans un puits de la plaque à 96 puits. Avant de sceller les plaques, 6 µl de protéinase K (10 mg/mL) ont été rajoutés à chaque puits et les plaques ont été placées sur un thermocycleur (Bio-Rad CFX1000 Touch) avec les cycles suivants : 60°C pendant 1 heure, 99°C pendant 15 minutes, 37°C pendant 1 minute, 99°C pendant 15 minutes et un arrêt final à 5°C. Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C pour des analyses ultérieures.

2.4.2. Amplification de la région intergénique COI-COII par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

Afin d'identifier et de confirmer l'appartenance des sous espèces à la lignée africaine A au niveau des trois stations d'étude, le test *in silico* de l'ADNmt COI-COII a été réalisé (Alburaki *et al.*, 2022). La région non codante intergénique de l'ADNmt située entre les cytochromes oxydases I et II a été amplifiée par PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase servant à multiplier des séquences d'ADN) à l'aide d'un nouvel ensemble d'amorces, validé dans Madella *et al.* (2020) et capable de capturer toute la longueur de la séquence de la région COI-COII. Cette amplification par PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 14 µL comprenant 6 µL de Master Mix pour PCR (2X), 0,5 µL de chaque amorce (10 µM), 5 µL d'eau exempte de nucléase et 2 µL d'ADN. Cette amplification a été faite selon un programme qui consiste en 3 min de dénaturation initiale à 92°C suivie de 35 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 92°C, 90 secondes d'hybridation à 47°C et 2 min d'élongation à 63°C, et finalement 10 min d'élongation à 63°C et un maintien final à 5°C. Par la suite, une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % a été réalisée. Pour chaque échantillon, une fraction aliquote de 2µl d'ADN amplifié est mélangée à 4 µl de bleu de bromophénol puis soumise, en présence d'un marqueur de taille, à une électrophorèse. Le gel a été par la suite plongé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) puis visualisé sous un transilluminateur à ultra-violet (U.V.) afin de définir la taille du fragment amplifié.

2.4.3. Digestion enzymatique et électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'amplifiat de chaque échantillon a été mis à digérer, grâce à une enzyme de restriction: la DraI. Après digestion enzymatique, 10 µl de bleu de bromophénol ont été ajoutés dans l'ensemble des amplifiats digérés. Pour chaque échantillon, 10 µl de ce mélange ont été soumis, en présence d'un marqueur de taille, à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5%. Les longueurs des fragments de restriction ont été visualisées au transilluminateur à U.V. après dépôt du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) afin de déterminer les différents haplotypes mitochondriaux.

2.5. Collecte et extraction de la propolis

2.5.1 Collecte de la propolis

Les échantillons de propolis ont été collectés dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines. L'échantillonnage a été effectué entre janvier et avril 2022. Des grilles à propolis, en plastique souple, dotées d'interstices que les abeilles combleront avec de la propolis ont été déposées à l'intérieur des ruches, au dessus des cadres, afin de récolter le maximum de propolis (Fig. 5). Après une période d'un mois, les grilles à propolis ont été récupérées puis stockées à l'obscurité à -20°C afin de solidifier la propolis et faciliter sa manipulation.



Figure 5. Dispositif de la collecte de la propolis (photos personnelles).

Afin de procéder à l'extraction de la propolis, les grilles ont été retirées du congélateur et la propolis a été détachée puis broyée à l'aide d'un mortier réfrigéré et conservés à -20°C une fois réduite en poudre (Fig. 6).



Figure 6. Méthode de collecte de la propolis à partir des grilles à propolis (photos personnelles).

2.5.2. Extraction de la propolis

Chaque 10g de propolis en poudre ont été pesés et auxquels ont été rajoutés 40 mL d'éthanol (à 70%). Chaque mélange a été placé dans un appareil à ultrasons (Sonicator: Qsonica ultrasound processor, Qsonica L.L.C, Newtown, CT, USA, équipé d'une sonde) pendant 20 min (40 W; 20% d'amplitude). Les mélanges ont été conservés pendant 24h puis ont été centrifugés pendant 10 min à 1,644 g. Les suspensions ont été congelées à -20°C pendant 24h et filtrées afin d'éliminer les cires et les débris. Les solutions ont été par la suite évaporées et séchées sous vide et sous pression réduite à température ambiante (Cunha *et al.*, 2004; Sambou *et al.*, 2020). Toutes les procédures ont été effectuées en triplicata.

2.6. Dosage des composés phénoliques de la propolis

2.6.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur des polyphénols totaux de la propolis a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu comme décrite par Sambou *et al.* (2020). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique $N(H_3PW_{12}O_{40})$ et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). En milieu basique, ce réactif oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques. Les produits de réduction (oxydes métalliques de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_{23}) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption à 725 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait (Ortiz *et al.*, 2013). Ainsi, la quantité des polyphénols pour chaque extrait a été déterminée par la projection de la valeur de la densité optique à 760 nm sur une courbe étalon d'un polyphénol standard (acide gallique) réalisée dans les mêmes conditions. Pour cela, 100 μ L des extraits méthanoliques de propolis (1 mg/mL) ont été mélangés avec 500 μ L d'eau et 100 μ L de Folin-Ciocalteu. Après six minutes, 1 mL de carbonate de sodium (7%) et 500 μ L d'eau ont été ajoutés respectivement. Les solutions obtenues ont été conservées pendant 90 min à l'obscurité. Ensuite, 100 μ L de chaque dilution ont été déposés en triplicata dans une plaque de 96 puits et l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre multiplaques à 760 nm. Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la comparaison de la densité optique observée à celle obtenue en utilisant des solutions standards d'acide gallique (0,03-1 mg/mL) (Fig. 7).

Les résultats obtenus ont été exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de propolis (mg EAG/g EP).

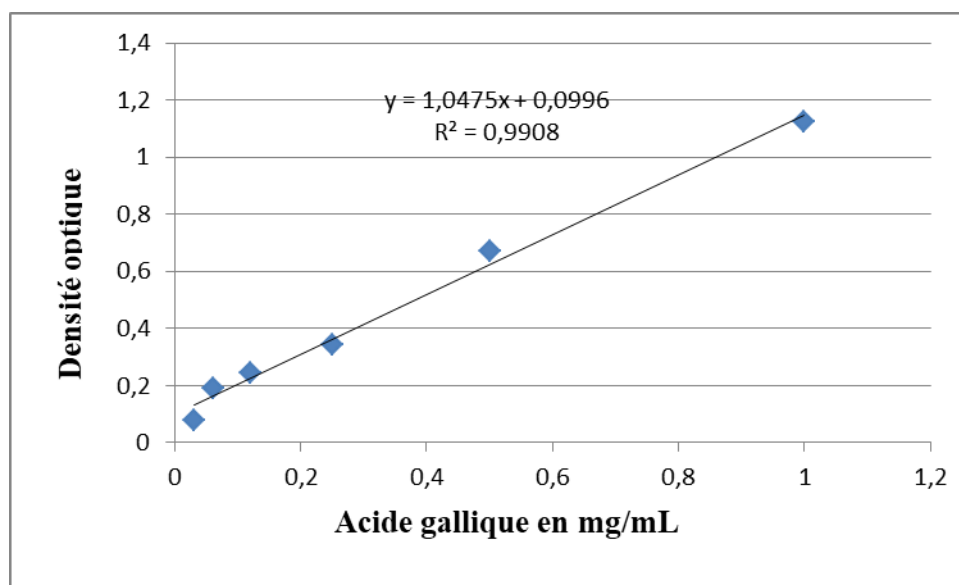


Figure 7. Courbe standard du dosage des polyphénols (acide gallique).

2.6.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode colorimétrique comme décrite par [Sambou *et al.* \(2020\)](#). Le réactif utilisé est une solution incolore de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif entraînant la formation d'un complexe brunâtre qui est absorbé à 510 nm. La comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon de quercétine (0, 12 - 10 mg/mL) a permis d'évaluer la teneur en flavonoïdes totaux (Fig. 8).

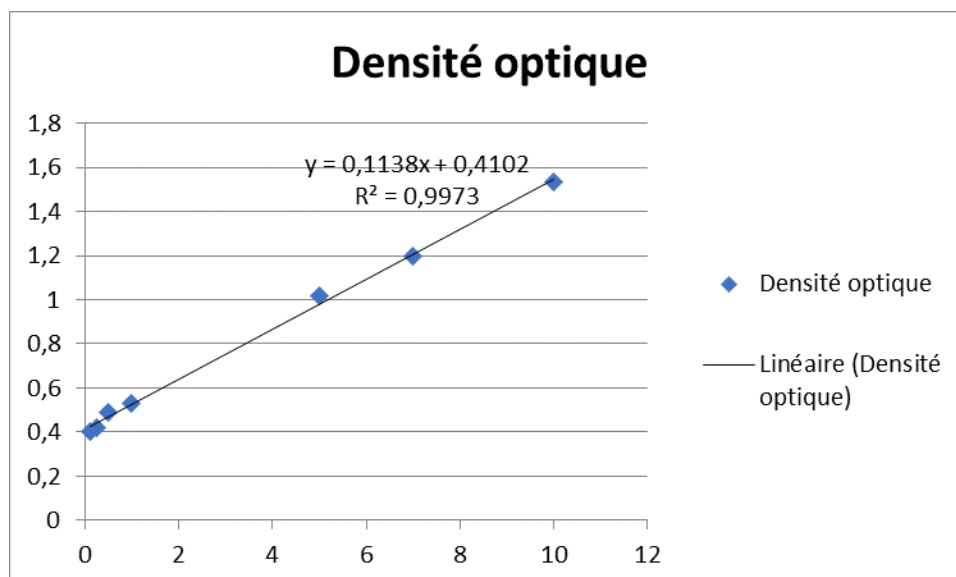


Figure 8. Courbe standard du dosage des flavonoïdes (quercétine).

Pour cela, 100 μL des extraits méthanoliques de propolis (1 mg/mL) ont été mélangés avec 500 μL d'eau distillée et 100 μL de nitrate de sodium à 5%. Après six minutes, 150 μL d'une solution de chlorure d'aluminium à 10% ont été ajoutés et 5 min plus tard, 200 μL d'une solution d'hydroxyde de sodium 1M ont été ajoutés. 100 μL de la solution obtenue ont été déposés en triplicata dans une plaque à 96 puits et l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre multiplaques à 510 nm. Les teneurs en flavonoïdes totaux ont été exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait de propolis (mg EQ/g EP).

2.7. Caractérisation chimique des extraits de propolis

Les profils chimiques des extraits de propolis ont été analysés par chromatographie liquide en gradient à micro-échelle (Ultimate 3000, Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) couplée à un spectromètre de masse quadripolaire-Orbitrap à haute résolution/précision utilisant une source d'ionisation par électrospray assistée pneumatiquement en mode ion négatif comme décrit par [Sambou et al. \(2020\)](#). Les échantillons des extraits complexes ont été fractionnés par chromatographie liquide à gradient en ligne avec une colonne à phase inversée (Altima C18) de 10 cm de long et de 1,0 mm de diamètre avec des particules de 3 μm (VWR, Mississauga, ON, Canada). Les solvants "A" et "B" ont été acheminés vers la colonne à un débit combiné de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le solvant "A" était constitué d'acide formique aqueux à 0,1% tandis que

le solvant "B" était composé de 90/9,9/0,1 v/v/v acétonitrile/eau/acide formique. Le gradient LC a commencé à 5% B et a été augmenté jusqu'à 100% B pendant 20 minutes. La colonne a ensuite été rincée à 100% B pendant 5 minutes et rééquilibrée à 5% B pendant 15 minutes supplémentaires avant l'injection de l'échantillon suivant. Chaque extrait a d'abord été dissout dans 500 µl d'éthanol, puis dilué 20 fois dans 50/50 éthanol/eau. Pour la détection des composés, le spectromètre de masse a été utilisé en mode ionique négatif à la résolution maximale de 140 000 sur une plage masse/charge de 100-700 Thomson (Th). Le spectromètre de masse a été étalonné à l'aide du mélange d'étalonnage commercial d'ions négatifs (de Thermo-Fisher Scientific). Les temps de rétention et les fragments de masse caractéristiques ont été comparés à 24 standards (Sambou *et al.*, 2020).

2.8. Activité antiradicalaire

Le potentiel antiradicalaire des extraits de propolis a été évalué par la méthode colorimétrique en utilisant le test DPPH. La méthode consiste en la réduction du radical pourpre stable du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) en présence d'anti-oxydant et, en la formation de la forme non radicale DPPH-H, jaune, à la fin de la réaction (Ferreira-Santos *et al.*, 2020). Pour cela, 200 µL de solution éthanol-DPPH (250 µM) ont été rajoutés aux échantillons de propolis à différentes concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100 et 125 µg/mL). Les tubes ont été agités, maintenus dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante puis les absorbances ont été mesurées à 517 nm par un spectrophotomètre multiplaques. Le DPPH avec l'éthanol a été utilisé comme contrôle, tandis que l'acide ascorbique a été employé comme référence lors de la comparaison avec les extraits de propolis. L'activité de piégeage des radicaux des échantillons a été calculée comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A1 - A2) / A1] \times 100 \text{ où}$$

A1 est l'absorbance de l'addition de l'éthanol au lieu de l'échantillon.

A2 est l'absorbance de la solution de l'échantillon du test.

Les concentrations de propolis qui inhibent 50% de radicaux DPPH (CI₅₀) ont été déterminées sur la base du pourcentage d'inhibition de chaque dilution d'échantillon et les résultats ont été exprimés en microgramme par mL (µg/mL).

2.9. Activité antioxydante

Le test antioxydant a été réalisé en suivant la méthode de [Boudreau *et al.* \(2012\)](#). La méthode consiste à rajouter 3,5 µL des extraits de propolis à différentes concentrations (5, 1, 0,3, 0,1 mg/mL) au mélange de 350 µL de solution tamponnée au phosphate à la concentration de 5 mM contenant 0,05 % de Tween 20 et 3,5 µL d'acide linoléique (0,16 mM). La réaction d'oxydation a été lancée en ajoutant 8,75 µL d'une solution de dichlorhydrate de 2,29-azobis (2-amidinopropane) (AAPH) (2mM) aux solutions. 100 µl du mélange ont ensuite été ajoutés dans une plaque à 96 puits à fond plat transparente aux U.V. Une condition sans acide linoléique a été utilisée pour une soustraction de matrice tandis qu'une condition sans AAPH (sans oxydation) a servi de contrôle. Après l'ajout de l'AAPH, ou de la solution saline tamponnée au phosphate (TPS) pour la réaction témoin, le taux d'oxydation des lipides a été déterminé en mesurant l'absorbance de chaque échantillon toutes les 5 minutes pendant 180 minutes en utilisant la détection U.V. à 234 nm (lecteur de microplaques hybride Synergy H1 de Biotek). L'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique a été calculée selon la formule suivante :

(%) = (1 - taux de changement de l'absorbance avec le composé testé / taux de changement d'absorbance avec le solvant).

2.10. Activité anticancéreuse

2.10. 1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires Jurkat (leucémie T aiguë humaine) et Reh (leucémie lymphocytaire aiguë humaine) ont été achetées à l'ATCC (Manassas, VA). Les cellules Jurkat et Reh qui ne sont pas adhérentes ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ dans un milieu de culture (RPMI 1640) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (SBF) et 100 µg/mL de pénicilline (pen) et 100 µg/mL de streptomycine (strep) (1% pen/strep). Les cellules non adhérentes ont été utilisées pour l'analyse de l'apoptose in vitro et les tests de viabilité cellulaire. Après 24 heures de culture des cellules, un contrôle quotidien de leur état est effectué afin de s'assurer de la non contamination de la culture et de vérifier la confluence et la viabilité cellulaires. Si la confluence est adéquate, un passage des cellules est réalisé sous la hotte. Concernant les cellules Jurkat et Reh, le passage consiste à transférer une partie des cellules dans de nouveaux flacons avec un volume de milieu de culture RPMI 1640 complété par 10% (SBF) et 1% de (pen/strep).

2.10.2. Comptage des cellules

La détermination du nombre cellulaire est une étape nécessaire qui précède chaque expérience. La méthode du bleu de trypan a été utilisée pour le dénombrement des cellules. Cette méthode permet de distinguer les cellules vivantes qui apparaissent claires entourées d'un halo bleu alors que les cellules mortes apparaissent totalement bleues. Un volume de 50 µl de la suspension cellulaire a été mélangé avec 50 µl de la solution du bleu de trypan 0,4 %. La solution obtenue a été incubée pendant 5 minutes à température ambiante puis, les deux chambres de l'hémocytomètre ont été remplies et les cellules ont été comptées à l'aide d'un microscope à phase inverse sous un objectif X10.

2.10.3. Isolement et culture des lymphocytes

Du sang frais a été prélevé sur des donneurs sains consentants au Centre de Médecine de Précision du Nouveau-Brunswick, à Moncton. Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été isolées par centrifugation avec un milieu de centrifugation à gradient de densité stérile de Ficoll-Paque comme décrit par [Böyum \(1968\)](#). Les cellules ont été lavées deux fois par centrifugation dans une solution saline tamponnée au phosphate (TPS). Les PBMC ont été cultivées pendant une nuit (37°C, 5% CO₂) dans du RPMI1640 contenant 10% de FBS et 1% de pen/strep pour la déplétion des monocytes par adhérence plastique. Les lymphocytes non adhérents ont été collectés le jour suivant, comptés et incubés pendant 72 heures dans un milieu de culture en présence de différentes concentrations des extraits de propolis.

2.10.4. Test de l'apoptose

Les cellules Jurkat et Reh ont étéensemencées dans des plaques à 12 puits à la densité de 1×10^6 cellules/puits dans un volume de 2 mL de milieu RPMI 1640 + 10% de FBS et 1% de pen/step. Ensuite, 4 µL de différentes concentrations des extraits de propolis ont été ajoutés aux cellules à des concentrations finales de 30, 10, 3, 1 ou 0,3 µg/mL. Les effets de la propolis sur l'apoptose ont été contrôlés après 72h. 500 µL de suspensions cellulaires ont ensuite été incubés avec 100 µL de solution Master mix (98,5 µL de tampon d'annexine V + 1 µL d'annexine V-647 et 0,5 µL Zombie aqua) pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité. L'apoptose a été mesurée par la cytométrie en flux (Attune NxT) avec le logiciel FACS Attune Nxt Software v4.2.0. Afin d'évaluer l'effet de la propolis sur des cellules normales non transformées, des lymphocytes isolés du sang périphérique ont été traités pendant 72h avec des extraits de propolis

à des concentrations proches de la CI_{50} (3 et 10 $\mu\text{g/mL}$) déterminée dans les cellules Jurkat et Reh.

2.10. 5. Test de la viabilité cellulaire

Le test de la viabilité cellulaire a été réalisé à l'aide du test CellTiter-Blue (Promega, Madison, WI, USA) comme décrit par [Riss *et al.* \(2016\)](#). Pour cela, 10^4 cellules Jurkat et Reh/100 μL dans un milieu complet ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits et incubées avec des extraits de propolis à différentes concentrations (30, 10, 3, 1, 0,3 $\mu\text{g/mL}$) pendant 72h. Ensuite, 20 μL de substrat CellTiter Blue ont été ajoutés aux suspensions cellulaires traitées et incubées à 37°C pendant 1h pour les cellules Jurkat et pendant 2h pour les cellules Reh. Les plaques ont été analysées sur un lecteur de microplaques à fluorescence (Synergy H1 Hybrid Microplate Reader) puis les CI_{50} ont été déterminées pour chaque extrait de propolis.

2.11. Activité anti-inflammatoire

2.11.1. Culture cellulaire

Les cellules HEK293 de rein embryonnaire humain authentifiées ont été achetées à l'ATCC (Manassas, VA). Les cellules HEK293 ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO_2 dans un milieu de culture (DMEM) avec 10% de sérum bovin fœtal (SBF) et 1% de pen/strep pour la réalisation du test d'inhibition de la 5-lipoxygénase. Le passage des cellules HEK293 consiste à l'aspiration de l'ancien milieu de culture et au lavage des cellules par le tampon TPS, ou, 4 mL de la trypsine-EDTA ont été additionnés et les cellules ont été incubées pendant 2 à 3 minutes à 37°C. Après détachement des cellules de la surface de la boîte de culture, un volume de 15 mL du milieu de culture a été ajouté et une homogénéisation a été pratiquée afin de bien séparer les cellules encore en agrégats. Après comptage et dilution, les cellules ont été transférées dans un nouveau flacon. Une homogénéisation a été pratiquée afin de répartir uniformément les cellules. Ces dernières ont subi deux passages avant d'être utilisées dans les expérimentations et le reste des cellules a été éliminé.

2.11. 2. Test de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293

Les cellules HEK293 ont été co-transfectées de façon stable avec un vecteur pcDNA3.1 exprimant la 5-LO et un vecteur pBUDCE4.1 exprimant la protéine activatrice de la 5-LO (FLAP) comme décrit par [Allain *et al.* \(2015\)](#). Les cellules transfectées ont été propagées dans le milieu de culture DMEM contenant 10% de FBS, 1% de pen/strep et incubées à 37°C dans un

incubateur humidifié. Pour la stimulation cellulaire des produits de la 5-LO, les cellules HEK293 transfectées ont été collectées après trypsinisation et les cellules ont été remises en suspension dans une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) contenant 1,6 mM CaCl₂ à une concentration de 10⁶ cellules/mL. Les cellules ont été préincubées avec les extraits de propolis à différentes concentrations (30, 10, 3, 1, 0,3 µg/mL) à 37°C pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 15 min à 37°C avec 10 µM d'ionophore calcique A23187 et 10 µM d'acide arachidonique. La réaction a été stoppée par l'ajout de 0,5 mL de solution d'arrêt froide (MeOH:MeCN, 1:1) contenant 200 ng/mL de 19-OH prostaglandine B2 (PGB2) comme standard interne (Doiron *et al.*, 2009; Sambou *et al.*, 2020). Les solutions obtenues ont été vortexées et congelées (-20°C). Elles ont été ensuite analysées par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) comme décrit précédemment par Robichaud *et al.* (2016).

2.12. Activité acaricide

2.12. 1. Collecte de *Varroa destructor*

Des colonies d'abeilles n'ayant pas été traitées contre le varroa au cours des 12 mois précédents ont été utilisées comme source d'acariens *V. destructor*. Un cadre à couvain a été récupéré de chaque ruche et la collecte des acariens a été effectuée à température ambiante en ouvrant et en inspectant chaque cellule du couvain au niveau du cadre (Fig. 9). Les acariens présents étaient collectés à l'aide d'un pinceau fin et placés dans des boîtes de Pétri contenant des larves et des pupes d'abeilles vivantes afin d'éviter que les acariens ne meurent de faim pendant les opérations de récolte et d'expérimentation.



Figure 9. Collecte de *Varroa destructor* à partir d'un cadre à couvain (photos personnelles).

2.12. 2. Réalisation du test anti-varroa

Le test anti-varroa a été réalisé selon la méthode décrite par [Damiani et al. \(2010\)](#). Différentes concentrations de propolis ont été préparées dans de l'éthanol à 70% (5%, 7,5% et 10%). Pour chaque essai, 200 μ L de chaque concentration de propolis ont été appliqués sur six acariens placés sur un morceau de papier filtre. Chaque traitement a été arrêté après contact des acariens avec la propolis pendant 30 s. Ensuite, les acariens ont été retirés du papier filtre (3x3 cm) et transférés dans une boîte de Pétri propre. Trois répétitions par concentration ont été effectuées. Des lots d'acariens traités uniquement avec de l'éthanol à 70% ont servi de témoins. L'activité des acariens a été observée après 10, 30, 60 min et chaque 1h pendant les 7h qui suivent le début de chaque traitement. La mortalité a été évaluée en poussant doucement chaque acarien avec un pinceau fin et l'absence de réponse à des stimuli consécutifs a été considérée comme une indication de la mort du varroa (Fig. 10).

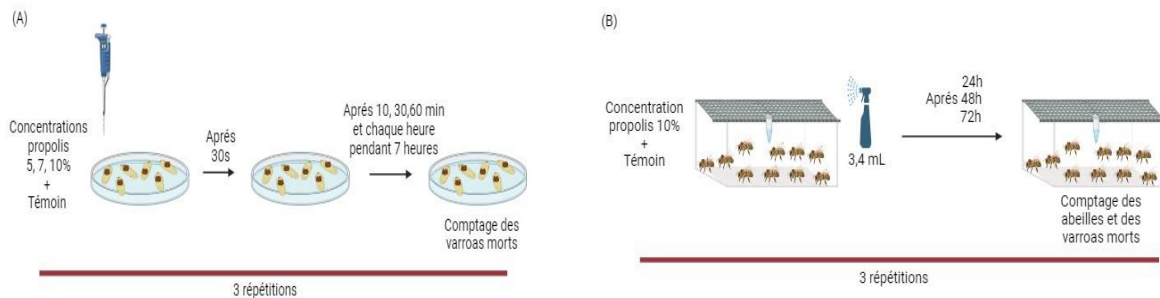


Figure 10. Evaluation de l'activité acaricide des extraits de propolis par application topique sur *Varroa destructor* (A) et par pulvérisation sur les abeilles et *V. destructor* (B).

Dans une seconde expérience, et sur la base des résultats du premier essai, la concentration des extraits de propolis qui a donné le maximum de mortalité des varroas en l'occurrence celle de 10%, a été pulvérisée sur des ouvrières adultes et sur les acariens de *V. destructor* accrochés sur ces abeilles et dont ces dernières servaient comme source de nourriture selon le protocole de [Damiani et al. \(2010\)](#) avec quelques modifications. En bref, 10 acariens femelles adultes et 10 abeilles ouvrières nouvellement émergées ont été placés dans une boîte en plastique (13 x 9 x 4 cm) dont le fond était tapissé de papier filtre. Une fois les acariens attachés au corps de l'abeille dans chaque boîte expérimentale, 3,4 ml de la concentration d'extrait de

propolis ont été pulvérisés à l'aide d'un pulvérisateur manuel. Pour les groupes témoins, 10 acariens et 10 ouvrières par boîte ont été vaporisés avec 3,4 ml d'éthanol à 40 %.

Après le traitement, les boîtes ont été placées dans un incubateur à l'obscurité et à 30°C et 70% d'humidité relative et les abeilles ont été nourries avec du sirop de sucre. La mortalité des acariens et des ouvrières a été évaluée après 1, 2 et 3 jours en sondant chaque acarien ou abeille à l'aide d'un pinceau étroit. L'absence de réponse à un stimulus consécutif pendant une minute a été considérée comme une indication de la mort. Pour chaque concentration, trois répétitions ont été effectuées.

2.13. Activité antibactérienne

2.13. 1. Souches bactériennes

L'étude a été réalisée sur des bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) et des bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25953). Toutes les souches de référence ont été obtenues auprès du laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP) de Constantine.

2.13. 2. Mesure de l'activité antibactérienne des extraits de propolis

L'activité antibactérienne des extraits de propolis a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, 2002). Les souches bactériennes ont été réactivées sur de la gélose nutritive et les cultures bactériennes obtenues ont été ajustées avec une solution saline stérile (0,9% NaCl) à opacité équivalente à 0,5 McFarland. Les suspensions bactériennes standardisées ont ensuite étéensemencées sur le milieu de Mueller-Hinton préalablement coulé dans des boîtes de pétri. Des expériences préliminaires ont été réalisées avec des extraits éthanoliques de propolis à des concentrations allant de 5% à 20% et la concentration la plus efficace (10%) a été utilisée pour l'analyse antibactérienne. Des disques de papier filtre stériles (6 mm de diamètre) imprégnés de 10 µl de l'extrait éthanolique de propolis ont été placés à la surface des boîtes précédemment ensemencées. Les contrôles négatifs et positifs ont été réalisés respectivement avec des disques de papier filtre stériles saturés d'éthanol à 70% et des disques de gentamicine commerciale (10 µg) (Bio-Rad). Toutes les boîtes de Petri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurées en millimètre. Chaque expérience a été réalisée en triplicata.

2.13. 3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits de propolis a été déterminée par la méthode de dilution en utilisant des microplaques conformément aux directives du CLSI (CLSI, Wayne, PA, USA). Des dilutions en série (10 dilutions) des extraits de propolis ont été préparées avec le milieu de bouillon MH et réparties dans une plaque de 96 puits. Une colonie de chaque souche bactérienne de référence a été prélevée à l'aide d'une anse, puis inoculée dans le bouillon MH et incubée pendant 24 heures à 37°C. La suspension a été diluée pour obtenir 10^6 ufc/mL et 50 µl de la solution ont été placés dans chaque puits. Les plaques préparées ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24h. La CMI visuelle étant relative à la concentration la plus faible de l'extrait de propolis qui inhibe la croissance bactérienne après incubation.

2.14. Analyses statistiques

Concernant l'analyse génétique, l'alignement des séquences et la génération des fichiers FASTA ont été réalisés à l'aide de Geneious Prime 2022.0.1 (<https://www.geneious.com>). La génération de réseaux d'haplotypes et le calcul des relations génétiques (diversité des haplotypes et des nucléotides, statistique de Tajima) ont été effectués conformément à [Nei \(1987\)](#) et [Nei & Tajima \(1981\)](#) dans R CORE TEAM 2022 (v. 2022.07.0) à l'aide de deux bibliothèques principales : "ape" et "pegas" ([Paradis, 2010](#); [Paradis & Schliep, 2019](#)).

Les données relatives aux teneurs des composés phénoliques et aux différentes activités biologiques ont été exprimées en moyennes \pm SEM. L'analyse de la variance à un critère de classification suivie des tests HSD (Honest Significant Difference) de Tukey et Dunnet ont été utilisés.

Les données sur la survie ont été analysées par les tests log-rank Mantel-Cox et Kaplan-Meier. Les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTATS

3.1. Identification moléculaire des abeilles

L'analyse in silico de l'ADNmt des abeilles ouvrières collectées dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines a confirmé leur appartenance à la lignée Africaine A (*A. mellifera intermissa* et *A. mellifera sahariensis*). Cette analyse a révélé l'existence de 17 haplotypes mitochondriaux à différentes fréquences appartenant à la lignée A ainsi qu'une diversité haplotypique élevée (0,908) (Fig. 11). Parmi les 17 haplotypes identifiés, 14 étaient de nouveaux haplotypes jamais enregistrés auparavant et 3 étaient des haplotypes déjà signalés dans la lignée africaine A (Tab. 1). Les nouveaux haplotypes ont été nommés selon la nomenclature proposée par [Alburaki et al. \(2022\)](#).

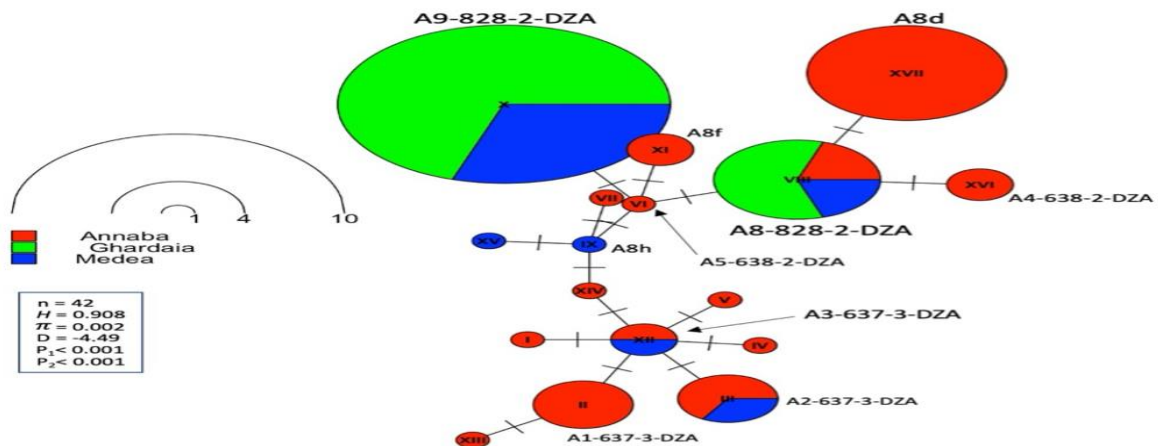


Figure 11. Réseau des haplotypes de la région COI-COII de l'ADNmt. Nombre d'échantillons (n), diversité des haplotypes (H), diversité des nucléotides (π), statistique de Tajima (D), valeurs P de Tajima sous des distributions normales (P1) et bêta (P2). La taille des cercles est relative au nombre de copies des haplotypes.

Les trois haplotypes les plus dominants étaient A9-828-2-DZA (23,81 %), suivis par A8d (14,29 %) et A8-828-2-DZA (11,90 %). D'autres haplotypes ont été enregistrés: A1-637-3-DZA et A2-637-3-DZA (7,14%); A8f, A3-637-3-DZA, A3-637-3-DZA (4,76%); A5-638-2-

DZA, A7-638-3-DZA, A14-637-3-DZA, A6-828-2-DZA, A10-827-2-DZA, A11-828-3-DZA, A12-828-3-DZA, A13-828-2-DZA (2,38%) (Tab.1).

Tableau 1. Identification des haplotypes mitochondriaux. Structure génétique COI-COII (S), lignée évolutive (L), profil de restriction de la DraI (pb) in silico, longueur de la séquence (pb), référence NCBI, sous-espèces attendues, nombre d'échantillons (n) et pourcentage global de chaque haplotype (%).

S	L	Haplotype	Profil DraI (pb)	pb	Référence NCBI	Sous espèce	n	%
P0Q	A	A8d	47/590	637	KX463819	<i>intermissa/sahariensis</i>	6	14,29
P0Q	A	A8f	47/591	638	KX463821	<i>intermissa/sahariensis</i>	2	4,76
P0Q	A	A8h	47/590	637	KX463823	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q	A	A1-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	<i>intermissa/sahariensis</i>	3	7,14
P0Q	A	A2-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	<i>intermissa/sahariensis</i>	3	7,14
P0Q	A	A3-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	<i>intermissa/sahariensis</i>	2	4,76
P0Q	A	A4-638-2-DZA	47/591	638	KX463820	<i>intermissa/sahariensis</i>	2	4,76
P0Q	A	A5-638-2-DZA	47/591	638	KX463821	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q	A	A7-638-3-DZA	47/109/482	638	MW677201	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q	A	A14-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q2	A	A6-828-2-DZA	47/781	828	KX463839	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q2	A	A8-828-2-DZA	47/781	828	KX463836	<i>intermissa/sahariensis</i>	5	11,90
P0Q2	A	A9-828-2-DZA	47/781	828	KX463836	<i>intermissa/sahariensis</i>	10	23,81
P0Q2	A	A10-827-2-DZA	47/780	827	KX463839	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q2	A	A11-828-3-DZA	47/299/482	828	KX463839	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q2	A	A12-828-3-DZA	47/299/482	828	KX463839	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
P0Q2	A	A13-828-2-DZA	47/781	828	KX463836	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2,38
Total							42	100

3.2. Teneurs en polyphénols totaux de la propolis

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de propolis ont été mesurées et exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de propolis (mg EAG/g EP) et sont illustrées dans la figure 12.

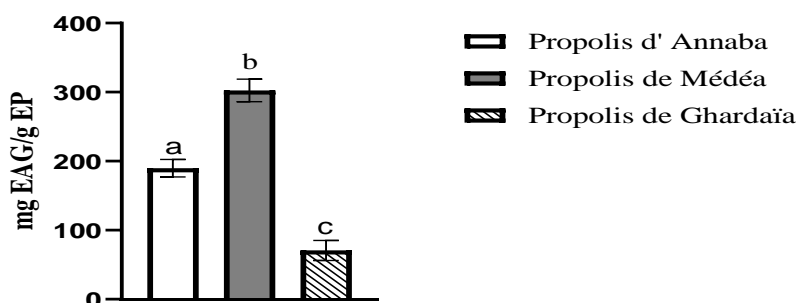


Figure 12. Teneurs en polyphénols totaux des extraits de propolis ($m \pm SEM$ de trois expériences indépendantes). Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les régions.

Les résultats montrent que la teneur en polyphénols totaux de la propolis de la région de Médéa est la plus élevée avec une valeur de 302 ± 28 mg EAG/g EP, suivie de celles d'Annaba et de Ghardaïa avec des valeurs de 189 ± 22 et 70 ± 25 mg EAG/g EP, respectivement.

3. 3. Teneurs en flavonoïdes totaux de la propolis

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques de propolis exprimées en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait de propolis (mg EQ/g EP) sont représentées dans la figure 13.

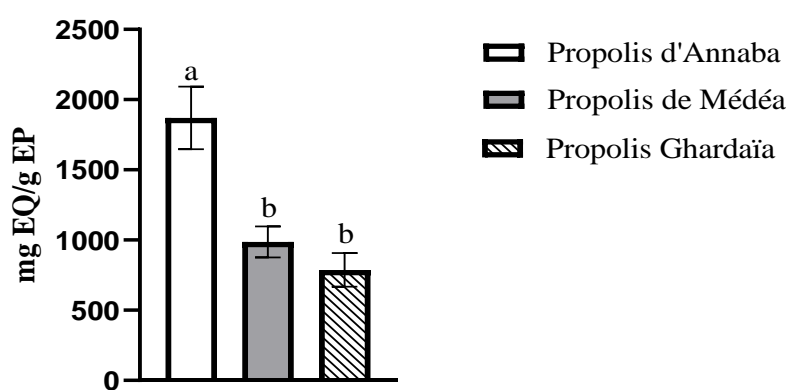


Figure 13. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de propolis ($m \pm$ SEM de trois expériences indépendantes). Les mêmes lettres indiquent l'absence de différences significatives entre les régions.

Les résultats montrent que les valeurs des extraits de propolis varient de 787 ± 207 à 1870 ± 385 mg EQ/g EP. Les extraits de propolis d'Annaba présentant des teneurs significativement plus importantes que les extraits de propolis des deux autres stations.

3.4. Caractérisation chimique des extraits de propolis

Les échantillons de propolis ont été analysés par LC-MS/MS à l'aide de 22 standards sélectionnés et en double. Les signaux d'intensité ont été enregistrés pour les 30 analytes énumérés dans le tableau 2.

Tableau 2. Détermination de la composition chimique des extraits de propolis algérienne par LC-MS/MS. Pour chaque extrait de propolis, les composés dont les signaux sont intenses sont en rouge et les moins intenses sont en vert. Le rouge le plus foncé indique les composés les plus abondants et le vert le plus foncé indique les composés les moins abondants.

Composant	[M-H] ⁺ , m/z	t _R , min	Confirmé	Propolis d'Annaba		Propolis de Ghardaia		Propolis de Médéa	
				Essai#1	Essai#2	Essai#1	Essai#2	Essai#1	Essai#2
Acide cinnamique	147,0441	9,68	Oui	3,35E+06	3,92E+06	2,94E+05	2,85E+05	2,87E+05	2,58E+05
Vanilline	151,0386	6,5	Non	4,60E+06	4,76E+06	8,89E+05	8,69E+05	1,52E+07	1,60E+07
Acide p-coumarique	163,039	7,68	Oui	8,76E+07	1,02E+08	3,72E+07	3,77E+07	4,58E+07	4,85E+07
Acide caféique	179,0339	6,89	Oui	1,46E+08	1,58E+08	5,30E+07	5,53E+07	2,54E+08	2,51E+08
Acide Ferulique	193,0495	7,92	Oui	1,82E+07	2,10E+07	2,46E+07	2,37E+07	5,58E+06	5,99E+06
Acide 3,4-diméthoxycinnamique	207,0652	8,84	Oui	1,15E+07	1,29E+07	6,14E+06	5,83E+06	4,75E+06	5,55E+06
Ethyl caféate	207,0652	9,64	Oui	9,92E+06	1,08E+07	3,23E+06	3,26E+06	1,11E+07	1,21E+07
Coumarate d'isoprényle	231,1012	12,26	Non	7,20E+07	7,90E+07	1,67E+07	1,49E+07	6,11E+07	6,04E+07
caféate d'isopentyle	249,1118	11,91	Non	2,61E+07	2,62E+07	1,35E+07	1,29E+07	3,60E+07	3,48E+07
Pinocembrine	255,0652	11,6	Non	2,72E+08	2,82E+08	1,87E+08	1,94E+08	2,25E+08	2,54E+08
Apigénine	269,0444	9,89	Oui	4,99E+07	5,17E+07	3,00E+07	3,13E+07	3,70E+07	3,85E+07
Galangine	269,0444	11,73	Oui	7,16E+07	7,83E+07	6,76E+07	6,80E+07	8,52E+07	8,28E+07
Caféate de benzyle	269,0808	11,34	Non	6,95E+07	7,50E+07	6,25E+07	6,31E+07	1,58E+07	1,62E+07
Pinostrobin	269,0808	12,76	Oui	5,24E+07	5,41E+07	nd	nd	4,19E+06	3,84E+06
Pinobanksine	271,0601	10,18	Oui	1,64E+08	1,69E+08	1,53E+08	1,55E+08	1,39E+08	1,42E+08
Ester caféate de Phenylethyle	283,0965	11,69	Oui	7,78E+07	7,68E+07	3,77E+07	3,78E+07	1,61E+07	1,72E+07
Kaempférol	285,0394	10,12	Oui	2,19E+07	2,22E+07	1,62E+07	1,85E+07	1,61E+07	1,73E+07
Sakuranétine	285,0757	11,51	Oui	1,89E+07	1,99E+07	3,15E+06	3,13E+06	1,98E+07	2,07E+07
Isosakuranétine	285,0757	11,58	Oui						
Chrysin	253,0495	11,47	Oui	1,90E+08	1,93E+08	1,32E+08	1,35E+08	1,25E+08	1,25E+08
Caféate de cinnamyle	295,0965	12,18	Oui	1,01E+08	1,03E+08	4,02E+07	4,03E+07	2,91E+07	2,98E+07
Isokaempféride	299,055	10,27	Oui	3,02E+07	3,23E+07	1,84E+07	2,01E+07	1,99E+07	2,06E+07
Kaempféride	299,055	11,74	Oui	5,03E+06	4,90E+06	3,40E+06	3,58E+06	7,92E+06	8,14E+06
Rhamnocitrine	299,055	11,74	Oui						
Quercétine	301,0343	9,38	Oui	2,10E+07	2,17E+07	1,01E+07	1,10E+07	1,22E+07	1,33E+07
Hesperétine	301,0707	10,13	Non	1,86E+06	2,03E+06	5,29E+05	5,09E+05	8,25E+06	8,98E+06
Pinobanksine-3-O acetate	313,0707	11,72	Non	1,99E+08	1,95E+08	1,28E+08	1,34E+08	1,73E+08	1,70E+08
Isorhamnétine	315,0499	10,13	Oui	1,60E+07	1,77E+07	6,05E+06	6,98E+06	1,61E+07	1,60E+07
Rhamnétine	315,0499	10,82	Oui	1,75E+07	1,80E+07	1,23E+07	1,29E+07	1,15E+07	1,05E+07
Pinobanksine-3-propionate	327,0863	12,41	Non	4,56E+07	4,61E+07	1,50E+07	1,63E+07	8,10E+06	6,91E+06

L'identité de 20 de ces composés a été confirmée en comparant les valeurs m/z et le temps de rétention avec ceux des étalons analytiques, tandis que des formules empiriques ont été prédites pour les huit autres composés sur la base des mesures de leurs masses exactes. Les données sont décrites comme semi-quantitatives dans le sens où nous n'avons pas (a) établi de courbes d'étalonnage externes, (b) mis en œuvre des étalons internes ou (c) évaluer la linéarité de la réponse pour aucun des composés. En effet, l'objectif de ces analyses n'était pas de fournir une liste exhaustive des composés et de leurs quantités exactes, mais plutôt d'analyser certains composés communément trouvés dans la propolis afin de mettre en évidence certaines différences entre les trois sources de propolis. Les résultats ont révélé que la pinocembrine et le pinobanksine-3-acétate étaient parmi les composés les plus abondants identifiés dans chaque extrait, tandis que l'acide cinnamique était le moins abondant parmi les molécules identifiées dans chaque extrait. Les différences notables entre les extraits comprennent la teneur relativement plus élevée en acide férulique dans l'extrait de Ghardaïa comparativement aux deux autres extraits. De même, la pinostrobine était relativement abondante dans l'extrait d'Annaba mais était l'un des composés les moins abondants identifiés dans l'extrait de Médéa et n'a pas été détectée dans l'extrait de propolis de Ghardaïa.

3.5. Activité antiradicalaire de la propolis

Tous les échantillons de propolis ont montré une activité de piégeage des radicaux libres. L'activité la plus élevée a été observée dans la propolis de Médéa avec une valeur de CI_{50} de 13,50 $\mu\text{g/mL}$, qui est comparable à celle du témoin acide ascorbique avec une valeur de CI_{50} de 9,05 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 3). La propolis d'Annaba a été moins active, tandis que l'activité de piégeage de la propolis de Ghardaïa était trop faible pour pouvoir établir une valeur de CI_{50} .

Tableau 3. Activité antiradicalaire des extraits de propolis mesurée par piégeage des radicaux libres.

Echantillons	CI₅₀ (µg/mL)	
Propolis d'Annaba	Moyenne IC	39,30 28,30 à 52,20
Propolis de Médéa	Moyenne IC	13,50 8,10 à 20,80
Propolis de Ghardaïa	Moyenne IC	> 100
Acide ascorbique	Moyenne IC	9,05 6,06 à 12,86
Ethanol	Moyenne IC	AI

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

IC = intervalle de confiance à 95 %.

AI : Absence d'inhibition.

3.6. Activité antioxydante de la propolis

L'activité antioxydante des extraits de propolis a été évaluée en utilisant la méthode d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique. Les résultats ont montré que tous les extraits de propolis ont une activité antioxydante avec des valeurs de CI₅₀ comprises entre 2,90 et 4,90 µg/mL (Fig. 14; Tab. 4) où la propolis d'Annaba a présenté une activité antioxydante plus importante que celle des deux autres régions.

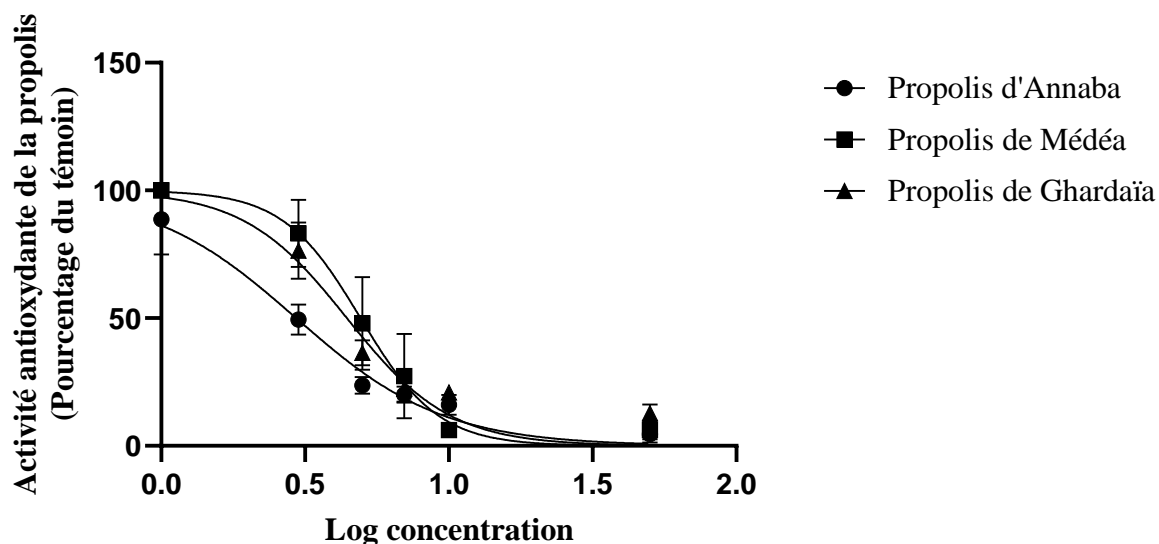


Figure 14. Activité antioxydante des échantillons de propolis.

Tableau 4. Valeurs des CI_{50} de l'activité antioxydante des extraits de propolis.

Echantillons	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
Propolis d'Annaba	Moyenne IC	2,90 2,60 à 3,30
Propolis de Médéa	Moyenne IC	4,90 4,30 à 5,50
Propolis de Ghardaïa	Moyenne IC	4,42 3,90 à 5,00

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

IC = intervalle de confiance à 95 %.

3.7. Analyse de la mort cellulaire apoptotique

Pour évaluer l'effet de la propolis sur la mort cellulaire, les cellules Jurkat et Reh ont été incubées 72h avec différentes concentrations d'extraits de propolis. Les résultats de la cytométrie en flux ont montré une réduction dose-dépendante du nombre de cellules de leucémie lymphocytaire Jurkat (Fig.15) et Reh (Fig.16) lorsqu'elles sont exposées aux extraits de propolis.

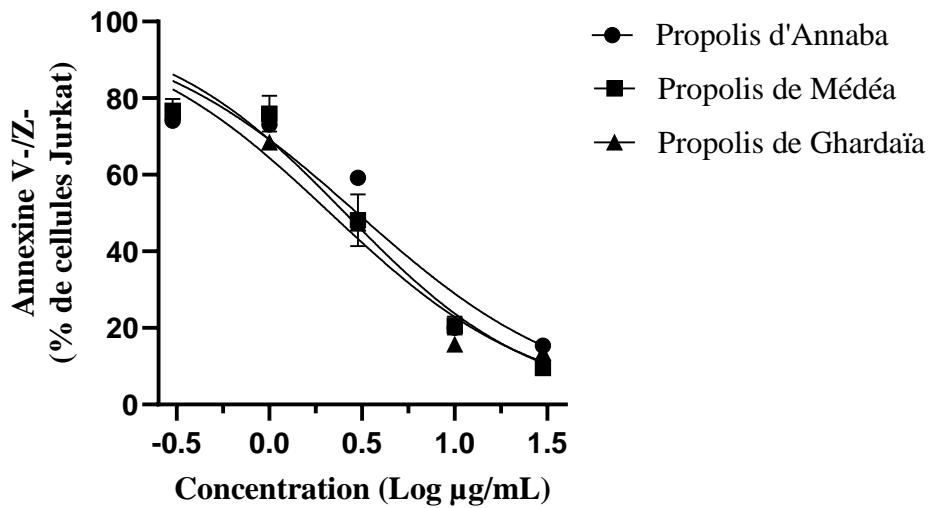


Figure 15. Pourcentages moyens de cellules Jurkat vivantes après traitement avec différentes concentrations de propolis pendant 3 jours. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en double.

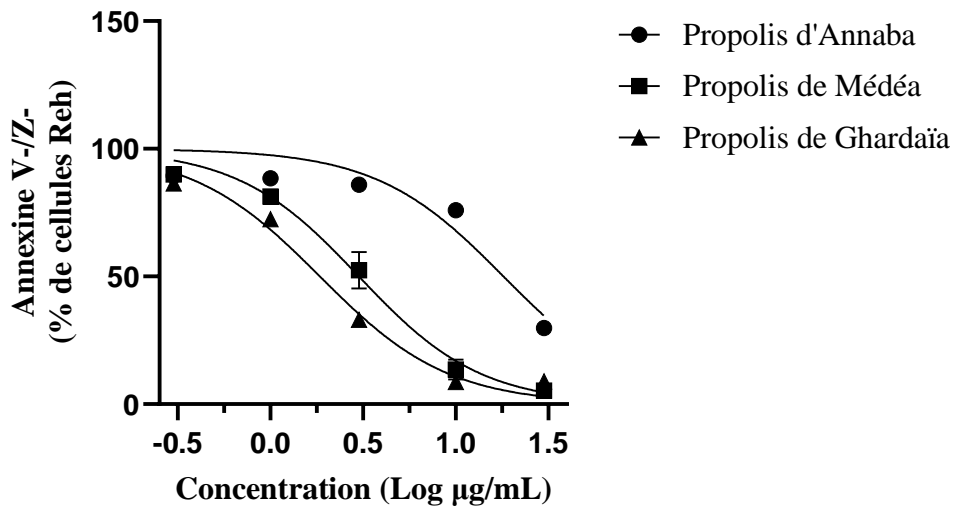


Figure 16. Pourcentages moyens de cellules Reh vivantes après traitement avec différentes concentrations de propolis pendant 3 jours. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes; chaque expérience a été réalisée en double.

Les tableaux 5 et 6 montrent la distribution des résultats de la cytométrie en flux Annexine V-Zombie aqua. Les extraits de propolis ont diminué la proportion de cellules

doublement négatives (Annexine V-/Zombie-) de manière dose-dépendante qui est accompagnée d'une augmentation des cellules apoptotiques précoces (Annexine V+/Zombie-) et tardives (Annexine V+/Zombie+), avec une faible accumulation non significative de cellules Annexine V-/Zombie+ qui sont généralement indicatives d'une nécrose.

Tableau 5. Pourcentages moyens de cellules Jurkat vivantes et apoptotiques après traitement avec des extraits de propolis. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes; chaque expérience a été réalisée en double. *Valeurs significativement différentes ($p < 0,01$) comparativement au témoin comme déterminé par ANOVA à un facteur avec le test post hoc de Dunnett.

Jurkat	Témoin (DMSO)	(0,3 $\mu\text{g/mL}$)	(1 $\mu\text{g/mL}$)	(3 $\mu\text{g/mL}$)	(10 $\mu\text{g/mL}$)	(30 $\mu\text{g/mL}$)	
Propolis d'Annaba	A ⁻ Z ⁻	79,5 \pm 6,1	74,1 \pm 6,5	73,0 \pm 7,4	59,2 \pm 10,1*	20,0 \pm 4,2*	15,3 \pm 3,8*
	A ⁺ Z ⁻	6,7 \pm 2,5	7,0 \pm 0,9	8,3 \pm 2,4	13,4 \pm 3,4	34,9 \pm 3,6*	35,5 \pm 8,4*
	A ⁺ Z ⁺	11,7 \pm 4,6	16,4 \pm 5,0	16,3 \pm 5,9	25,4 \pm 6,0	42,7 \pm 1,9*	47,6 \pm 11,6*
	A ⁻ Z ⁺	2,0 \pm 1,4	2,4 \pm 1,4	2,2 \pm 1,1	1,8 \pm 0,6	2,2 \pm 0,8	1,5 \pm 0,8
Propolis de Médéa	A ⁻ Z ⁻	79,5 \pm 6,1	76,7 \pm 5,3	75,9 \pm 8,1	48,1 \pm 11,6*	20,6 \pm 4,0*	9,5 \pm 2,7*
	A ⁺ Z ⁻	6,7 \pm 2,5	6,8 \pm 1,3	7,4 \pm 0,9	17,4 \pm 0,1*	25,7 \pm 4,9*	28,0 \pm 4,9*
	A ⁺ Z ⁺	11,7 \pm 4,6	14,2 \pm 3,7	15,1 \pm 6,7	32,6 \pm 10,7*	51,0 \pm 5,0*	60,0 \pm 7,8*
	A ⁻ Z ⁺	2,0 \pm 1,4	2,1 \pm 1,2	1,5 \pm 0,7	1,8 \pm 1,1	2,5 \pm 1,0	2,3 \pm 0,2
Propolis de Ghardaïa	A ⁻ Z ⁻	79,5 \pm 6,1	76,3 \pm 5,3	68,4 \pm 6,0	47,2 \pm 2,8*	15,6 \pm 3,1*	13,5 \pm 5,4*
	A ⁺ Z ⁻	6,7 \pm 2,5	7,3 \pm 1,4	8,0 \pm 2,1	15,4 \pm 2,4	26,4 \pm 2,8*	25,7 \pm 4,5*
	A ⁺ Z ⁺	11,7 \pm 4,6	15,0 \pm 5,1	21,7 \pm 3,3	34,9 \pm 0,1*	54,8 \pm 3,7*	57,0 \pm 2,0*
	A ⁻ Z ⁺	2,0 \pm 1,4	1,3 \pm 0,7	1,7 \pm 1,0	2,3 \pm 0,5	2,9 \pm 0,7	3,6 \pm 1,2

Tableau 6. Pourcentages moyens de cellules Reh vivantes et apoptotiques après traitement avec des extraits de propolis. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes; chaque expérience a été réalisée en double. *Valeurs significativement différentes ($p < 0,01$) comparativement au témoin comme déterminé par ANOVA à un facteur avec test post hoc de Dunnett.

Reh	Témoin (DMSO)	(0,3 $\mu\text{g/mL}$)	(1 $\mu\text{g/mL}$)	(3 $\mu\text{g/mL}$)	(10 $\mu\text{g/mL}$)	(30 $\mu\text{g/mL}$)	
Propolis d'Annaba	A ⁻ Z ⁻	89,5 \pm 1,0	89,4 \pm 0,4	88,4 \pm 1,1	85,9 \pm 1,6	75,9 \pm 3,5*	29,8 \pm 6,5*
	A ⁺ Z ⁻	2,1 \pm 0,6	2,9 \pm 0,3	3,4 \pm 0,5	4,3 \pm 0,8	9,6 \pm 3,3	25,6 \pm 9,7*
	A ⁺ Z ⁺	7,7 \pm 1,1	6,9 \pm 0,6	7,4 \pm 0,7	9,0 \pm 1,0	13,6 \pm 2,7	42,6 \pm 8,4*
	A ⁻ Z ⁺	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	1,8 \pm 0,6
Propolis de Médéa	A ⁻ Z ⁻	89,5 \pm 1,0	89,9 \pm 0,7	81,3 \pm 4,4	52,4 \pm 12,4*	13,5 \pm 6,8*	5,3 \pm 0,6*
	A ⁺ Z ⁻	2,1 \pm 0,6	2,3 \pm 0,3	4,1 \pm 0,5	11,3 \pm 6,3	33,5 \pm 9,3*	23,4 \pm 7,7*
	A ⁺ Z ⁺	7,7 \pm 1,1	7,0 \pm 0,8	13,3 \pm 3,8	33,0 \pm 6,9*	47,5 \pm 11,0*	66,2 \pm 6,7*
	A ⁻ Z ⁺	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	1,0 \pm 0,8	2,9 \pm 1,3	5,2 \pm 1,4	4,8 \pm 1,5
Propolis de Ghardaïa	A ⁻ Z ⁻	89,5 \pm 1,0	86,4 \pm 0,4	72,3 \pm 4,9*	33,0 \pm 11,7*	8,7 \pm 4,1*	8,9 \pm 4,2*
	A ⁺ Z ⁻	2,1 \pm 0,6	3,9 \pm 1,1	7,3 \pm 6,9	36,4 \pm 12,0*	35,4 \pm 13,8*	35,5 \pm 18,7*
	A ⁺ Z ⁺	7,7 \pm 1,1	9,0 \pm 0,8	14,4 \pm 2,1	27,8 \pm 4,0*	49,6 \pm 16,2*	51,2 \pm 21,1*
	A ⁻ Z ⁺	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,06	5,8 \pm 8,3	2,5 \pm 0,3	6,1 \pm 1,2	4,2 \pm 2,3

Les valeurs des CI_{50} calculées pour la réduction du nombre de cellules non apoptotiques étaient similaires pour les trois préparations de propolis et pour les deux lignées cellulaires, à l'exception de la préparation de la propolis d'Annaba qui était significativement moins puissante lorsqu'elle était incubée avec des cellules Reh (Tab.7).

Tableau 7. Valeurs des CI_{50} pour l'apoptose des cellules Jurkat et Reh après traitement avec des extraits de propolis.

Echantillons	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
		Cellules de Jurkat	Cellules de Reh
Propolis d'Annaba	Moyenne	2,96	18,10
	IC	1,96 à 4,38	13,94 à 24,60
Propolis de Médéa	Moyenne	2,54	2,22
	IC	1,85 à 3,46	1,80 à 2,72
Propolis de Ghardaïa	Moyenne	2,112	1,85
	IC	1,63 à 2,73	1,50 à 2,26

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes, IC = intervalle de confiance à 95 %.

Après avoir déterminé l'induction de l'apoptose dans les lignées cellulaires Jurkat et Reh, l'impact de ces extraits sur l'induction de l'apoptose a été mesuré dans les lymphocytes du sang périphérique comme modèle de cellules normales et non transformées. Ces dernières cellules ont été incubées avec des concentrations d'extraits de propolis proches de la CI_{50} (3 $\mu\text{g/mL}$) et environ 3x CI_{50} (10 $\mu\text{g/mL}$) mesurées dans les lignées cellulaires cancéreuses (Fig. 17 et Tab. 8). Les résultats montrent que le traitement avec la propolis Médéa à 10 $\mu\text{g/mL}$ réduit le nombre de cellules doublement négatives avec une augmentation du nombre de cellules apoptotiques précoces (Annexine V+/Zombie-). Les autres conditions de traitement n'ont pas induit de changements significatifs par rapport aux témoins, bien qu'il y ait une tendance à l'augmentation des cellules apoptotiques précoces.

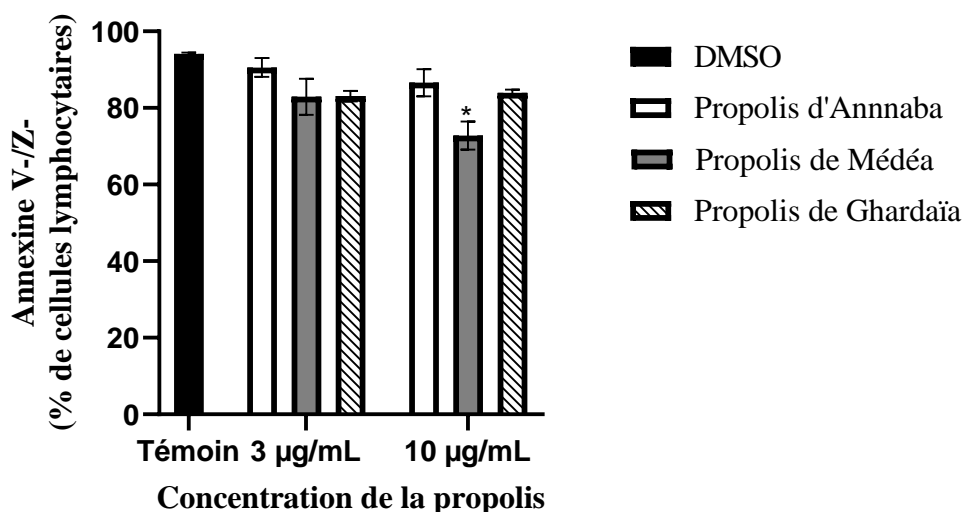


Figure 17. Pourcentages moyens des lymphocytes vivants et apoptotiques après 3 jours de traitement avec des extraits de propolis. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes; chaque expérience a été réalisée en double.

Tableau 8. Pourcentages moyens des lymphocytes vivants et apoptotiques après traitement avec des extraits de propolis. Les cellules ont été cultivées dans RPMI-1640 avec 10% de FBS pendant 72h en présence des concentrations de propolis indiquées. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes; chaque expérience a été réalisée en double.

*Les valeurs sont significativement différentes ($p < 0,01$) du témoin, comme déterminé par ANOVA à un facteur avec test post hoc de Dunnett.

	Témoin (DMSO)	Propolis d'Annaba (3 µg/mL)	Propolis de Médéa (3 µg/mL)	Propolis de Ghardaïa (3 µg/mL)	Propolis d'Annaba (10 µg/mL)	Propolis de Médéa (10 µg/mL)	Propolis de Ghardaïa (10 µg/mL)
Total	59,6 \pm 14,7	56,0 \pm 8,7	45,3 \pm 8,3	33,2 \pm 3,8*	50,3 \pm 10,0	31,2 \pm 3,8*	33,5 \pm 4,8*
A⁻Z⁻	94,0 \pm 0,5	90,5 \pm 4,2	82,9 \pm 8,1	83,1 \pm 2,3	86,6 \pm 6,1	72,7 \pm 6,3*	83,9 \pm 1,3
A⁺Z⁻	5,5 \pm 0,6	8,8 \pm 3,8	16,5 \pm 7,9	16,2 \pm 1,9	12,7 \pm 6,1	26,5 \pm 6,1*	15,5 \pm 1,2
A⁺Z⁺	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,4	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,4	0,3 \pm 0,2
A⁻Z⁺	0,1 \pm 0,06	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,03	0,1 \pm 0,07	0,05 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,05

3.8. Viabilité cellulaire

Après avoir déterminé les concentrations pour lesquelles les échantillons de propolis induisaient la mort apoptotique, les effets antiprolifératifs des extraits de propolis sur les cellules Jurkat et Reh ont été évalués à l'aide du test Cell Titer Blue. Un test dose-réponse a été réalisé en utilisant des concentrations de 0,3; 1; 3; 10 et 30 $\mu\text{g/mL}$ et les valeurs des CI_{50} calculées sont indiquées dans le tableau 9.

Tableau 9. Valeurs des CI_{50} pour la viabilité des cellules Jurkat et Reh après incubation avec des extraits de propolis.

Echantillons	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
		Cellules de Jurkat	Cellules de Reh
Propolis d'Annaba	Moyenne	2,0	28,2
	IC	1,3 à 8,4	18,5 à 61,9
Propolis de Médéa	Moyenne	2,4	2,2
	IC	1,1 à 20,2	1,8 à 2,7
Propolis de Ghardaïa	Moyenne	1,1	0,5
	IC	0,7 à 1,6	0,4 à 0,6

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

IC = intervalle de confiance à 95 %.

Tous les extraits ont montré une activité antiproliférative similaire, à une exception près où les cellules Reh étaient significativement moins sensibles à la propolis d'Annaba avec une CI_{50} de 28,2 $\mu\text{g/mL}$.

3.9. Biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293

Des cellules HEK293 exprimant de manière ectopique la 5-LO humaine et la FLAP ont été utilisées pour évaluer l'effet des extraits de propolis sur la biosynthèse des produits de la 5-LO. Les cellules ont été incubées avec les extraits de propolis à différentes concentrations et les CI_{50} ont été déterminées (Fig. 18, Tab. 10). Comme le montre la figure 18, tous les extraits de propolis ont induit une diminution concentration-dépendante de la biosynthèse des produits 5-LO par rapport aux témoins incubés avec le solvant (DMSO). Les extraits de propolis d'Annaba et de

Médéa ont montré une inhibition similaire de la biosynthèse du produit 5-LO avec des valeurs de la CI_{50} de 0,57 $\mu\text{g/mL}$ et 0,81 $\mu\text{g/mL}$, respectivement, tandis que la propolis de Ghardaïa a montré une activité inhibitrice significativement plus faible ($CI_{50} = 3,18 \mu\text{g/mL}$).

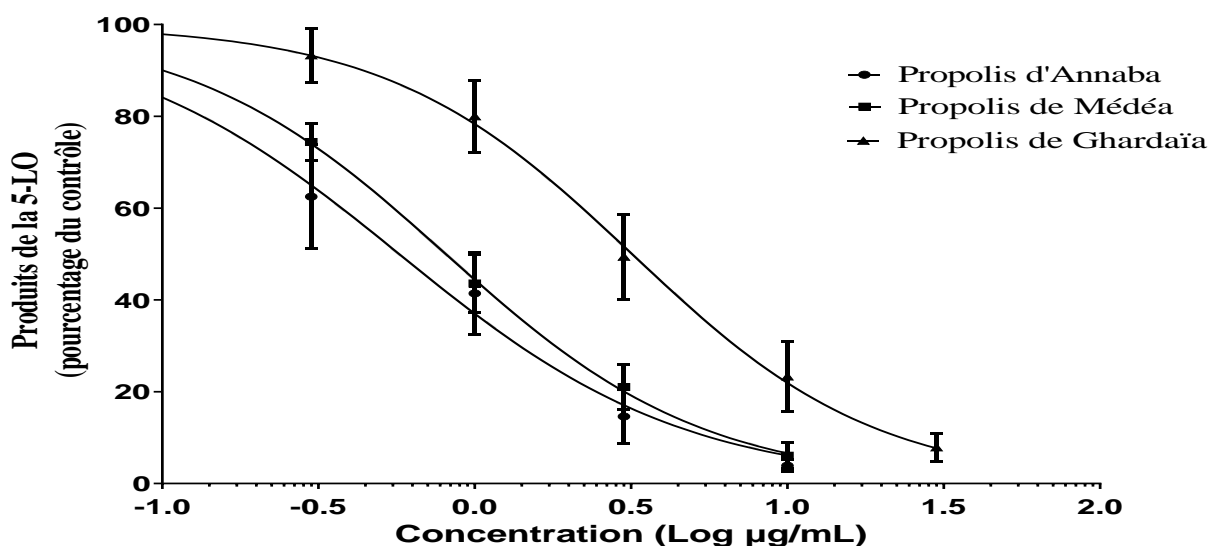


Figure 18. Inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293 par différentes concentrations de propolis. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en double.

Tableau 10. Valeurs des CI_{50} pour l'inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO par des extraits de propolis.

Echantillons	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Propolis d'Annaba	Moyenne IC
Propolis de Médéa	Moyenne IC	0,81 0,65 à 1,00
Propolis de Ghardaïa	Moyenne IC	3,18 2,35 à 4,31

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.
IC = intervalle de confiance à 95 %.

3.10. Analyse de l'activité antibactérienne de la propolis

3.10.1. Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes

Dans la présente étude, l'activité antibactérienne des extraits de propolis algérienne a été évaluée à l'encontre des bactéries à Gram positif de référence *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et des bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Tab. 11).

Tableau 11. Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de propolis sur des bactéries de référence. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les groupes; $p < 0,05$ comme déterminé par ANOVA à un facteur avec le test Tukey.

Souche bactérienne	Zone d'inhibition (mm)			
	Gentamicine	Propolis d'Annaba	Propolis de Médéa	Propolis de Ghardaïa
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,0 \pm 0,0 ^a	12,3 \pm 2,5 ^b	20,0 \pm 3,4 ^a	18,3 \pm 1,1 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i>	20,0 \pm 0,0 ^a	18,3 \pm 1,5 ^a	22,3 \pm 3,2 ^a	21,6 \pm 4,0 ^a
<i>Escherichia coli</i>	20,0 \pm 0,0 ^a	10,3 \pm 0,5 ^b	11,0 \pm 3,0 ^b	11,3 \pm 1,1 ^b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,0 \pm 0,0 ^{ab}	9,6 \pm 2,3 ^{ab}	12,0 \pm 1,0 ^a	7,6 \pm 1,1 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,0 \pm 0,0 ^a	9,6 \pm 3,0 ^b	10,0 \pm 1,7 ^b	8,3 \pm 1,1 ^b

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits de propolis varient de 12,3 à 22,3 mm pour les bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *E. faecalis*) et de 7,6 à 12 mm pour les bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*).

3.10.2. Concentration minimale inhibitrice de la propolis

Les données relatives à la CMI des extraits de propolis à l'encontre des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif testées sont illustrées dans le tableau 12.

Tableau 12. Concentration minimale inhibitrice des extraits de propolis ($\mu\text{g/mL}$) pour chaque souche bactérienne testée.

Souche bactérienne	Propolis ($\mu\text{g/mL}$)		
	Propolis d'Annaba	Propolis de Médéa	Propolis de Ghardaïa
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,62	15,62	15,62
<i>Enterococcus faecalis</i>	125	62,5	62,5
<i>Escherichia coli</i>	31,25	31,25	31,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,62	7,81	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62,5	62,5	62,5

Une inhibition de la croissance de toutes les souches testées après traitement aux extraits de propolis a été observée. Les valeurs des CMI varient entre 15,62- 125 $\mu\text{g/mL}$ et 15,62- 62,5 $\mu\text{g/mL}$ pour la propolis d'Annaba et de Ghardaïa respectivement et de 7,81-62,5 $\mu\text{g/mL}$ pour la propolis de Médéa.

3.11. Effet acaricide de la propolis

L'effet acaricide des extraits de propolis a été évalué, dans une première étape expérimentale, sur la base de la mortalité des acariens après exposition de *V. destructor* à différentes concentrations (5%, 7,5% et 10%) des extraits de propolis des trois stations sélectionnées. Les résultats montrent que les acariens sont sensibles aux extraits de propolis conduisant à leur mortalité (Fig. 19).

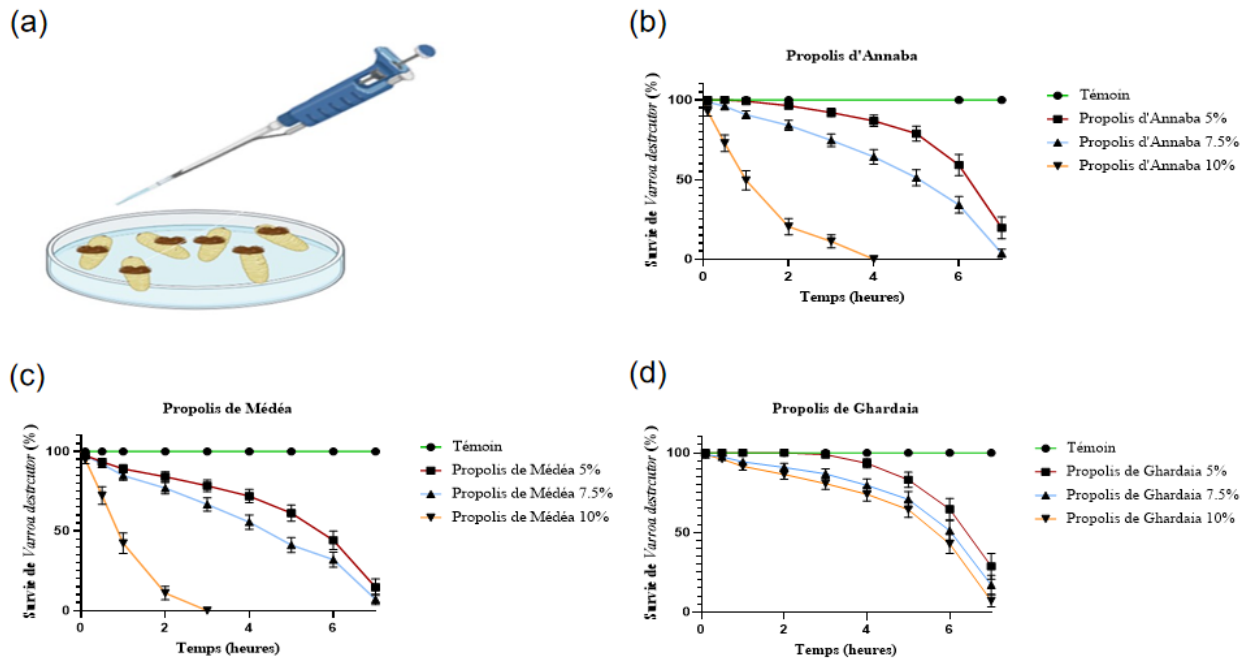
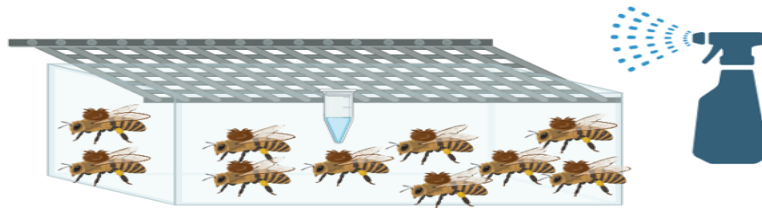


Figure 19. Evaluation de l'activité acaricide des extraits de propolis sur *Varroa destructor* par application topique. (a) Boîte de Pétri où les *V. destructor* ont été traités par application topique. Taux de survie des acariens *V. destructor* après traitement avec les trois différents extraits de propolis algérienne de (b) Annaba, (c) Médéa, et (d) Ghardaïa à trois concentrations de 5%, 7.5% et 10%. Les courbes de survie des acariens ont été analysées selon la méthode Kaplan-Meier et comparées entre elles par le test log-rank de Mantel-Cox. 6 acariens ont été utilisés par unité expérimentale (n=6), et l'expérience a été réalisée en triplicata.

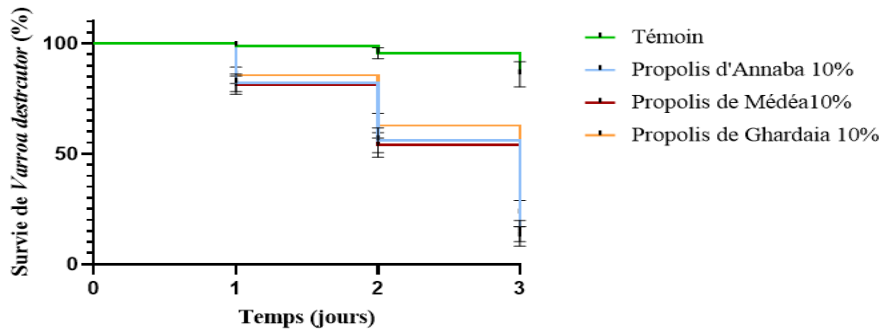
Le pourcentage d'acariens tués après traitement varie entre 71% et 100% pour les trois concentrations et les trois échantillons de propolis. Les courbes de survie ont montré une diminution significative des acariens après exposition à la propolis d'Annaba (test de log-rank : $\chi^2 = 251,8$; $p < 0,0001$), de Médéa ($\chi^2 = 317$; $p < 0,0001$) et de Ghardaïa ($\chi^2 = 39,72$; $p < 0,0001$). La mortalité des acariens est plus importante en relation avec l'augmentation de la concentration. Les propolis de Médéa et d'Annaba ont montré une forte activité acaricide avec une mortalité de 100% des acariens après seulement 3-4h. En revanche, la propolis de Ghardaïa a provoqué une mortalité de 92% des acariens après 7 heures.

Dans la seconde étape expérimentale, la concentration des extraits de propolis qui a donné le plus d'effet sur la mortalité de *V. destructor*; en l'occurrence celle de 10% a été pulvérisée en même temps sur les acariens et sur les ouvrières porteuses de ces acariens et les résultats relatifs à la survie de *V. destructor* et des abeilles sont représentés dans la figure 20.

(a)



(b)



(c)

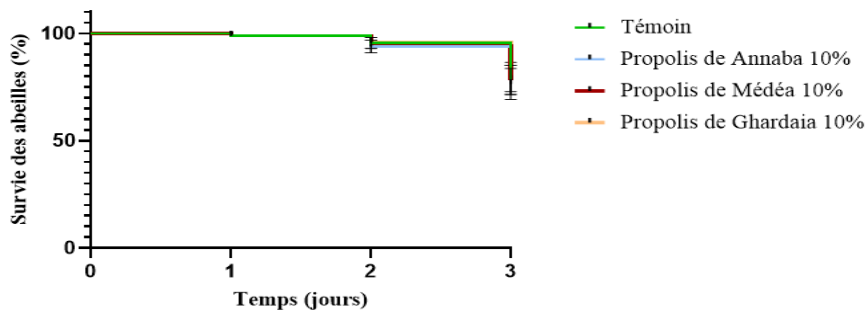


Figure 20. Evaluation de l'effet des extraits de propolis sur la survie de *Varroa destructor* et des abeilles par la méthode de pulvérisation. (a) Installation d'une mini-ruche dans laquelle des abeilles infectées par le varroa ont été traitées par pulvérisation. Le tube Eppendorf fournit du sirop de sucre aux ouvrières. Taux de survie (b) de *V. destructor* et (c) ouvrières après traitement avec trois extraits différents de propolis à une concentration de 10% par la méthode de pulvérisation. Les données ont été analysées selon la méthode Kaplan-Meier et comparées entre elles par le test log-rank de Mantel-Cox. 10 acariens et 10 abeilles par unité expérimentale (n = 10) ont été utilisés et l'expérience a été réalisée en triplicata.

La pulvérisation d'une concentration de 10% d'extraits de propolis provenant des trois sites a pu tuer les acariens de manière significative (test de Log-rank $\chi^2 = 65,65$; $p < 0,0001$). Les extraits de propolis d'Annaba, de Médéa et de Ghardaïa ont provoqué respectivement une mortalité de 85%, 87% et 77% des acariens 3 jours après la pulvérisation (Figure 20 a; b).

D'autre part, les courbes de survie des abeilles ouvrières sur lesquelles les acariens se nourrissaient après la pulvérisation des extraits de propolis à 10% (Fig. 20c), ont montré qu'il n'y avait pas une atteinte de la survie des ouvrières (test de log-rank: $\chi^2 = 0,1002$; $p > 0,05$), confirmant que les trois extraits de propolis à la concentration 10% sont inoffensifs pour les abeilles.

4. DISCUSSION

La composition chimique de la propolis provenant de différentes régions géographiques présente une grande variabilité en relation avec la flore, la situation géographique (Laaroussi *et al.*, 2021), les saisons de collecte et les races d'abeilles (Nedji & Loucif-Ayad, 2014; El Menyiy *et al.*, 2021). Cette diversité chimique se traduit par des activités biologiques différentes. Dans ce contexte, la présente étude a évalué les populations d'abeilles, la composition chimique et les activités biologiques de la propolis collectée dans des stations de fécondation contrôlée des abeilles dans trois zones géographiques de l'Algérie. La propolis d'Annaba provient du nord méditerranéen de l'Algérie, celle de Médéa d'un climat plus transitionnel des collines du nord et celle de Ghardaïa au niveau du sud du pays.

L'analyse génétique des populations d'abeilles mellifères collectées dans les trois stations a révélé la présence d'une seule lignée, la lignée africaine A. Cette lignée est répartie sur l'ensemble du continent africain et, est très diversifiée (Chahbar *et al.*, 2013; Achou *et al.*, 2015; Loucif-Ayad *et al.*, 2015). L'analyse génétique actuelle a confirmé l'absence d'introgression de l'ADNmt par des lignées étrangères au niveau des stations sélectionnées, et que toutes les abeilles ouvrières qui ont récolté la propolis analysée dans cette étude représentent les sous-espèces autochtones d'Algérie *A.mellifera intermissa* et *A.mellifera sahariensis*. Trois des dix-sept haplotypes (A8d, A8f, A8h) ont été précédemment identifiés dans les populations d'abeilles algériennes (Chahbar *et al.*, 2013; Achou *et al.*, 2015). Cependant, un nombre remarquable de nouveaux haplotypes a été enregistré pour la première fois qui, selon l'analyse du réseau d'haplotypes, ces haplotypes diffèrent clairement des haplotypes précédemment connus.

La caractérisation de la propolis algérienne collectée dans les trois stations a été réalisée en mesurant les teneurs en composés phénoliques. Pour les teneurs en polyphénols totaux, les résultats obtenus dans cette étude sont similaires à ceux rapportés pour la propolis chinoise qui varient de 89 à 202 mg EAG/g EP ainsi que ceux obtenus pour la propolis brésilienne (278 à 398 mg EAG/g EP) (Reis *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2021). Cependant, les valeurs des teneurs en flavonoïdes totaux étaient plus élevées que celles rapportées pour les différents échantillons de propolis chinoise, variant de 166 à 520 mg EQ/g EP (Ding *et al.*, 2021). Ces teneurs dépendent également de la méthode d'extraction et du type du solvant utilisé (Sun *et al.*, 2015; Narimane *et al.*, 2017; Kocot *et al.*, 2018). Dans la présente étude, la méthode d'extraction aux ultrasons a été

choisie du fait que cette méthode permet l'extraction d'un maximum de molécules bioactives et que l'éthanol à 70 % constitue le meilleur solvant pour l'extraction de la propolis (Devequin-Nunes *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2018) générant des extraits avec une activité biologique élevée (Sawaya *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2017).

Les analyses chimiques par LC-MS/MS ont révélé que les composés détectés dans les différents échantillons de propolis algérienne sont communément trouvés dans différents types de propolis provenant de diverses régions du monde. Les propolis asiatiques, africaines et européennes contiennent principalement des phénols, des alcaloïdes et des flavonoïdes, notamment la galangine, la pinocembrine, l'apigénine, la pinobanksine, la chrysin, le caféate de cinnamyle, l'acide caféique et l'acide p-coumarique (De Groot, 2013; Huang *et al.*, 2014), qui figurent également parmi les composés les plus abondants identifiés dans la présente étude. Bien que l'analyse LC-MS/MS de ces extraits ait été semi-quantitative et que la caractérisation moléculaire des trois extraits ait révélé de nombreuses similitudes, quelques différences claires ont été constatées: la pinostrobine était beaucoup plus présente dans l'extrait d'Annaba tandis que l'acide férulique était relativement plus abondant dans l'extrait de Ghardaïa comparativement aux deux autres extraits. Les différences dans l'abondance relative des composés identifiés dans les extraits de propolis sont probablement basées sur les différences dans la flore trouvée dans chacune des stations sélectionnées géographiquement distinctes. Il convient de noter que la pinostrobine n'a pas été détectée dans la propolis de la région de Ghardaïa. Bien que plusieurs plantes soient connues pour contenir de la pinostrobine (Patel *et al.*, 2016), cela suggère que les plantes à fleurs riches en cette substance phytochimique n'étaient pas abondantes à proximité des ruches dans cette région. Par ailleurs, il n'est pas exclu que la sous-espèce d'abeilles identifiée dans les ruches de Ghardaïa *A. mellifera sahariensis*, ne récolte pas le pollen des plantes qui contiennent de la pinostrobine. Il est également probable que dans notre étude, les polyphénols et les flavonoïdes sont considérés comme les principaux composants phytochimiques efficaces responsables de plusieurs activités biologiques attribuées à la propolis.

Pour l'instant, il n'est pas possible d'identifier avec certitude quel aspect des signatures moléculaires des différents extraits pourrait être responsable des variations dans les activités biologiques des trois extraits, mais certaines différences claires dans l'activité biologique ont été détectées. La propolis de Médéa avait la plus forte activité de piégeage des radicaux libres, qui

pourrait être liée à sa teneur phénolique plus élevée (Kocot, 2018; Ding *et al.*, 2021). A l'inverse, l'extrait de propolis de Ghardaïa a montré une très faible activité antiradicalaire ce qui est cohérent avec sa plus faible teneur en composés phénoliques. L'activité antiradicalaire des extraits d'Annaba et de Médéa dans cette étude était similaire à celle rapportée pour les propolis grecque, marocaine, turque et brésilienne qui ont montré des valeurs de CI_{50} allant de 8 à 100 $\mu\text{g/mL}$ en utilisant le même test DPPH (da Cruz Almeida *et al.*, 2017; Kasiotis *et al.*, 2017; Laaroussi *et al.*, 2021; Kahraman *et al.*, 2022).

Contrairement à l'activité antiradicalaire, les trois extraits de propolis ont montré une activité antioxydante similaire et assez puissante avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre de $\mu\text{g/mL}$, où l'extrait d'Annaba étant significativement plus efficace pour inhiber l'oxydation de l'acide linoléique comparativement aux deux autres extraits. Cette activité est supérieure à celle rapportée en utilisant le même test avec un extrait de propolis indienne qui a montré une CI_{50} de 710 $\mu\text{g/mL}$ (Kumari *et al.*, 2016) et à celle des extraits de propolis de Roumanie qui ont montré une inhibition d'environ 50 % à des concentrations de 40 $\mu\text{g/mL}$ (Gatea *et al.*, 2015). Le potentiel antioxydant de divers extraits de propolis, évalué par plusieurs tests antioxydants, a montré un degré élevé de corrélation avec les teneurs en composés phénoliques (Sawaya *et al.*, 2011; da Cruz Almeida *et al.*, 2017; Hernández Zarate *et al.*, 2018; Naik *et al.*, 2021). En effet, plusieurs composés connus pour leurs propriétés antiradicalaires et antioxydantes ont été identifiés dans la présente étude, notamment l'ester phénolique de l'acide caféique, la chrysine, l'acide coumarique, la quercétine, le kaempférol, la pinocembrine, l'acide cinnamique et l'acide férulique, dont il a été suggéré qu'ils s'incorporent aux membranes cellulaires et les protègent contre les attaques des radicaux libres (Barrientos *et al.*, 2013; Pitchai *et al.*, 2014; Bastos *et al.*, 2017; Devequi-Nunes *et al.*, 2018). Cependant, il est difficile d'identifier les composants les plus efficaces, étant donné que plusieurs composés d'un extrait de propolis peuvent agir en synergie sur les capacités antiradicalaires et antioxydantes (Johnston *et al.*, 2005 ; Küçük *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont montré que la propolis possède un effet marqué sur la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Forma *et al.*, 2021; Zabaïou *et al.*, 2017; Aso *et al.*, 2004). Dans cette étude, les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques des extraits de propolis ont été étudiés sur les lignées cellulaires de leucémie T aiguë humaine Jurkat et de leucémie lymphocytaire aiguë humaine Reh. Les trois extraits de propolis ont induit l'apoptose

de manière dose-dépendante dans les deux lignées cellulaires. Alors que les extraits de Médéa et de Ghardaïa étaient efficaces pour induire l'apoptose avec des CI_{50} de 1,9 à 2,5 $\mu\text{g/mL}$ dans les deux lignées cellulaires, l'extrait d'Annaba était significativement moins efficace dans les cellules Reh. De même, les trois extraits ont montré une puissante inhibition de la prolifération cellulaire par le test 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide appelé test MTT dans les deux lignées cellulaires, l'extrait d'Annaba étant significativement moins efficace que dans les cellules Reh. L'explication de cette moindre efficacité de l'extrait d'Annaba dans les cellules Reh est actuellement inconnue mais pourrait éventuellement être due à une résistance particulière des cellules de leucémie lymphocytaire aiguë à la composition de l'extrait d'Annaba. En ce qui concerne les cellules Jurkat, les extraits testés étaient beaucoup plus puissants comparativement aux extraits de propolis libanaise (Noureddine *et al.*, 2017) où la prolifération des cellules Jurkat a été inhibée avec une valeur de CI_{50} de 72 $\mu\text{g/mL}$ et l'apoptose a été induite avec une CI_{50} d'environ 60 $\mu\text{g/mL}$.

Il est important de noter que les extraits de propolis de la présente étude ont montré une induction faible ou nulle de l'apoptose dans les cellules lymphocytaires normales du sang périphérique à des concentrations de 10 $\mu\text{g/mL}$, ce qui suggère une spécificité ou une sélectivité pour les cellules cancéreuses. De plus, les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques des extraits avec des valeurs des CI_{50} de l'ordre de 2 à 3 $\mu\text{g/mL}$ suggèrent la présence de molécules ou de combinaison de molécules à des concentrations qui pourraient être cliniquement pertinentes. En effet, le dépistage de molécules thérapeutiques potentielles par le NCI-60 (National Cancer Institute américain) est effectué à une concentration de 10 μM (https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm) (Shoemaker, 2006), et les extraits de plantes brutes montrant des valeurs de CI_{50} à des concentrations de 20 $\mu\text{g/mL}$ ou moins seraient considérés comme des extraits actifs (Boik, 2001; Cragg & Newman, 2006).

Les flavonoïdes et les polyphénols tels que l'ester caféate de phénylthyle (CAPE), l'acide caféique, l'apigénine, la quercétine, la génistéine, la chrysin, l'acide p-coumarique, la naringénine, le kaempférol et la formononétine sont abondamment présents dans différents extraits de propolis, y compris dans ceux testés dans cette étude, et pourraient avoir une activité antitumorale (Noureddine *et al.*, 2017; Belmehdi *et al.*, 2022; Seyhan *et al.*, 2019; Valença *et al.*, 2013). En conséquence, la propolis et ses composants présentent une activité pro-apoptotique en

induisant les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques (Forma *et al.*, 2021). Il a été démontré que la chryisine, par exemple, déclenche l'apoptose par la voie mitochondriale et induit des effets cytotoxiques provoquant une perte du potentiel de la membrane mitochondriale tout en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), les niveaux de Ca^{2+} cytoplasmiques et la peroxydation des lipides (Naz *et al.*, 2019). La galangine, un autre composant de la propolis, exerce une activité anticancéreuse par le biais de multiples voies de signalisation (Benguedouar *et al.*, 2016; Noureddine *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017) et il a été démontré qu'elle réduisait la progression tumorale chez les souris porteuses de cellules de mélanome B16F1 (Liu *et al.*, 2017). L'acide caféique est connu pour arrêter le cycle cellulaire en fonction de la dose et du temps et activer l'apoptose (Kabała-Dzik *et al.*, 2017; Celińska-Janowicz *et al.*, 2018; Espíndola *et al.*, 2019), tandis que la quercétine, un flavonoïde présent dans la propolis, inhibe la croissance des lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549 et HCC-44) (Sak *et al.*, 2017) et des cellules JB6 P+ (Li *et al.*, 2012) en induisant l'apoptose dépendante de la caspase-3 (Zheng *et al.*, 2017; Zuhendri *et al.*, 2021; Rechek *et al.*, 2023). Il a été démontré que l'acide férulique modulait plusieurs voies moléculaires impliquées dans une multitude de fonctions biologiques et pouvait diminuer la résistance à plusieurs médicaments anti-cancéreux (Muthusamy *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Les propriétés anti-inflammatoires de la propolis constituent une autre activité biologique signalée, bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels la propolis exerce une activité anti-inflammatoire dans certaines études n'aient pas été complètement élucidés (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Belmehdi *et al.*, 2022). La 5-LO et ses produits, les leucotriènes, sont intimement impliqués dans le processus inflammatoire. La 5-LO est une cible anti-inflammatoire validée, mais à ce jour, seul le zileuton a été approuvé aux États-Unis. Malgré son efficacité clinique, ses propriétés pharmacocinétiques médiocres et ses problèmes de toxicité hépatique ont limité son utilisation. La présente étude montre que les extraits de propolis algérienne inhibent la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les modèles cellulaires HEK293 avec des CI_{50} inférieures à 1 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait de propolis de Ghardaïa, cependant, était moins efficace que les autres extraits, probablement en raison d'une faible activité antiradicalaire (Boudreau *et al.*, 2012). Nos résultats sont en accord avec ceux montrant que la propolis canadienne à une concentration finale de 5 $\mu\text{g/mL}$ inhibe environ 40% de la biosynthèse de la 5-LO (Sambou *et*

al., 2020), bien que la propolis algérienne ait montré une inhibition plus puissante. Les composés phénoliques, notamment le CAPE, la pinocembrine, la chrysin et le kaempférol, possèdent des propriétés anti-inflammatoires remarquables en inhibant la libération de l'acide arachidonique de la membrane cellulaire et/ou son métabolisme ultérieur (Mirzoeva *et al.*, 1996), et sont liés à un large éventail de voies de signalisation inflammatoire (Shahinozzaman *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). La présence de ces composés peut expliquer l'inhibition de la biosynthèse de la 5-LO par les extraits de propolis algérienne.

Dans la présente étude, l'activité antibactérienne des extraits de propolis algérienne a été évaluée à l'encontre des bactéries à Gram positif de référence *S. aureus*, *E. faecalis* et les bactéries à Gram négatif, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par El Menyiy *et al.* (2021) et qui ont montré que l'activité antibactérienne des échantillons de propolis marocaine et serbe variait entre $12,3 \pm 1,5$ mm et $32,2 \pm 1,1$ mm pour *S. aureus* suivie par *S. faecalis*, avec un diamètre variant de $10 \pm 0,12$ à $31,5 \pm 1,1$ mm, et *E. coli* avec un diamètre variant de $8,12 \pm 1,09$ à $19,33 \pm 2,51$ mm. *P. aeruginosa* présente la valeur la plus faible du diamètre d'inhibition ($8,02 \pm 0,5$ à $12,3 \pm 0,5$ mm).

Les valeurs des CMI des extraits de propolis algérienne à l'encontre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sur différentes souches de bactéries référencées varient de 7,81 à 62,5 µg/mL. Ainsi, il est difficile de comparer les résultats de la CMI aux différentes études en raison des différentes compositions de propolis et/ou des différentes méthodes utilisées pour l'évaluation.

Notre résultat est en accord avec les résultats rapportés pour la propolis d'Algérie (Nedji *et al.*, 2014), du Kenya (Muli & Maingi, 2007), d'Egypte, de Chine, de Bulgarie, d'Espagne, d'Australie, de Grèce, d'Italie (Hegazi *et al.*, 2014), du Brésil (Mohan *et al.*, 2015), du Portugal (Falcão *et al.*, 2014), de Bosnie (Senka *et al.*, 2011), d'Iran (Afrouzan *et al.*, 2017) et de la Turquie (Katircioglu & Nazime, 2006) qui ont montré une activité élevée contre les bactéries à Gram positif et une activité limitée contre les bactéries à Gram négatif. Le fait que les bactéries à Gram positif soient plus sensibles aux extraits de propolis a été attribué à la spécificité structurelle de chaque groupe de bactéries (AL-Ani *et al.*, 2018). Les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe qui contient une plus grande proportion de lipides et de polysaccharides que celle détectée chez les bactéries à Gram positif, ce qui peut empêcher l'entrée des molécules bioactives de la propolis dans la cellule (Ding *et al.*, 2021; Kahraman *et*

al., 2022). En outre, ce groupe de bactéries a la capacité de produire des enzymes hydrolytiques qui décomposent les composants de la propolis (Kędzia *et al.*, 2013; Bhargava *et al.*, 2021).

L'action antibactérienne de la propolis a été associée à différents mécanismes directs essentiels à la survie et à la prolifération, tels que l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (Xie *et al.*, 2015; Barreto *et al.*, 2022), la perturbation du potentiel membranaire et la diminution de la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Bankova *et al.*, 2000; Da Silveira Regueira-Neto *et al.*, 2018). Cette sensibilité a également été attribuée au type de propolis qui dépend des sources végétales. Par conséquent, la composition chimique de la propolis est également très variable dans des régions géographiques distinctes où les composés antibactériens de la propolis sont différents. La propolis turque a montré que sa principale source est l'exsudat des bourgeons de peuplier (Velikova *et al.*, 2001; Popova *et al.*, 2005). Elle contient de la pinocembrine, de la pinobanksine-3-O-acétate et de la galangine, qui sont considérées comme des marqueurs taxonomiques de la propolis de peuplier (Greenaway *et al.*, 1990). Les flavonoïdes et les dérivés de l'acide cinnamique sont présents dans les échantillons européens alors que les acides diterpéniques et les acides coumariques prénylés sont retrouvés dans les échantillons brésiliens (Bankova *et al.*, 2000). En effet, l'action bactéricide est liée à la présence de la plus forte concentration de composés phénoliques et flavonoïdes notamment l'acide caféique, la galangine, l'acide cinnamique, la pinocembrine, la pinobanksine, et l'acide férulique (Afrouzan *et al.*, 2017; Popova *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2020). Cependant, il est difficile d'attribuer cette activité à une seule molécule en raison de la complexité de la propolis qui contient plus de 1000 composés suggérant que l'activité antimicrobienne est due à un effet synergique entre les composants de la propolis (Devequi-Nunes *et al.*, 2018). Par ailleurs, des auteurs (Kartal *et al.*, 2003; Kallio *et al.*, 2012; Boufadi *et al.*, 2016) ont testé certains composés purs identifiés dans la propolis et ont démontré que l'acide caféique, l'acide cinnamique, l'acide coumarique, la quercétine et l'acide férulique confèrent aux extraits de propolis l'activité antibactérienne. Cependant, l'activité antibactérienne obtenue par la propolis naturelle était supérieure à celle des composés isolés, ce qui confirme que l'activité antibactérienne de la propolis est due à l'effet synergique de plusieurs composés.

La variation des résultats microbiologiques entre les différents extraits de propolis algérienne pourrait s'expliquer par des facteurs associés à l'origine géographique (la quantité et la diversité

des plantes, le climat et la race d'abeilles) qui conduisent à des différences dans les propriétés de la propolis (Seidel *et al.*, 2008; Boufadi *et al.*, 2016; Przybyłek & Karpiński, 2019; Ding *et al.*, 2020).

Dans notre étude, la propolis d'Annaba provenait du nord méditerranéen de l'Algérie produite par *A. mellifera intermissa* et celle de Médéa est produite par la même race d'abeille dans un climat plus transitionnel des collines du nord. Ces deux propolis ont été prélevées dans des régions riches en plantes et en eau. En revanche, la propolis de Ghardaïa a été récoltée dans une région désertique plus méridionale du pays par *A. mellifera sahariensis*. Ces facteurs peuvent expliquer les différences de diversité chimique des échantillons de propolis, ce qui peut se traduire par des activités biologiques différentes.

Les analyses chimiques par LC-MS/MS de ces trois échantillons ont révélé que les composés détectés ont une action bactériostatique. Bien que l'analyse de ces extraits soit semi-quantitative, les différences notables entre les extraits comprennent des teneurs relativement plus élevées en acide férulique dans l'extrait de Ghardaïa que dans les deux autres extraits. De même, la pinostrobine était beaucoup plus enrichie dans l'extrait d'Annaba suivi de l'extrait de Médéa et n'a pas été détectée dans l'extrait de propolis de Ghardaïa. Ces quelques différences claires pourraient expliquer la variation des résultats de l'effet antibactérien des échantillons de propolis Algérienne.

L'efficacité des extraits de propolis en tant que bioacaricide a été testée contre l'ectoparasite de l'abeille domestique *V. destructor*. Les extraits de propolis des trois stations ont montré leur efficacité variable à l'encontre de ce parasite. La variabilité dans les résultats obtenus entre les échantillons de propolis algérienne, bien que faible, pourrait être due à la différence des sous-espèces d'abeilles et des sources botaniques puisque des recherches antérieures ont démontré que la composition de la propolis dépend de la source des plantes et de l'origine géographique (Dantas Silva *et al.*, 2017), de la sous-espèce d'abeille (Salatino *et al.*, 2005) et de la saison de collecte (Tagliacollo *et al.*, 2011). Aussi, l'activité acaricide des extraits de propolis pourrait être due aux composants bioactifs tels que les phénols et les flavonoïdes, présents dans les échantillons de propolis (Damiani *et al.*, 2010; Drescher *et al.*, 2011; Habbi-Cherifi *et al.*, 2021). En effets, la propolis de Médéa et d'Annaba présentait des teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes plus élevées que celles de Ghardaïa, ce qui pourrait

expliquer la différence de l'activité acaricide entre les échantillons. Nos résultats sont en accord avec de nombreux auteurs qui suggèrent que l'activité acaricide des extraits de propolis est due aux composants bioactifs tels que les phénols et les flavonoïdes présents dans les échantillons de propolis (Damiani *et al.*, 2010; Drescher *et al.*, 2017; Habbi-Cherifi *et al.*, 2021). Certains auteurs (Garedew *et al.*, 2002; Drescher *et al.*, 2017) ont observé que les effets létaux des extraits éthanoliques sur les acariens étaient principalement observés en utilisant des extraits obtenus avec de l'alcool à 70% comparativement aux extraits obtenus ayant une teneur en alcool plus faible, concluant que les composants les plus biologiquement actifs pourraient être obtenus lorsque la propolis est extraite avec de l'éthanol à 70%. L'effet narcotique de la propolis sur *V. destructor* a également été détecté suite à l'utilisation des extraits de propolis par contact sur les acariens conduisant à des nécroses cellulaires et à des mortalités (Garedew *et al.*, 2002; Damiani *et al.*, 2010).

Dans notre étude, la pulvérisation des acariens varroas et des abeilles dans une mini-ruche avec 10% d'extrait de propolis algérienne a tué efficacement les acariens et était inoffensive pour les abeilles. En se basant sur les travaux de Garedew *et al.* (2002) et Hassan *et al.* (2016), il a été suggéré que le contact avec un extrait de propolis pourrait conduire à un affaiblissement de la cuticule des acariens, ce qui faciliterait l'entrée des composés actifs présents dans la propolis. En outre, la propolis peut accroître l'immunité des abeilles en renforçant leur réaction défensive (Evans *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus avec la propolis d'Allemagne et d'Argentine à une concentration de 10 % qui a tué 100 % des acariens varroas (Garedew *et al.*, 2002; Damiani *et al.*, 2010).

En revanche, des études ont révélé que l'ingestion de la propolis chez les abeilles, administrée par voie orale dans du sirop, n'est pas recommandée car elle affecte le développement des corps gras et des glandes hypopharyngiennes des abeilles (Damiani *et al.*, 2017). Des recherches antérieures ont également montré que les acaricides actuellement utilisés ont des effets négatifs sur les abeilles aux concentrations utilisées dans la lutte contre les acariens (Loucif-Ayad *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2017). Dans des conditions normales, au niveau des ruchers, bien que les abeilles ouvrières appliquent la propolis sur les parois de la ruche et sur les cadres, les varroas présents dans ces ruches ne sont pas affectés et aucun effet acaricide direct n'a été détecté. Il est probable que la propolis soit insoluble à l'intérieur de la ruche car la plupart des

composants actifs de la propolis sont insolubles dans l'eau ([Garedew et al., 2002](#); [Cunha et al., 2004](#)).

Il convient aussi de noter que les extraits de propolis présentent également d'autres avantages intéressants pour la santé des abeilles ou des études ont montré une action remarquable de la propolis contre de nombreux types de micro-organismes affectant les abeilles, tels que les bactéries responsables de la loque européenne (*Ascosphaera apis*) ([Rufatto et al., 2017](#)) et la loque américaine (*Paenibacillus larvae*) chez les abeilles ([Bastos et al., 2008](#); [Wilson et al., 2015](#)).

5. CONCLUSION

Les propolis collectées dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines d'abeilles présentent des activités biologiques importantes. Les extraits de propolis sont très riches en composés phénoliques et présentent des activités antiradicalaires (deux des trois extraits) et antioxydantes élevées qui sont associées à une puissante inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO. Ces extraits de propolis présentent également un potentiel anticancéreux en réduisant la prolifération et en induisant l'apoptose des lignées cellulaires cancéreuses à des concentrations relativement faibles. Aussi, ces extraits de propolis ont montré une activité antibactérienne à l'encontre de diverses souches bactériennes référencées et un effet acaricide vis-à-vis de l'acarien *V. destructor* sans porter atteinte à la survie des abeilles.

Chapitre II

Valorisation biologique et thérapeutique de la
gelée royale

1. INTRODUCTION

La gelée royale est une sécrétion blanche jaunâtre, de nature acide, crémeuse, à l'odeur et au goût piquants, de consistance gélatineuse, produite par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles nourricières (adultes âgées de 3 à 12 jours) (Fontana *et al.*, 2004; Buttstedt *et al.*, 2018). C'est la nourriture exclusive de la reine des abeilles. Grâce à cette nourriture spéciale, les reines se distinguent des ouvrières par leur taille, leur fertilité (une moyenne de 1000 œufs par jour) et leur longévité (entre 4 et 5 ans) (Barnuti *et al.*, 2011). La gelée royale fraîche contient principalement de l'eau (50-70%), des protéines (9-18%), des sucres (7-18%), des lipides (3-8%), des éléments minéraux (environ 1,5%), des vitamines (complexe A, B, C et E), des polyphénols, des nucléotides, des enzymes et des hormones (Cornara *et al.*, 2017). Plusieurs propriétés pharmacologiques ont été attribuées à la gelée royale, parmi lesquelles des propriétés antioxydantes (Özkök & Silici, 2017), antivirales (Hashemipour *et al.*, 2014), antitumorales (Premratanachai & Chanchao, 2014), anti-inflammatoires (Teixeira *et al.*, 2017), anti-âge (Nagai & Inoue, 2004), neuroprotectrices (Pasupuleti *et al.*, 2017), antimicrobiennes (Pavel *et al.*, 2011), immunomodulatrices et antihypercholestérolémique (Ibrahim, 2014). Ces propriétés biologiques sont essentiellement reliées à la présence du principal acide gras de la gelée royale, l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA), qui représente plus de 50% de la teneur en acides gras libres et dont la présence n'a été signalée dans aucun autre produit naturel, ni même dans les autres produits apicoles (Hattori *et al.*, 2011).

La quantité de 10-HDA dans la gelée royale diffère en fonction de l'origine de la gelée royale et de la sous-espèce d'abeilles, elle peut ainsi être utilisée comme marqueur de la qualité de la gelée royale. En outre, des protéines comme les protéines majeures de la gelée royale (PMGR) (Cornara *et al.*, 2017), des vitamines et des composés phénoliques contribuent à ces bio-activités (Jamnik *et al.*, 2012; Ramadan & Al Ghamdi, 2012). Outre la gelée royale fraîche, la gelée royale lyophilisée est également disponible dans le commerce. Le processus de lyophilisation élimine l'eau de la gelée royale et s'effectue par sublimation de l'eau. L'avantage de la gelée royale lyophilisée est qu'elle peut être stockée à température ambiante, ce qui facilite son utilisation et sa commercialisation (Nascimento *et al.*, 2015). En raison de ces attributs, la gelée royale est de plus en plus reconnue comme un complément alimentaire dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Elle joue aussi un rôle important dans les stratégies thérapeutiques de nombreuses maladies en l'occurrence les cancers. Parmi les cancers, les

leucémies lymphoblastiques, notamment les formes aiguës de la maladie, sont les plus couramment diagnostiquées chez les enfants dans le monde entier (Ribera *et al.*, 2009). De nouvelles stratégies de traitement efficaces et à moindre effets secondaires, se basant sur des produits naturels comme des traitements anticancéreux sont en plein essor (Bommareddy *et al.*, 2018; Miyata *et al.*, 2018).

Dans le but de déterminer si le processus de lyophilisation maintiendrait les propriétés chimiques et biologiques de la gelée royale, le présent travail vise d'une part à caractériser la gelée royale algérienne fraîche et lyophilisée collectée dans trois stations de fécondation contrôlée des reines par l'évaluation des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux et en 10-HDA et à révéler leurs capacités antiradicalaires et antioxydantes. D'autre part, il consiste à évaluer les activités pro-apoptotiques et antiprolifératives de la gelée royale contre les lignées cellulaires humaines de leucémie lymphocytaire aiguë ainsi que ses propriétés anti-inflammatoires potentielles via la 5-lipoxygénase.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Collecte et préparation des échantillons de gelée royale

Des échantillons de gelée royale fraîche ont été prélevés dans trois stations de fécondation contrôlée des reines situées à Annaba (GFA), Médéa (GFM) dans le nord de l'Algérie et à Ghardaïa (GFG) dans le sud de l'Algérie. Les souches d'abeilles locales présentes aux ruchers d'Annaba et de Médéa sont *A. mellifera intermissa* et *A. mellifera sahariensis* au rucher de Ghardaïa.

Les échantillons de gelée royale lyophilisée d'Annaba (GLA), de Médéa (GLM) et de Ghardaïa (GLG) ont été obtenus après lyophilisation de la gelée royale fraîche à l'aide d'un lyophilisateur (Freezemobile 12ES Series Freeze Dryer). Le méthanol a été utilisé comme solvant pour les différents essais, à l'exception des études cellulaires où le DMSO a été utilisé. Des échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée ont d'abord été mis en suspension dans 1 ml de solvant (méthanol ou DMSO). Les suspensions ont été mélangées au vortex pendant 1 minute, puis soumises à une sonication pendant 20 minutes dans un bain ultrasonique (Fisher scientific FS30) (Ibrahim & El-Banna, 2021).

2.2. Quantification de l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA) dans la gelée royale

Vingt-cinq mg de gelée royale fraîche et 10 mg de gelée royale lyophilisée ont été ajoutés à 10 ml de méthanol: eau (50:50) et la solution obtenue a été soumise à une sonication pendant 30 min dans un bain-marie à ultrasons (Fisher scientific FS30). Les mélanges ont été ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 1400g avant d'être filtrés à travers des filtres à seringue de 0,45 μm et transférés dans des flacons avant d'être injectés. Une solution mère de 10-HDA (400 $\mu\text{g/mL}$) dans 1: 1 méthanol: eau a été préparée et diluée en série avec le même solvant pour générer des solutions standards de 200 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 $\mu\text{g/mL}$ et 1,563 $\mu\text{g/mL}$ qui ont été injectées avant les échantillons expérimentaux pour générer une courbe standard. La teneur en 10-HDA des extraits de gelée royale fraîche et lyophilisée a été analysée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) à l'aide d'un système Agilent 1260 Infinity II équipé d'un détecteur à barrettes de diodes et d'une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 4,6 x 100 mm (2,7 microns). La longueur d'onde d'analyse était fixée à 235 nm et le volume d'injection à 10 μL avec des débits de 1 mL/min. Les solvants d'élution étaient les suivants: solvant A composé de 54% d'eau

déionisée, 23% de méthanol, 23% d'acétonitrile, 0,0025% de H_3PO_4 et le solvant B composé de 5% d'eau déionisée, 32% d'acétonitrile, 63% de méthanol et 0,01% de H_3PO_4 . Le gradient HPLC était de 3 minutes à 0% B, suivi d'une rampe de 1 minute et d'un maintien de 3 minutes à 100% B, suivi d'une rampe de 1 minute à 0% B et d'un rééquilibrage de 5 minutes à 0% B et le 10-HDA a été élu à environ 2,9 minutes.

2.3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu comme décrit par [El-Guendouz *et al.* \(2020\)](#) avec des modifications mineures. Brièvement, 100 μ L d'échantillons méthanoliques de la gelée royale à des concentrations de 50 mg/mL ont été mélangés avec 500 μ L d'eau puis 100 μ L de Folin-Ciocalteu. Six minutes plus tard, 1 mL d'une solution de carbonate de sodium (7%) et 500 μ L d'eau ont été ajoutés. Les solutions obtenues ont été placées à l'obscurité pendant 90 min. Ensuite, 100 μ L de chaque dilution ont été placés en triple dans une plaque de 96 puits et l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre multiplaque (VarioScan spectrophotometer, Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) à 760 nm. La teneur en polyphénols totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage ($y = 1,1193x + 0,0429$ et $R^2 = 0,998$) en utilisant des solutions étalons d'acide gallique (0,01-1 mg/mL) et a été exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de gelée royale (mgEAG/g gelée royale).

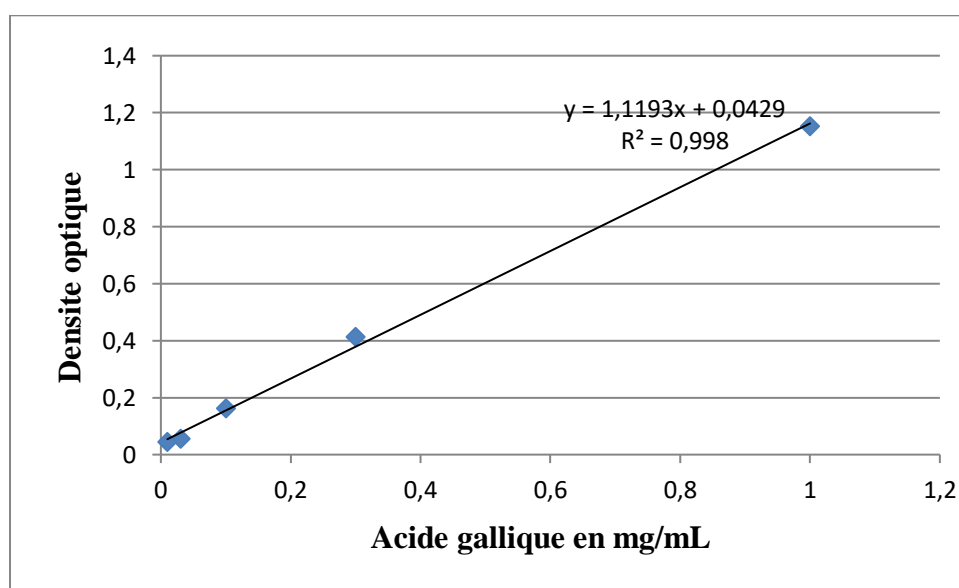


Figure 21. Courbe standard de la teneur en polyphénols (acide gallique).

2.4. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été évaluée par la méthode colorimétrique décrite par [El-Guendouz *et al.* \(2020\)](#) avec quelques modifications mineures. Brièvement, 100 μL d'échantillons méthanoliques de la gelée royale à des concentrations de 50 mg/mL ont été mélangés avec 500 μL d'eau distillée puis avec 100 μL d'une solution de nitrate de sodium à 5%. Six minutes plus tard, 150 μL d'une solution de chlorure d'aluminium à 10% ont été ajoutés et 5 minutes plus tard, 200 μL d'une solution d'hydroxyde de sodium (1M). Cent μL de cette solution ont été placés en triple dans une plaque de 96 puits et l'absorbance de la solution a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre multiplaque à 510 nm. La teneur en flavonoïdes totaux a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage ($y = 0,1179x + 0,2234$ et $R^2 = 0,9846$) en utilisant des solutions étalons de quercétine (0,03 - 1 mg/mL) et exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de gelée royale (mg EQ/g gelée royale).

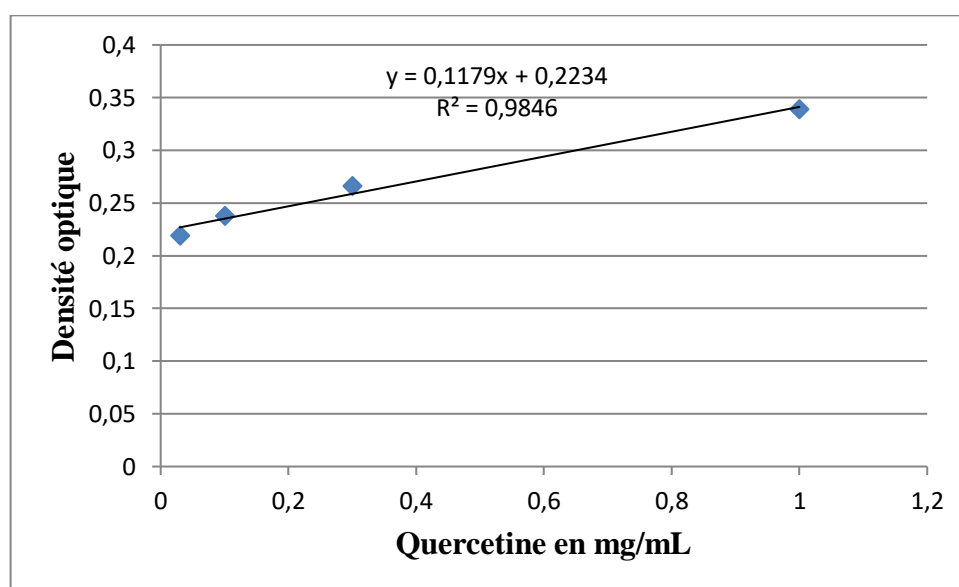


Figure 22. Courbe standard de la teneur en flavonoïdes (quercétine).

2.5. Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire a été évaluée par le test DPPH comme décrits par [Sambou *et al.* \(2020\)](#). Pour cela, 200 μL de solution de DPPH dans le méthanol (250 μM) ont été ajoutés à des échantillons méthanoliques de gelée royale fraîche et lyophilisée à différentes concentrations. Les tubes ont été agités vigoureusement, maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante et les absorbances ont été mesurées à 517 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre multiplaques. Le DPPH avec l'éthanol a été utilisé comme témoin, tandis que l'acide ascorbique a été utilisé comme référence. L'activité de piégeage des radicaux des échantillons a été calculée comme suit :

% d'inhibition = $[(A1 - A2) / A1] \times 100$, où A1 est l'absorbance de l'ajout de méthanol au lieu de l'échantillon testé et A2 est l'absorbance de la solution de l'échantillon testé.

Les concentrations inhibitrices du DPPH à 50% (CI₅₀) ont été déterminées sur la base du pourcentage d'inhibition de chaque dilution d'échantillon et les résultats ont été exprimés en milligramme d'échantillon de gelée royale par mL (mg/mL).

2.6. Activité antioxydante

Le test antioxydant a été réalisé comme décrit précédemment par [Boudreau *et al.* \(2012\)](#). Brièvement, 3,5 µL d'échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée à la concentration finale de 1000 mg/mL ont été ajoutés à un mélange de 350 µL de solution tamponnée au phosphate (5 mM, pH 7,4) contenant 0,05 % de Tween 20 et 0,16 mM d'acide linoléique. La réaction d'oxydation a été initiée en ajoutant 8,75 µL d'une solution de 2,29-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (2mM) aux solutions. Cent µL du mélange ont ensuite été ajoutés dans une plaque à 96 puits à fond plat transparente aux UV. Une condition sans acide linoléique a été utilisée pour la soustraction de la matrice, tandis qu'une condition sans AAPH (pas d'oxydation) a servi de contrôle de la réaction. Après l'ajout d'AAPH ou de solution saline tamponnée au phosphate (TPS) pour la réaction de contrôle, le taux d'oxydation des lipides a été déterminé en mesurant l'absorbance de chaque échantillon toutes les 5 minutes pendant 180 minutes en utilisant la détection UV à 234 nm (lecteur de microplaques hybride Biotek Synergy H1). L'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique a été calculée selon la formule suivante :

(%) = $(1 - \text{taux de variation de l'absorbance avec le composé testé} / \text{taux de variation de l'absorbance avec le solvant})$.

2.7. Activité anticancéreuse

2.7.1. Test de la mort cellulaire apoptotique

Les cellules Jurkat (leucémie T aiguë humaine) et Reh (leucémie lymphocytaire aiguë humaine) ont étéensemencées dans des plaques à 12 puits à la densité de 10^6 /puits dans un volume de 2 mL de milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 100 µg/mL de

pénicilline (pen) et 100 µg/mL de streptomycine (strep) (1% pen/strep). Ensuite, 4 µL de chaque échantillon de gelée royale à des concentrations finales de 200 µg/mL ont été ajoutés aux cellules. Les effets des échantillons de gelée royale sur l'apoptose ont été mesurés après 72h par cytométrie en flux en utilisant l'Annexine V et Zombie Aqua (BioLegend®). Cinq cents microlitres de suspensions cellulaires ont ensuite été incubés avec 100 µL de solution Master mix (98,5 µL de tampon d'annexine V + 1 µL d'annexine V-647 et 0,5 µL de Zombie aqua) pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité. L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux (Attune NxT) avec le logiciel FACS Attune Nxt Software v4.2.0.

2.7.2 Test de la viabilité cellulaire

Le test de la viabilité cellulaire a été réalisé à l'aide du test CellTiter-Blue (Promega, Madison, WI, USA) comme décrit précédemment par [Riss *et al.* \(2016\)](#). Brièvement, 1×10^4 cellules Jurkat et Reh/100 µL de cellules avec un milieu RPMI 1640 + 10% FBS et 1% pen/strep ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits et incubées avec des échantillons de la gelée royale aux concentrations 200 µg/mL pendant 72h. Ensuite, 20 µL de substrat Cell Titer Blue ont été ajoutés aux 100 µL de suspension de cellules traitées et incubées à 37°C pendant 1h pour les cellules Jurkat et 2h pour les cellules Reh. Les plaques ont été analysées sur un lecteur de microplaques à fluorescence (Synergy H1 Hybrid Microplate Reader).

2.8. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des échantillons de gelée royale a été évaluée par des essais de biosynthèse des produits de la 5-LO, comme décrit par [Robichaud *et al.* \(2016\)](#). Brièvement, les cellules HEK293 co-transfectées avec un vecteur exprimant la 5-LO et la protéine activatrice de la 5-LO (FLAP) ont été propagées en culture dans du milieu d'aigle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 10% de SVF et 1% de pen/strep et incubées à 37°C dans un incubateur humidifié. Les cellules HEK293 transfectées ont été collectées après trypsinisation et remises en suspension dans une solution saline équilibrée de Hank (HBSS) contenant 1,6 mM CaCl₂ à une concentration de 10^6 cellules/mL. La gelée royale fraîche et lyophilisée a été dissoute dans du DMSO à une concentration de 200 mg/mL et 1 µL de ces échantillons a été transféré dans un tube en polypropylène de 5 mL. Un volume de 0,5 mL de suspension cellulaire préparée dans HBSS/CaCl₂ (1,6 mM) a ensuite été ajouté, mélangé à l'aide d'un vortex et incubé à 37°C pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 15 min à 37°C par l'ajout de 1 µL du

mélange de 10 μM d'ionophore calcique A23187 (Sigma-Aldrich) et de 10 μM d'acide arachidonique (Cayman Chemical). La réaction a été stoppée par l'ajout d'un volume de 0,25 ml de solution d'arrêt à froid (MeOH:MeCN. 1:1) contenant 200 ng/ml de 19-OH prostaglandine B2 (PGB2) comme étalon interne. Les échantillons ont été vortexés et congelés (-80°C), puis ont été analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

2.9. Analyses statistiques

Les données relatives aux teneurs des composés phénoliques et aux différentes activités biologiques ont été exprimées en moyennes \pm SEM. L'analyse de la variance à un critère de classification suivie des tests HSD (Honest Significant Difference) de Tukey et Dunnett ont été utilisés. Les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTATS

3.1. Teneurs en acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA)

Dans cette étude, la teneur en 10-HDA des échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée a été déterminée à l'aide de la méthode HPLC. Le tableau 13 présente le pourcentage de la teneur en 10-HDA des deux formes de la gelée royale. La teneur moyenne en 10-HDA varie de 1,89 à 3,03% pour les gelées royales fraîches, où celle d'Annaba (GFA) et de Médéa (GFM) étaient similaires et avaient les valeurs les plus élevées, 3,03 et 2,82, respectivement, alors que, la gelée royale de Ghardaïa (GFG) avait la valeur la plus faible (1,89%). D'un autre côté, les échantillons de gelée royale lyophilisée présentaient une teneur en 10-HDA variant de 4,91 à 8,41% où celle de Médéa (GLM) avait la teneur la plus élevée.

Tableau 13. Teneur en acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10HDA) dans la gelée royale fraîche et lyophilisée.

Echantillons	10-HDA (%)	
	Moyenne	IC 95%
Gelée royale fraîche d'Annaba (GFA)	3,03	2,85 - 3,21
Gelée royale fraîche de Médéa (GFM)	2,82	2,61 - 3,04
Gelée royale fraîche de Ghardaïa (GFG)	1,89	1,59 - 2,19
Gelée royale lyophilisée d'Annaba (GLA)	4,91	3,45 - 6,33
Gelée royale lyophilisée de Médéa (GLM)	8,41	8,03 - 8,78
Gelée royale lyophilisée de Ghardaïa (GLG)	5,55	4,64 - 6,45

IC = 95% : Intervalle de confiance. Les valeurs sont issues de trois expériences indépendantes.

3.2. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, activités antiradicalaire et antioxydante

Les teneurs en polyphénols totaux des échantillons de gelée royale sont représentées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de gelée royale (mg EAG/g gelée royale). Les teneurs en polyphénols totaux des échantillons de GFA et de GFM étaient similaires avec des valeurs de 16,89 et 21,81 mg EAG/g gelée royale, respectivement. La teneur en polyphénols totaux de Ghardaïa (GFG) était significativement plus élevée que celle d'Annaba (GFA) et de Médéa (GFM) avec une valeur de 32,42 mg EAG/g gelée royale (Tab.14). Concernant la gelée royale lyophilisée, celle de Ghardaïa a présenté la teneur la plus élevée.

La teneur en flavonoïdes totaux des échantillons de gelée royale est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de gelée royale (mg EQ/g gelée royale). Comme indiqué dans le tableau 14, de faibles quantités de flavonoïdes ont été retrouvées dans la gelée royale fraîche, allant de 0,01 à 0,33 mg EQ/g gelée royale, sans différences significatives entre les échantillons. Quant à la gelée royale lyophilisée, celle de Médéa a présenté la plus forte teneur.

Dans la présente étude, les propriétés antiradicalaires et antioxydantes des échantillons de gelée royale ont été évaluées par des tests DPPH et d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique. D'après les résultats du test DPPH présentés dans le tableau 14, une CI_{50} plus faible reflète une plus grande activité de piégeage des radicaux, ce qui montre que l'activité antiradicalaire présentée par tous les échantillons de gelée royale était faible par rapport à l'activité présentée par l'acide ascorbique. Dans les échantillons frais de la gelée royale, celle de Ghardaïa (GFG) a présenté l'activité la plus forte (62,42 mg/mL), suivie de celle de Médéa (GFM) avec une valeur de CI_{50} de 213,80 mg/mL, puis celle d'Annaba (GFA) avec une valeur de CI_{50} de 345,20 mg/mL. Le même ordre de succession a été observé dans les échantillons lyophilisés.

D'autre part, les résultats de l'activité antioxydante par inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique (Tab. 14) ont montré l'ordre d'action suivant: gelée royale d'Annaba (GFA/GLA) > gelée royale de Ghardaïa (GFG/GLG) > gelée royale de Médéa (GFM/GLM). Néanmoins, ces activités étaient faibles par rapport aux concentrations élevées de gelée royale fraîche et lyophilisée appliquées.

Tableau 14. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, activités antiradicalaire (DPPH) et antioxydante des échantillons de gelée royale.

	Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g gelée royale)	Teneurs en flavonoïdes totaux (mg EQ/g gelée royale)	DPPH CI₅₀ (mg/mL)	Activité antioxydante (% d'inhibition)
GFA	16,89 ± 2,59 ^d	0,18 ± 0,005 ^c	345,20	28,61 ± 2,85
GFM	21,81 ± 1,44 ^d	0,33 ± 0,14 ^c	213,80	10,90 ± 2,72
GFG	32,42 ± 2,78 ^c	0,01 ± 0,003 ^c	62,42	19,65 ± 8,75
GLA	47,33 ± 1,38 ^b	1,38 ± 0,17 ^b	199,20	55,98 ± 19,23
GLM	53,72 ± 1,31 ^b	3,07 ± 0,73 ^a	123,00	25,46 ± 4,0
GLG	64,92 ± 4,41 ^a	2,78 ± 0,72 ^b	29,29	43,98 ± 8,36
Acide Ascorbique	ND	ND	0,0076	ND
Zileuton (10µM)	ND	ND	ND	81,10
Méthanol	ND	ND	AI	AI

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

AI = Absence d'inhibition

ND= Non déterminé

EAG, équivalent d'acide gallique; EQ, équivalent de quercétine. Les valeurs suivies de lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes selon le test de Tukey.

3.3. Activité anticancéreuse

Dans cette étude, les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques des échantillons de gelée royale algérienne ont été étudiés sur les lignées cellulaires de leucémie T aiguë humaine Jurkat et de leucémie lymphocytaire aiguë humaine Reh. Les résultats de la figure 23 montrent que tous les échantillons de gelée royale ne réduisent pas la viabilité des cellules Jurkat (a) et que seuls les

échantillons lyophilisés de gelée royale réduisent la viabilité des cellules Reh (b).

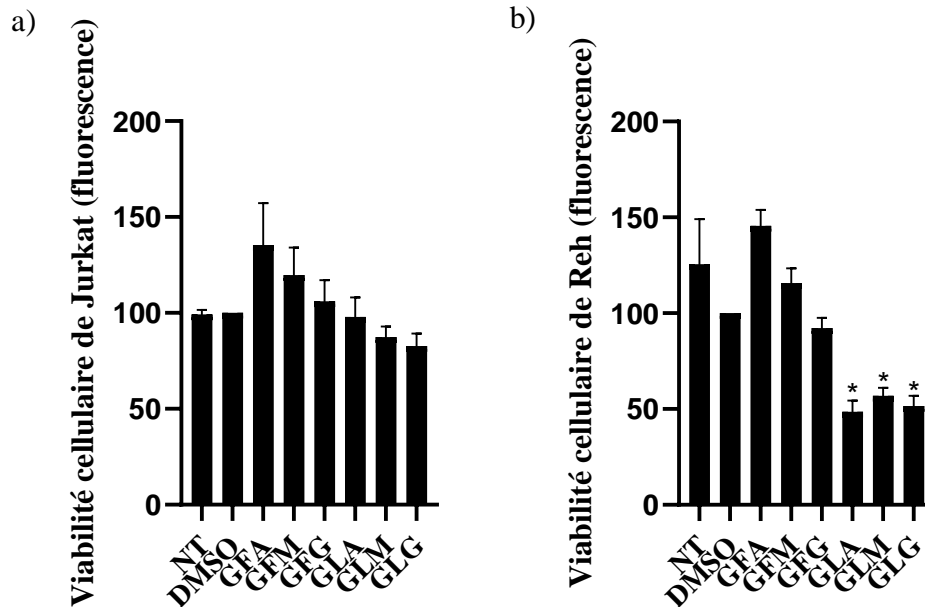


Figure 23. Viabilité cellulaire des cellules cancéreuses Jurkat (a) et Reh (b) après traitement avec des échantillons de gelée royale pendant 3 jours. NT : Non traité. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 2 essais indépendants, chacun réalisé en double; les valeurs avec des exposants sont significativement différentes ($P < 0,01$) comme déterminé par ANOVA suivie du test de Tukey.

Les résultats de l'essai Annexine V-Zombie aqua (Tab. 15) ont montré que la gelée royale à la concentration finale de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ n'a pas induit des changements significatifs dans la viabilité des cellules Jurkat comparativement aux témoins, confirmant de ce fait, que la lignée cellulaire Jurkat n'est pas sensible à la gelée royale. Cependant, seuls les échantillons GFG et GLA ont induit une légère diminution de la proportion de cellules Reh doublement négatives (Annexine V-/Zombie-) d'une manière significative par rapport aux témoins et aux autres échantillons. Aussi, une légère accumulation de cellules Annexine V-/Zombie+ a été décelée dans les cellules Reh traitées avec les GFG, GLA, GLM et GLG qui est généralement indicative d'une nécrose (Tab. 15).

Tableau 15. Pourcentages moyens de cellules Jurkat et Reh vivantes et apoptotiques après traitement avec des échantillons de gelée royale (200 µg/mL). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM de 2 expériences indépendantes; chaque expérience a été réalisée en double * Valeurs significativement différentes ($p < 0,01$) du témoin comme déterminé par ANOVA à un facteur avec test post hoc de Dunnett.

Jurkat	Témoin	GFA	GFM	GFG	GLA	GLM	GLG
(DMSO)							
A- Z-	76,4 ± 7,1	76,4 ± 5,7	77,4 ± 8,9	75,3 ± 8,5	69,9 ± 1,3	71,9 ± 3,0	69,9 ± 1,3
A+ Z-	10,7 ± 6,5	6,2 ± 0,4	8,0 ± 2,6	7,9 ± 0,3	7,8 ± 0,4	9,0 ± 1,0	6,6 ± 1,0
A+ Z+	11,4 ± 0,8	13,3 ± 2,3	10,4 ± 6,9	10,9 ± 2,9	12,2 ± 2,5	10,5 ± 4,2	12,6 ± 1,5
A- Z+	1,3 ± 0,1	4,0 ± 2,9	3,9 ± 4,6	5,7 ± 5,2	9,9 ± 1,6	8,3 ± 2,2	10,7 ± 3,9
Reh	Témoin	GFA	GFM	GFG	GLA	GLM	GLG
(DMSO)							
A- Z-	94,4 ± 1,2	90,7 ± 3,1	90,9 ± 2,6	87,2 ± 0,4*	85,3 ± 0,1*	88,8 ± 1,3	90,0 ± 2,0
A+ Z-	1,8 ± 0,06	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,5 ± 1,6	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,7	2,6 ± 0,6
A+ Z+	3,6 ± 1,1	4,2 ± 1,3	3,8 ± 1,8	3,5 ± 0,3	3,9 ± 0,9	3,8 ± 0,5	3,6 ± 1,3
A- Z+	0,07 ± 0,1	3,1 ± 1,5	3,2 ± 0,6	6,6 ± 1,5*	8,3 ± 1,4*	4,5 ± 0,1*	3,6 ± 0,1*

3.4. Test de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293

Pour étudier la capacité des échantillons de gelée royale à inhiber la biosynthèse des produits de la 5-LO, des cellules HEK293 transfectées ont été utilisées comme modèle et ont été incubées avec des échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée. Les résultats de la figure 24 montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les échantillons de gelée royale et les témoins. Tous les échantillons de gelée royale semblent ne pas inhiber la biosynthèse des produits de la 5-LO, même après avoir essayé de forcer le processus en appliquant de fortes concentrations de gelée royale fraîche et lyophilisée.

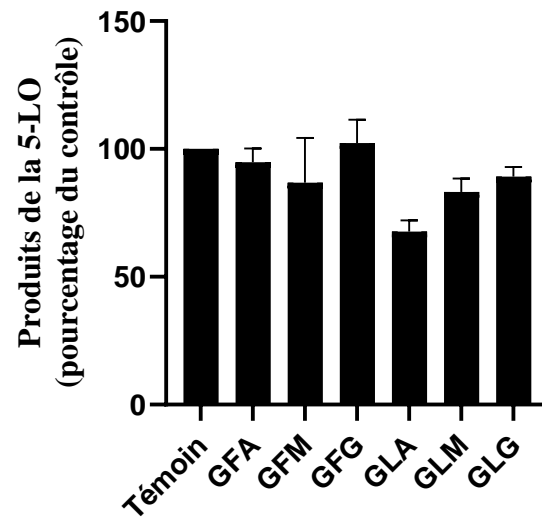


Figure 24. Inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO dans les cellules HEK293 par des échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM d'au moins quatre expériences indépendantes, chacune réalisée en double.

4. DISCUSSION

La composition chimique de la gelée royale provenant de différentes régions géographiques est affectée par de nombreux facteurs, notamment l'espèce d'abeille, le moment de la récolte, l'origine géographique, les conditions environnementales, les méthodes de stockage ou les technologies de transformation (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012; Seven *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016; Collazo *et al.*, 2021). Cette diversité chimique peut se traduire par des activités biologiques différentes. Dans ce contexte, la présente étude a concerné l'évaluation de la composition chimique et des activités biologiques de la gelée collectée dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines et a permis de déterminer si le processus de lyophilisation maintiendrait les propriétés chimiques et biologiques de la gelée royale.

Une première caractérisation de la gelée royale algérienne collectée dans les trois stations a été réalisée en mesurant la teneur en 10-HDA à l'aide de la méthode HPLC.

L'acide gras 10-HDA est communément appelé l'empreinte digitale de la gelée royale. Il est connu comme un composant unique de la gelée royale car il n'est pas présent dans les autres produits de la ruche (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012; Honda *et al.*, 2015; Kanelis *et al.*, 2015). C'est l'un des paramètres les plus importants utilisés afin de déterminer la pureté, la fraîcheur et la qualité de la gelée royale et auquel sont attribuées diverses activités biologiques (Makino *et al.*, 2016; Dundar *et al.*, 2022). De ce fait, des valeurs élevées de 10-HDA sont indicatrices d'une qualité meilleure de la gelée royale bénéfique pour la santé humaine (Mokaya *et al.*, 2020).

Les variations des teneurs en 10-HDA dans les différents échantillons de gelée royale pourraient être dues aux sous-espèces d'abeilles (Mokaya *et al.*, 2020). Nos résultats sont en accord avec cette recherche car la gelée royale d'Annaba (GFA) et de Médéa (GFM) ont été produites par *A. mellifera intermissa* tandis que celle de Ghardaïa (GFG) a été produite par *A. mellifera sahariensis* comme précédemment confirmé lors de l'identification des sous-espèces d'abeilles mellifères locales (Loucif-Ayad *et al.*, 2014; Achou *et al.*, 2015).

Les valeurs de l'acide gras 10-HDA trouvées dans la présente étude se situent dans la limite de celles rapportées précédemment par différents auteurs (Feroli *et al.*, 2007; Kanelis *et al.*, 2015; Mokaya *et al.*, 2020; Balkanska, 2018) au niveau de la gelée royale originaire d'Australie, de Bulgarie, de Chine, d'Italie, du Kenya et d'Amérique du Sud et qui se situaient entre 0,8 et 3,4%. Les échantillons de gelée royale lyophilisée présentaient des teneurs en 10-HDA variant de 4,91

à 8,41%. Sachant que la gelée royale fraîche contient 60-70% d'eau, il semble que le processus de lyophilisation maintiendrait la qualité des échantillons de la gelée royale pour les GLM et GLG. Seul l'échantillon de la GLA a montré une valeur de 10-HDA plus faible après lyophilisation, ce qui pourrait être dû à un problème de solubilisation. Certains auteurs (Nascimento *et al.*, 2015; Dundar *et al.*, 2022) ont rapporté que la lyophilisation est une méthode pratique pour maintenir la teneur en 10-HDA, les activités chimiques et biologiques comme les activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Les teneurs en polyphénols totaux des échantillons de gelée royale sélectionnés dans notre étude étaient similaires aux valeurs détectées dans les échantillons de gelée royale locaux et commerciaux de la Roumanie (14,6-39,9 et 15,4-32,5 mg EAG/g gelée royale respectivement) et du Japon (21,2-22,8 mg EAG/g gelée royale) (Pavel *et al.*, 2014) et supérieures à celles rapportées par Özkö & Silici (2017) pour les échantillons de gelée royale de la Turquie (59,2 mg EAG/100 g gelée royale).

D'autre part, les teneurs en flavonoïdes totaux des échantillons de gelée royale ont été retrouvées en faibles quantités dans la gelée royale fraîche, allant de $0,05 \pm 0,03$ à $0,45 \pm 0,07$ mg EQ/g gelée royale. Ces valeurs se situent dans l'intervalle rapporté par El-Guendouz *et al.* (2020) avec des valeurs comprises entre 0,1 et 0,5 mg EQ/g gelée royale. Seven *et al.* (2014) ont indiqué que la faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les échantillons de gelée royale pourrait être due au fait que la gelée royale soit sécrétée par de jeunes abeilles ouvrières qui ne consomment que de petites quantités de propolis, de miel et de pollen, qui sont la seule source possible de ces substances phytochimiques.

La variabilité des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux entre les différents échantillons confirme que la composition de la gelée royale est affectée par de nombreux facteurs précédemment mentionnés. Dans notre étude, la gelée royale d'Annaba provient du nord méditerranéen de l'Algérie et, est produite par *A. mellifera intermissa*, la gelée royale de Médéa est produite par la même souche d'abeille dans un climat plus transitionnel des collines du nord, tandis que la gelée royale de Ghardaïa provient d'une région désertique plus méridionale du pays, caractérisée par la présence de la souche d'abeille locale *A. mellifera sahariensis*. Ces facteurs peuvent expliquer les différences des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes entre les échantillons de gelée royale. Il semble que le processus de lyophilisation n'a pas d'effet significatif sur les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, ce qui suggère qu'il pourrait être une

bonne méthode à proposer pour préserver la qualité de la gelée royale, comme précédemment rapporté par [Dundar et al. \(2022\)](#).

Concernant l'activité antiradicalaire des échantillons de gelée royale, une forte corrélation a été observée entre l'activité antioxydante déterminée par la méthode de DPPH et les teneurs des polyphénols totaux pour l'ensemble des échantillons de gelée royale. La faible activité par rapport au témoin pourrait être due aux faibles concentrations des substances phytochimiques dans les échantillons de gelée royale, comme précédemment signalé par [Mokaya et al. \(2020\)](#). Nos résultats relatifs au test de DPPH se situent dans l'intervalle rapporté par [Mokaya et al. \(2020\)](#) et [Kolayli et al. \(2016\)](#) qui ont montré que la valeur de la CI_{50} des gelées royales fraîches d'Afrique et de Turquie se situait entre 102 et 354 mg/mL. Il semble que les activités antiradicalaires et antioxydantes des échantillons de gelée royale n'ont pas été affectées par le processus de lyophilisation et soutiennent les conclusions de [Dundar et al. \(2022\)](#). Les auteurs suggèrent que le potentiel de la gelée royale pour l'activité antioxydante provient de nombreux facteurs et principalement de la présence de l'acide gras 10-HDA ([Balkanska, 2018](#); [Ahmad et al., 2020](#)) mais aussi des composés phytochimiques implicites comme les composés phénoliques ([Balkanska et al., 2018](#); [Mokaya et al., 2020](#)), des protéines ([Nagai et al., 2004](#); [Guo et al., 2009](#); [Collazo et al., 2021](#)) ainsi que des vitamines et des oligoéléments ([Aslan et al., 2012](#); [Chen et al., 2016](#)).

Les propriétés anticancéreuses de la gelée royale constituent une autre activité biologique signalée. Dans cette étude, les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques des échantillons de gelée royale algérienne ont été étudiés sur les lignées cellulaires de leucémie aiguë à cellules T humaines Jurkat et de leucémie lymphocytaire aiguë humaine Reh. Nos résultats sont en accord avec certaines études ([Borawska et al., 2014](#); [Filipic et al., 2015](#); [Miyata et al., 2018](#)) où les gelées royales testées avaient tendance à inhiber la prolifération des cellules d'astrocytome, de glioblastome multiforme et de cancer colorectal, mais ces effets anticancéreux ne sont pas reconnus comme étant significatifs.

En revanche, de nombreuses études ont montré les effets antiprolifératifs des échantillons de gelée royale contre des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF7) ([Nakaya et al., 2007](#); [Zhang et al., 2017](#); [Korany et al., 2020](#); [Moubarak et al., 2021](#)), de cancer du poumon ([Kimura et al., 2008](#)), de cancer du côlon (SW480) et de cancer de la prostate (PC-3) ([Ahmad et al., 2020](#)) de manière dose-dépendante ([Okic-Djordjevic et al., 2013](#)). Les auteurs ont lié cette activité

antitumorale des échantillons de gelée royale au 10-HDA (Hattori *et al.*, 2007; Collazo *et al.*, 2021) qui, dans d'autres études, a présenté une réduction significative de la viabilité des cellules de mélanome B16F1 à une concentration de 1 mM (Ibrahim & El-Banna, 2021) et a inhibé le développement de la leucémie AKR transplantable chez les souris (Hattori *et al.*, 2007). Cependant, Nakaya *et al.* (2007) ont rapporté que le 10-HDA ne présentait pas une activité antiproliférative similaire à celle des échantillons de gelée royale.

Les mécanismes par lesquels les échantillons de gelée royale pourraient présenter une activité antitumorale ont été rapportés par certains auteurs qui ont montré l'augmentation des médiateurs de l'apoptose Caspase-3 et la surexpression de Bax (Abdel-Hafez *et al.*, 2017; Karadeniz *et al.*, 2011; Miyata *et al.*, 2018). En revanche, la même étude a montré la réactivité d'un inhibiteur de l'apoptose Bcl-xL (Karadeniz *et al.*, 2011; Miyata *et al.*, 2018). Les informations sur les effets anticancéreux de la gelée royale sont incomplètes et une analyse plus détaillée au niveau moléculaire est nécessaire pour confirmer l'utilité et les limites de la gelée royale en tant qu'agent thérapeutique. Cependant, de nombreux chercheurs et cliniciens estiment que les effets anticancéreux exercés par la gelée royale seule sont loin d'être satisfaisants et que la monothérapie par la gelée royale n'est pas recommandée (Borawska *et al.*, 2014; Filipic *et al.*, 2015; Miyata *et al.*, 2018).

L'inflammation est un processus normal de la réponse immunitaire innée contre l'infection ou la blessure, mais si elle n'est pas bien régulée, elle peut produire des lésions tissulaires et induire certaines maladies inflammatoires (Radmark *et al.*, 2007). Le processus est stimulé par une vaste cascade d'aspects biologiques et chimiques, dont la voie de la 5-Lipoxygénase (5-LO). La 5-LO et ses produits, les leucotriènes, sont intimement impliqués dans le processus inflammatoire. La 5-LO est une cible anti-inflammatoire validée et la conception d'inhibiteurs de la 5-LO est un domaine actif. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les échantillons de gelée royale semblent ne pas inhiber la biosynthèse des produits de la 5-LO, même après avoir essayé de forcer le processus en appliquant de fortes concentrations de gelée royale fraîche et lyophilisée. En revanche, de nombreuses études *in vitro* ont révélé l'activité anti-inflammatoire de la gelée royale en supprimant la production de cytokines pro-inflammatoires de manière dose-dépendante sans avoir d'influence cytotoxique sur les macrophages (Ahmad *et al.*, 2020; El-Guendouz *et al.*, 2020). Une autre voie a été suggérée par Collazo *et al.* (2021) selon laquelle les échantillons de gelée royale présentent une activité anti-

inflammatoire par l'inhibition de l'expression de la protéine pro-inflammatoire COX-2. Nos résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par [El-Guendouz *et al.* \(2020\)](#) qui ont rapporté que les gelées royales du Maroc, d'Espagne et du Portugal sont capables d'inhiber la réaction enzymatique de la 5-LO. Cependant, les activités démontrées étaient beaucoup plus faibles que le contrôle positif utilisé, le nordihydroguaiaretique. Les auteurs ont indiqué que l'activité anti-inflammatoire démontrée par la gelée royale était due à la présence de composés phénoliques, de protéines majeurs et surtout de 10-HDA qui indique un effet anti-inflammatoire important ([Ahmad *et al.*, 2020](#); [El-Guendouz *et al.*, 2020](#); [Collazo *et al.*, 2021](#)).

5. CONCLUSION

La gelée royale collectée dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines d'abeilles est un mélange complexe de composés bioactifs, en particulier le 10-HDA; les polyphénols et les flavonoïdes contribuant aux propriétés bio-fonctionnelles comme les activités antioxydantes et antiradicalaires. Cependant, il semble que la voie 5-LO ne soit pas le mécanisme permettant à la gelée royale de présenter ses propriétés anti-inflammatoires. La gelée royale n'était pas significativement efficace sur la viabilité des cellules Jurkat et Reh. Le processus de lyophilisation a permis l'obtention d'une gelée royale lyophilisée possédant les mêmes propriétés que la gelée royale fraîche constituant ainsi une bonne alternative pour maintenir la qualité de la gelée royale et ses propriétés biologiques.

Conclusions et perspectives

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Ce travail de recherche s'inscrit dans le programme de la protection de l'abeille locale Algérienne et la valorisation des produits de la ruche. Il vise à promouvoir la conservation de la pureté des sous-espèces d'abeilles autochtones par la mise en place des stations de fécondation des reines et la création future de conservatoires d'abeilles ainsi que la valorisation biologique des produits de la ruche, notamment la propolis et la gelée royale.

Dans un premier temps, l'analyse génétique des abeilles collectées dans les trois stations de fécondation contrôlée des reines (Annaba, Médéa, Ghardaïa) a permis de confirmer leur appartenance à la lignée Africaine A ainsi que l'absence d'introgession de l'ADNmt par des lignées étrangères au niveau des stations sélectionnées, et que toutes les abeilles ouvrières qui ont récolté la propolis et produit la gelée royale analysées dans cette étude étaient les sous-espèces autochtones d'Algérie *A. mellifera intermissa* et *A. mellifera sahariensis*. De plus, cette analyse a révélé l'existence de 17 haplotypes mitochondriaux à différentes fréquences appartenant à la lignée A ainsi qu'une diversité haplotypique élevée. Parmi les 17 haplotypes identifiés, 14 étaient de nouveaux haplotypes jamais enregistrés auparavant et 3 étaient des haplotypes déjà signalés dans la lignée africaine A.

La propolis collectée dans les trois stations présente des activités biologiques importantes. Les extraits éthanoliques de propolis sont très riches en composés phénoliques et présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes élevées qui sont associées à une puissante activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-LO. Ces extraits de propolis présentent également un potentiel anticancéreux en réduisant la prolifération et en induisant l'apoptose des lignées cellulaires cancéreuses, en l'occurrence les lignées cellulaires Jurkat (leucémie T aiguë humaine) et Reh (leucémie lymphocytaire aiguë humaine) à des concentrations relativement faibles. Des études supplémentaires sont souhaitables afin de comprendre davantage l'identité des composants responsables de ces activités biologiques.

L'étude réalisée sur des bactéries référencées à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et à Gram négatif, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* a montré que les extraits de propolis inhibent la croissance de ces souches bactériennes. L'activité bactériostatique est plus importante sur les bactéries Gram+ comparativement aux bactéries Gram-. Toutefois, il est important de noter que les effets bactériostatiques peuvent varier en fonction de l'origine géographique de la propolis et des

souches bactériennes impliquées. Il serait également intéressant de tester les extraits de propolis sur des souches bactériennes multirésistantes et de voir l'effet combiné des extraits de propolis avec des antibiotiques appropriés pour la détection éventuelle d'un effet de synergie.

Nos données ont montré que la pulvérisation avec une concentration de 10% de l'extrait de propolis (préparé dans 40% d'éthanol) était très efficace et pouvait tuer 100% des acariens *V. destructor* en 3 jours dans les conditions de mini-ruche au laboratoire, et que ce traitement par pulvérisation était sans danger sur la survie des abeilles. Les résultats obtenus dans cette optique sont en faveur d'une utilisation des extraits de propolis par pulvérisation afin de contrôler efficacement l'infestation des colonies d'abeilles par les acariens *V. destructor* et sans porter atteinte à la survie des abeilles. Ces données sont d'une grande utilité, en particulier pour les apiculteurs locaux qui sont confrontés à des mortalités élevées dans leurs colonies suite à l'infestation par ces ectoparasites. Ils contribuent aussi à la recherche et au développement de nouvelles alternatives pour contrôler *V. destructor* afin de réduire l'utilisation et la quantité d'acaricides synthétiques dans les colonies d'abeilles. Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin d'identifier la meilleure concentration d'extrait de propolis et la fréquence de traitement par pulvérisation à l'intérieur des ruches. De plus, les recherches futures devraient permettre d'élucider le mode d'action de cette toxicité acaricide élevée et sélective des extraits de propolis.

L'analyse de la gelée royale fraîche et lyophilisée a montré une richesse en composés bioactifs, en particulier en 10-HDA et en polyphénols et flavonoïdes totaux contribuant activement dans les activités antioxydantes et antiradicalaires de la gelée royale. Cependant, il semble que la voie 5-LO ne soit pas le mécanisme permettant à la gelée royale de présenter ses propriétés anti-inflammatoires. La gelée royale algérienne fraîche et lyophilisée n'était pas significativement efficace sur la viabilité des cellules Jurkat et Reh, ce qui suggère que la monothérapie par la gelée royale est loin d'être satisfaisante. Le processus de lyophilisation peut offrir une méthode afin de maintenir la qualité de la gelée royale et ses propriétés biologiques, ce qui permet de l'utiliser dans des produits médicaux, des nutriments pour la santé, des cosmétiques et à des fins commerciales.

Les abeilles sont un allié dans notre quotidien au niveau de l'alimentation, de l'écologie et de la santé. Il est impératif de les protéger pour qu'elles continuent à nous faire profiter de leurs bienfaits.

Références bibliographiques

REFERENCES

- Abdel-Fattah, N.S., & Nada, O.H. (2007). Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 37(2), 691-710.
- Abdel-Hafez, S. M. N., Rifaai, R. A., & Abdelzaher, W. Y. (2017). Possible protective effect of royal jelly against cyclophosphamide induced prostatic damage in male albino rats; a biochemical, histological and immuno-histo-chemical study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.020>
- Achou, M., Loucif-Ayad, W., Legout, H., Hmidan, H., Alburaki, M. and Garnery, L. (2015). An Insightful Molecular Analysis Reveals Foreign Honeybees Among Algerian Honeybee Populations (*Apis mellifera* L.). *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 06(01). <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000166>
- Adjlane, N., & Haddad, N. (2014). Detection of Deformed Wing Virus in the local bee colonies *Apis mellifera intermissa* in Algeria and its relationship with *Varroa destructor*. *Mellifera*, 14(27/28), 3-10.
- Afrouzan, H., Tahghighi, A., Zakeri, S., & Es-haghi, A. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iranian Biomedical Journal*, 22(1). <https://doi.org/10.22034/ibj.22.1.50>
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., & Li, J. (2020). New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 382. <https://doi.org/10.3390/ijms21020382>
- 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(24), 7286-7292. <https://doi.org/10.1021/jf048726s>
- AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.3390/medicines5010002>
- Alburaki, M., Madella, S., Lopez, J., Bouga, M., Chen, Y., & vanEngelsdorp, D. (2023). Honey bee populations of the USA display restrictions in their mtDNA haplotype diversity. *Frontiers in Genetics*, 13, 1092121. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1092121>
- Allain, E. P., Boudreau, L. H., Flamand, N., & Surette, M. E. (2015). The Intracellular Localisation and Phosphorylation Profile of the Human 5-Lipoxygenase $\Delta 13$ Isoform Differs from That of Its Full Length Counterpart. *PLOS ONE*, 10(7), e0132607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132607>
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Eckholm, B. J., Mott, B. M., & DeGrandi-Hoffman, G. (2011).

- An emerging paradigm of colony health : Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58(4), 431-444.
<https://doi.org/10.1007/s00040-011-0194-6>
- Aslan, A., Cemek, M., Buyukokuroglu, M. E., Altunbas, K., Bas, O., & Yurumez, Y. (2012). Royal jelly can diminish secondary neuronal damage after experimental spinal cord injury in rabbits. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(7), 2554-2559.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.018>
- Aso, K., Kanno, S., Tadano, T., Satoh, S., & Ishikawa, M. (2004). Inhibitory Effect of Propolis on the Growth of Human Leukemia U937. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 727-730. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.727>
- Babić, S., Pašić, Š., Dukić, B., & Ćoralić, A. (2011). Antifungal activity of propolis originated from Bosnia and Herzegovina. *Veterinaria*, 60(3-4), 187-193.
- Baldensperger, P.J. (1924). Sur l'apiculture en orient. In Proceeding of the sixth International Congress of Apiculture (p. 59-64).
- Balkanska, R. (2018). Correlations of Physicochemical Parameters, Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Fresh Royal Jelly Samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(04), 3744-3750.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.421>
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>
- Bankova, V. S., De Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis : Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
<https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- Bărnuțiu, L., Al, L., Mărghitaș, D., Dezmirean, C., Mihai, O., & Bobis, O. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly -Review. *Lucrari Stiintifice : Zootehnie si Biotehnologii*, 44.
- Barour, C., & Baylac, M. (2016). Geometric morphometric discrimination of the three African honeybee subspecies *Apis mellifera intermissa*, *A. m. sahariensis* and *A. m. capensis* (Hymenoptera, Apidae) : Fore wing and hind wing landmark configurations. *Journal of Hymenoptera Research*, 52, 61-70. <https://doi.org/10.3897/jhr.52.8787>
- Barour, C., Tahar, A., & Baylac, M. (2011). Forewing Shape Variation in Algerian Honey Bee Populations of *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera : Apidae): A Landmark-Based Geometric Morphometrics Analysis. *African Entomology*, 19(1), 11-22. <https://doi.org/10.4001/003.019.0101>
- Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Reis, J. H. D. O., Hodel, K. V. S., Gama, L. A., Anjos, J. P., Minafra-Rezende, C. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., Pessoa, C. D. Ó., Luciano, M. C.

- D. S., Barbosa, J. D. V., Umsza-Guez, M. A., & Machado, B. A. S. (2022). Evaluation of the Potential of Brazilian Red Propolis Extracts : An Analysis of the Chemical Composition and Biological Properties. *Applied Sciences*, *12*(22), 11741. <https://doi.org/10.3390/app122211741>
- Barrientos, L., Herrera, C. L., Montenegro, G., Ortega, X., Veloz, J., Alvear, M., Cuevas, A., Saavedra, N., & Salazar, L. A. (2013). Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(2), 577-585. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200038>
- Bastos, E. M. A. F., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E., & Spivak, M. (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *97*(3), 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.007>
- Bastos, I. V. G. A., Oliveira, T. B. D., Rodrigues, M. D., Militão, G. C. G., Silva, T. G. D., Turatti, I. C. C., Lopes, N. P., & Melo, S. J. D. (2017). Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *Phoradendron mucronatum* and *Phoradendron microphyllum* (Viscaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *89*(2), 991-1001. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160586>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, *45*(4_ts), 493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Belmehdi, O., El Menyiy, N., Bouyahya, A., El Baaboua, A., El Omari, N., Gallo, M., Montesano, D., Naviglio, D., Zengin, G., Skali Senhaji, N., Goh, B. H., & Abrini, J. (2023). Recent Advances in the Chemical Composition and Biological Activities of Propolis. *Food Reviews International*, *39*(9), 6078-6128. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2089164>
- Benchaâbane, S., Ayad, A. S., Loucif-Ayad, W., & Soltani, N. (2022). Multibiomarker responses after exposure to a sublethal concentration of thiamethoxam in the African honeybee (*Apis mellifera intermissa*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *257*, 109334. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109334>
- Bendjedid, H., & Achou M. (2014). Etude de la diversité morphométrique de deux populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) du sud algérien. *Synthèse*, *28*, 84-95.
- Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S. C., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., & Antonicelli, F. (2016). Ethanolic Extract of Algerian Propolis and Galangin Decreased Murine Melanoma Tumor Progression in Mice. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *16*(9), 1172-1183. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160211124459>
- Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., & Kaul, S. C. (2021). Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. *Nutrients*, *13*(8), 2528.

<https://doi.org/10.3390/nu13082528>

- Boik, J. (2001). Natural compounds in cancer therapy : Promising nontoxic antitumor agents from plants and other natural sources. Oregon Medical Press.
- Bommareddy, A., Knapp, K., Nemeth, A., Steigerwalt, J., Landis, T., Vanwert, A. L., Gorijavolu, H. P., & Dwivedi, C. (2018). Alpha-Santalol, a Component of Sandalwood Oil Inhibits Migration of Breast Cancer Cells by Targeting the β -catenin Pathway. *Anticancer Research*, 38(8), 4475-4480. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12750>
- Borawska, M. H., Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S. K., Moskwa, J., Bartosiuk, E., Socha, K., Surazyński, A., Kochanowicz, J., & Mariak, Z. (2014). The Interaction of Bee Products With Temozolomide in Human Diffuse Astrocytoma, Glioblastoma Multiforme and Astroglia Cell Lines. *Nutrition and Cancer*, 66(7), 1247-1256. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.951735>
- Boudreau, L. H., Maillet, J., LeBlanc, L. M., Jean-François, J., Touaibia, M., Flamand, N., & Surette, M. E. (2012). Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Amide Analogue Are Potent Inhibitors of Leukotriene Biosynthesis in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *PLoS ONE*, 7(2), e31833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031833>
- Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Nève, J., Van Antwerpen, P., & Riazi, A. (2016). Antimicrobial effects of six Algerian propolis extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(12), 2613-2620. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13247>
- Böyum, A. (1968). A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, 97, 51-76.
- Buttel-Reepen, H. (1906). Beitrage zur Systematik, Biologie, sowie zur geschichtlichen und geographischen Verbreitung der Honigbiene (*Apis mellifica* L.), ihrer Varietäten und der übrigen Apis-Arten. *Apistica*, 3, 117-201.
- Buttstedt, A., Mureşan, C. I., Lilie, H., Hause, G., Ihling, C. H., Schulze, S.-H., Pietzsch, M., & Moritz, R. F. A. (2018). How Honeybees Defy Gravity with Royal Jelly to Raise Queens. *Current Biology*, 28(7), 1095-1100.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.022>
- Caron, D.M. (1999). Honey bee biology and beekeeping. In *Wicwas Press* (p. 355).
- Celińska-Janowicz, K., Zaręba, I., Lazarek, U., Teul, J., Tomczyk, M., Pałka, J., & Milytk, W. (2018). Constituents of Propolis : Chrysin, Caffeic Acid, p-Coumaric Acid, and Ferulic Acid Induce PRODH/POX-Dependent Apoptosis in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell (CAL-27). *Frontiers in Pharmacology*, 9, 336. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00336>
- Chahbar, N., Muñoz, I., Dall'Olio, R., De La Rúa, P., Serrano, J., & Doumandji, S. (2013). Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and

- anthropogenic factors. *Journal of Insect Conservation*, 17(2), 385-392.
<https://doi.org/10.1007/s10841-012-9520-1>
- Chen, Y.-F., Wang, K., Zhang, Y.-Z., Zheng, Y.-F., & Hu, F.-L. (2016). In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Three Fatty Acids from Royal Jelly. *Mediators of Inflammation*, 2016, 3583684. <https://doi.org/10.1155/2016/3583684>
- Cheung, K.-W., Sze, D. M.-Y., Chan, W. K., Deng, R.-X., Tu, W., & Chan, G. C.-F. (2011). Brazilian green propolis and its constituent, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4 T cells expansion and activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 463-471. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.031>
- CLSI. (2012). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. In *CLSI 10 Journal of Food Quality Document M02-A11*, Clinical and Laboratory Standards Institute (Approved Standard—Eleventh Edition).
- Collazo, N., Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Otero, P., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly : Food of the Queens. *Nutrients*, 13(2), 543. <https://doi.org/10.3390/nu13020543>
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., & Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>
- Cornman, R. S., Tarpy, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., vanEngelsdorp, D., & Evans, J. D. (2012). Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE*, 7(8), e43562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>
- Cragg, G.M., & Newman, D.J. (2006). Anticancer Drug Discovery and Development from Natural Products. In *In Bioactive natural products : Direction, isolation and structure determination* (CRC Press/ Taylor and Francis, p. 323-370).
- 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. D. O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15(6), 964-970. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000600026>
- Da Cruz Almeida, E. T., Da Silva, M. C. D., Oliveira, J. M. D. S., Kamiya, R. U., Arruda, R. E. dos S., Vieira, D. A., Silva, V. da C., Escodro, P. B., Basílio-Júnior, I. D., & Do Nascimento, T. G. (2017). Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(5), 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.03.004>
- Damiani, N., Maggi, M. D., Gende, L. B., Faverin, C., Eguaras, M. J., & Marcangeli, J. A. (2010). Evaluation of the toxicity of a propolis extract on *Varroa destructor* (Acari : Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research*, 49(3), 257-264. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.3.05>

- Damiani, N., Porrini, M. P., Lancia, J. P., Álvarez, E., Garrido, P. M., Domínguez, E., Gende, L. B., & Eguaras, M. J. (2017). Effect of Propolis Oral Intake on Physiological Condition of Young Worker Honey Bees, *Apis Mellifera L.* *Journal of Apicultural Science*, *61*(2), 193-202. <https://doi.org/10.1515/jas-2017-0023>
- Dantas, A. P., Olivieri, B. P., Gomes, F. H. M., & De Castro, S. L. (2006). Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology*, *103*(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.018>
- Dantas Silva, R. P., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., Carvalho, A. A., Padilha, F. F., Barbosa, J. D. V., & Umsza-Guez, M. A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLOS ONE*, *12*(3), e0172585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>
- De Groot, A. C. (2013). Propolis : A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects. *Dermatitis*, *24*(6), 263-282. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000011>
- Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. D. A., Rebouças Silva, J., Da Silva, D. F., Da Rocha, J. L. C., Brandão, H. N., Borges, V. M., & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLOS ONE*, *13*(12), e0207676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676>
- Ding, Q., Sheikh, A. R., Gu, X., Li, J., Xia, K., Sun, N., Wu, R. A., Luo, L., Zhang, Y., & Ma, H. (2021). Chinese Propolis : Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison. *Food Science & Nutrition*, *9*(1), 313-330. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1997>
- Doğan, H., Silici, S., & Ozcimen, A. A. (2020). Biological Effects of Propolis on Cancer. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, *8*(3), 573-579. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i3.573-579.2939>
- Doiron, J., Boudreau, L. H., Picot, N., Villebonet, B., Surette, M. E., & Touaibia, M. (2009). Synthesis and 5-lipoxygenase inhibitory activity of new cinnamoyl and caffeoylclusters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *19*(4), 1118-1121. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.108>
- Dos Santos, L., Hochheim, S., Boeder, A. M., Kroger, A., Tomazzoli, M. M., Dal Pai Neto, R., Maraschin, M., Guedes, A., & De Cordova, C. M. M. (2017). Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of propolis extracts and isolated compounds from the Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. *Journal of Apicultural Research*, *56*(5), 543-558. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1371535>
- Drescher, N., Klein, A.-M., Neumann, P., Yañez, O., & Leonhardt, S. (2017). Inside Honeybee

- Hives : Impact of Natural Propolis on the Ectoparasitic Mite *Varroa destructor* and Viruses. *Insects*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.3390/insects8010015>
- Dundar, A. N., Cinar, A., Altuntas, S., Ulubayram, N., Taner, G., Dagdelen, A. F., Demircan, H., & Oral, R. A. (2022). The role of microencapsulation in maintaining biological activity of royal jelly : Comparison with biological activity and bioaccessibility of microencapsulated, fresh and lyophilized forms during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(12), 5502-5511. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11905>
- El Menyiy, N., Bakour, M., El Ghouizi, A., El Guendouz, S., & Lyoussi, B. (2021). Influence of Geographic Origin and Plant Source on Physicochemical Properties, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of Moroccan Propolis. *International Journal of Food Science*, 2021, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2021/5570224>
- El-Guendouz, S., Machado, A. M., Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M. G., Mateus, M. C., & Figueiredo, A. C. (2020). Chemical Characterization and Biological Properties of Royal Jelly Samples From the Mediterranean Area. *Natural Product Communications*, 15(2), 1934578X2090808. <https://doi.org/10.1177/1934578X20908080>
- Espíndola, K. M. M., Ferreira, R. G., Narvaez, L. E. M., Silva Rosario, A. C. R., Da Silva, A. H. M., Silva, A. G. B., Vieira, A. P. O., & Monteiro, M. C. (2019). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9, 541. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. -L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Falcão, 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. <https://doi.org/10.1002/ptr.5013>
- Ferioli, F., Marcazzan, G. L., & Caboni, M. F. (2007). Determination of (E)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly : A comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*, 30(7), 1061-1069. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600416>
- Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Botelho, C., Santos, J., Ramos, C., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2020). Unravelling the Biological Potential of *Pinus pinaster* Bark Extracts. *Antioxidants*, 9(4), 334. <https://doi.org/10.3390/antiox9040334>
- Fidalgo, L. M., Ramos, I. S., Parra, M. G., Cuesta-Rubio, O., Hernández, I. M., Fernández, M. C., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2011). Activity of Cuban Propolis Extracts on *Leishmania Amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Natural Product Communications*, 6(7), 1934578X1100600. <https://doi.org/10.1177/1934578X1100600712>

- Filipič, B., Gradišnik, L., Rihar, K., Šooš, E., Pereyra, A., & Potokar, J. (2015). The influence of royal jelly and human interferon-alpha (HuIFN- α N3) on proliferation, glutathione level and lipid peroxidation in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro / Vpliv matičnega mlečka in humanega interferona-alfa (HuIFN- α N3) na proliferacijo, nivo glutationa in na preoksidacijo lipidov v humanih kolorektalnih adenokarcinomskih celicah in vitro. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(4), 269-274. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2632>
- Fonseca, S. F., Padilha, N. B., Thurow, S., Roehrs, J. A., Savegnago, L., De Souza, M. N., Fronza, M. G., Collares, T., Buss, J., Seixas, F. K., Alves, D., & Lenardão, E. J. (2017). Ultrasound-promoted copper-catalyzed synthesis of bis-arylselanyl chrysin derivatives with boosted antioxidant and anticancer activities. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 827-836. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.06.007>
- Fontana, R., Mendes, M. A., Souza, B. M. de, Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines : A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25(6), 919-928. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Forma, E., & Bryś, M. (2021). Anticancer Activity of Propolis and Its Compounds. *Nutrients*, 13(8), 2594. <https://doi.org/10.3390/nu13082594>
- Garedew, A., Lamprecht, I., Schmolz, E., & Schricker, B. (2002). The varroacidal action of propolis : A laboratory assay. *Apidologie*, 33(1), 41-50. <https://doi.org/10.1051/apido:2001006>
- Garedew, A., Schmolz, E., Schricker, B., & Lamprecht, I. (2002). Microcalorimetric toxicity investigation of propolis on *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera : Tenebrionidae). *Thermochimica Acta*, 394(1-2), 239-245. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00262-9](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00262-9)
- Gatea, F., Matei, A.O., Teodor, E.D., & Radu, G.L. (2015). Antioxidant properties and polyphenols composition of some roumanian propolis samples. *Revue Roumaine de Chimie*, 60((1)), 65-74.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F.R. (1990). The composition and plant origins of propolis : A report of work at Oxford. *Bee world*, 71(3), 107-118.
- Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, 113(1), 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.081>
- Habbi –Cherifi, A., Adjlane, N., Medjdoub-Bensaad, F., Lakhdari, O., & Haddad, N. (2021). Preliminary Trials on The Efficacy of Propolis in The Control of The *Varroa destructor* (Mesostigmata:Varroidae) Ectoparasite of The Honey Bee *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera : Apidae). *Mellifera*, 49-58.
- Haddad, N. J., Noureddine, A., Al-Shagour, B., Loucif-Ayad, W., El-Niweiri, M. A. A.,

- Anaswah, E., Hammour, W. A., El-Obeid, D., Imad, A., Shebl, M. A., Almaleky, A. S., Nasher, A., Walid, N., Bergigui, M. F., Yañez, O., & De Miranda, J. R. (2017). Distribution and variability of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*) in the Middle East and North Africa. *Insect Science*, 24(1), 103-113.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12277>
- Hashemipour, M. A., Tavakolineghad, Z., Arabzadeh, S. A. M., Iranmanesh, Z., & Nassab, S. A. H. G. (2014). Antiviral Activities of Honey, Royal Jelly, and Acyclovir Against HSV-1. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 26(2), 47-54.
- Hassan, S.E., Abou-El-Dobal, S.K., & Hegazi, A.G. (2016). Bioassay of Egyptian Propolis on *Toxocara vitulorum* Adult Worms. *World Applied Sciences Journal*, 283-289.
- Hattori, N., Nomoto, H., Fukumitsu, H., Mishima, S., & Furukawa, S. (2007). Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomedical Research*, 28(5), 261-266.
<https://doi.org/10.2220/biomedres.28.261>
- Hegazi, A., Abdou, A.M., & Abd Allah, F. (2014). Egyptian Propolis 11 : Its antimicrobial activity with comparison with different localities. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3((9)), 530-538.
- Hernández Zarate, M. S., Abraham Juárez, M. D. R., Cerón García, A., Ozuna López, C., Gutiérrez Chávez, A. J., Segoviano Garfias, J. D. J. N., & Avila Ramos, F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*, 38(2), 210-215.
<https://doi.org/10.1590/fst.29916>
- Honda, Y., Araki, Y., Hata, T., Ichihara, K., Ito, M., Tanaka, M., & Honda, S. (2015). 10-Hydroxy-2-decenoic Acid, the Major Lipid Component of Royal Jelly, Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans* through Dietary Restriction and Target of Rapamycin Signaling. *Journal of Aging Research*, 2015, 1-7.
<https://doi.org/10.1155/2015/425261>
- Hu, F., Hepburn, H. R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S. E., & Daya, S. (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.044>
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G., & Hu, F.-L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
<https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- Ibrahim, A. A. E.-M. (2014). Immunomodulatory effects of royal jelly on aorta CD3, CD68 and eNOS expression in hypercholesterolaemic rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 67(4), 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.08.006>
- Ibrahim, R. S., & El-Banna, A. A. (2021). Royal jelly fatty acids bioprofiling using TLC-MS and digital image analysis coupled with chemometrics and non-parametric regression for

- discovering efficient biomarkers against melanoma. *RSC Advances*, 11(31), 18717-18728. <https://doi.org/10.1039/D1RA00580D>
- Jamnik, P., Raspor, P., & Javornik, B. (2012). A Proteomic Approach for Investigation of Bee Products : Royal Jelly, Propolis and Honey. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 270-274.
- Johnston, J. E., Sepe, H. A., Miano, C. L., Brannan, R. G., & Alderton, A. L. (2005). Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. *Meat Science*, 70(4), 627-631. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.02.011>
- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Ż., Stojko, R., Wojtyczka, R., & Stojko, J. (2017). Comparison of Two Components of Propolis : Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Molecules*, 22(9), 1554. <https://doi.org/10.3390/molecules22091554>
- Kahraman, H. A., Tutun, H., Kaya, M. M., Usluer, M. S., Tutun, S., Yaman, C., Sevin, S., & Keyvan, E. (2022). Ethanolic extract of Turkish bee pollen and propolis : Phenolic composition, antiradical, antiproliferative and antibacterial activities. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 45-56. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2045217>
- Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., & Virtanen, V. (2012). Vitamin C Inhibits Staphylococcus aureus Growth and Enhances the Inhibitory Effect of Quercetin on Growth of Escherichia coli In Vitro. *Planta Medica*, 78(17), 1824-1830. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315388>
- Kanelis, D., Tananaki, C., Liolios, V., Dimou, M., Goras, G., Rodopoulou, M. A., Karazafiris, E., & Thrasyvoulou, A. (2015). A suggestion for royal jelly specifications / Prijedlog globalnih standarda za matičnu mliječ. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(4), 275-284. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2651>
- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., Kisa, F., Emre, H., & Turkeli, M. (2011). Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2011/981793>
- Kartal, M., Yıldız, S., Kaya, S., Kurucu, S., & Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 69-73. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00042-4)
- Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., & Macheria, K. (2017). Revisiting Greek Propolis : Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. *PLOS ONE*, 12(1), e0170077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170077>
- Katircioğlu, H., & Mercan Dogan, N. (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. *African Journal of Biotechnology*, 5,

1151-1153.

- Kędzia, B., & Hołderna-Kędzia, E. (2013). The antibiotic activity of native and European propolis. *Postępy Fitoterapii*, 2, 97-107.
- Kim, M. J., Kim, C. S., Kim, B.-H., Ro, S.-B., Lim, Y. K., Park, S.-N., Cho, E., Ko, J.-H., Kwon, S.-S., Ko, Y.-M., & Kook, J.-K. (2011). Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean. *The Journal of Microbiology*, 49(1), 161-164. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1002-8>
- Kimura, Y. (2008). Antitumor and antimetastatic actions of various natural products. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Elsevier, Vol. 34, p. 35-76).
- Koç, A. N., Silici, S., Kasap, F., Hörmet-Öz, 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. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0296>
- Kocot, J., Kiełczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., & Musik, I. (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly : Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>
- Kolaylı, S., Sahin, H., Can, Z., Yildiz, O., Malkoc, M., & Asadov, A. (2016). A Member of Complementary Medicinal Food : Anatolian Royal Jellies, Their Chemical Compositions, and Antioxidant Properties. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(4), NP43-NP48. <https://doi.org/10.1177/2156587215618832>
- Korany, M. A., Moneeb, M. S., Asaad, A. M., El-Sebakhy, N. A., & El-Banna, A. A. (2020). A Validated Stability-Indicating HPTLC Assay for Determination of 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid Content in Royal Jelly Products Using Robust Regression Methods. *Journal of Chromatographic Science*, 58(6), 520-534. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa016>
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., & Given, K. (2012). Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE*, 7(1), e29268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100(2), 526-534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.010>
- Kumari, S., Naik, P., Vishma, B. L., Salian, S. R., Devkar, R. A., Khan, S., Mutalik, S., Kalthur, G., & Adiga, S. K. (2016). Mitigating effect of Indian propolis against mitomycin C induced bone marrow toxicity. *Cytotechnology*, 68(5), 1789-1800. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9931-4>
- Laaroussi, H., Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Bakour, M., Ousaaïd, D., Teixeira, J. A., & Lyoussi, B. (2021). Unraveling the chemical composition, antioxidant, α -amylase and

- α -glucosidase inhibition of Moroccan propolis. *Food Bioscience*, 42, 101160.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101160>
- Li, J., Mottamal, M., Li, H., Liu, K., Zhu, F., Cho, Y.-Y., Sosa, C. P., Zhou, K., Bowden, G. T., Bode, A. M., & Dong, Z. (2012). Quercetin-3-methyl ether suppresses proliferation of mouse epidermal JB6 P+ cells by targeting ERKs. *Carcinogenesis*, 33(2), 459-465.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgr281>
- Liu, C., Ma, M., Zhang, J., Gui, S., Zhang, X., & Xue, S. (2017). Galangin inhibits human osteosarcoma cells growth by inducing transforming growth factor- β 1-dependent osteogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1415-1421.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.030>
- Loucif-Ayad, W., & Tahar, A. (2001). Etude biométrique de populations d'abeilles Algériennes : *Apis mellifera intermissa*. *Synthèse*, 9, 9-14.
- Loucif-Ayad, W., Achou, M., Legout, H., Alburaki, M., & Garnery, L. (2015). Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, 46(3), 392-402. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0331-0>
- Loucif-Ayad, W., Aribi, N., Smaghe, G., & Soltani, N. (2010). A scientific note on the impact of acaricides on the nutritional biochemistry of *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera : Apidae). *Apidologie*, 41(2), 135-137. <https://doi.org/10.1051/apido/2009063>
- Loucif-Ayad, W., Chefrour, A., Algharibeh, M., & Haddad, N. (2013). First detection of Deformed wing virus of honeybees in Algeria. *Phytoparasitica*, 41(4), 445-447.
<https://doi.org/10.1007/s12600-013-0307-z>
- Loucif-Ayad Wahida, Vercelli Monica, Ahmed, S. A., MenailAhmed, H., Benchaabane Samia, Piot Niels, & Smaghe Guy. (2023). Status of local honey bees in Algeria. *Naturalista sicil., S. IV, XLVII* (1), 229-231.<https://doi.org/10.5281/ZENODO.8165336>
- Madella, S., Grubbs, K., & Alburaki, M. (2020). Non-Invasive Genotyping of Honey Bee Queens *Apis mellifera* L. : Transition of the DraI mtDNA COI-COII Test to In Silico. *Insects*, 12(1), 19. <https://doi.org/10.3390/insects12010019>
- Makino, J., Ogasawara, R., Kamiya, T., Hara, H., Mitsugi, Y., Yamaguchi, E., Itoh, A., & Adachi, T. (2016). Royal Jelly Constituents Increase the Expression of Extracellular Superoxide Dismutase through Histone Acetylation in Monocytic THP-1 Cells. *Journal of Natural Products*, 79(4), 1137-1143. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00037>
- Martin, S. J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies : A modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1082-1093.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>
- Marya, C. M., Chopra, M., Oberoi, S. S., Nagpal, R., & Dhingra, C. (2015). Comparison of Antimicrobial Efficacy of Brazilian Propolis With Chlorhexidine and Sodium Fluoride Against Common Oral Pathogens : An In Vitro Study. *Jundishapur Journal of Natural*

Pharmaceutical Products, 10(2). <https://doi.org/10.17795/jjnpp-19069>

- Menail, A. H., Boutefnouchet-Bouchema, W. F., Haddad, N., Taning, C. N. T., Smagghe, G., & Loucif-Ayad, W. (2020). Effects of thiamethoxam and spinosad on the survival and hypopharyngeal glands of the African honey bee (*Apis mellifera intermissa*). *Entomologia Generalis*, 40(2), 207-215. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2020/0796>
- Menail, A. H., Piot, N., Meeus, I., Smagghe, G., & Loucif-Ayad, W. (2016). Large pathogen screening reveals first report of *Megaselia scalaris* (Diptera : Phoridae) parasitizing *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 137, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.04.007>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(96\)90129-5](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(96)90129-5)
- Miyata, Y., ScienMatsuoces, T., Araki, K., Nakamura, Y., Sagara, Y., Ohba, K., & Sakai, H. (2018). Anticancer Effects of Green Tea and the Underlying Molecular Mechanisms in Bladder Cancer. *Medicines*, 5(3), 87. <https://doi.org/10.3390/medicines5030087>
- Mokaya, H. O., Bargul, J. L., Irungu, J. W., & Lattorff, H. M. G. (2020). Bioactive constituents, *in vitro* radical scavenging and antibacterial activities of selected *Apis mellifera* honey from Kenya. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(3), 1246-1254. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14403>
- Mokaya, H. O., Njeru, L. K., & Lattorff, H. M. G. (2020). African honeybee royal jelly : Phytochemical contents, free radical scavenging activity, and physicochemical properties. *Food Bioscience*, 37, 100733. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100733>
- Moubarak, M. M., Chanouha, N., Abou Ibrahim, N., Khalife, H., & Gali-Muhtasib, H. (2021). Thymoquinone anticancer activity is enhanced when combined with royal jelly in human breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 12(5), 342-354. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i5.342>
- Muli, E. M., & Maingi, J. M. (2007). Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(3). <https://doi.org/10.1590/S1678-91992007000300008>
- Muthusamy, G., Balupillai, A., Ramasamy, K., Shanmugam, M., Gunaseelan, S., Mary, B., & Prasad, N. R. (2016). Ferulic acid reverses ABCB1-mediated paclitaxel resistance in MDR cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 786, 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.05.023>
- Nagai, T., & Inoue, R. (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*, 84(2), 181-186. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00198-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00198-5)

- Naik, R. R., Shakya, A. K., Oriquat, G. A., Katekhaye, S., Paradkar, A., Fearnley, H., & Fearnley, J. (2021). Fatty Acid Analysis, Chemical Constituents, Biological Activity and Pesticide Residues Screening in Jordanian Propolis. *Molecules*, 26(16), 5076. <https://doi.org/10.3390/molecules26165076>
- Nakaya, M., Onda, H., Sasaki, K., Yukiyoishi, A., Tachibana, H., & Yamada, K. (2007). Effect of Royal Jelly on Bisphenol A-Induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(1), 253-255. <https://doi.org/10.1271/bbb.60453>
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Ozcelik, B. Ö., & Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis : Influence of solvent. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(4), 1417-1423.
- Nascimento, A. P., Moraes, L. A. R., Ferreira, N. U., Moreno, G. de P., Uahib, F. G. M., Barizon, E. A., & Berretta, A. A. (2015). The Lyophilization Process Maintains the Chemical and Biological Characteristics of Royal Jelly. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/825068>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002: Vol. Approved Standard M7-A5 (5th edn). (s. d.).
- Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., Iahtisham-Ul-Haq, Iqra Yasmin, Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Shah, Z. A., Plygun, S., & Heydari, M. (2019). Chrysin : Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sciences*, 235, 116797. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>
- Nedji, N., & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(6), 433-437. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60601-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60601-0)
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. <https://doi.org/10.7312/nei-92038>
- Nei, M., & Tajima, F. (1981). DNA POLYMORPHISM DETECTABLE BY RESTRICTION ENDONUCLEASES. *Genetics*, 97(1), 145-163. <https://doi.org/10.1093/genetics/97.1.145>
- Noureddine, H., Hage-Sleiman, R., Wehbi, B., Fayyad-Kazan, H., Hayar, S., Traboulssi, M., Alyamani, O. A., Faour, W. H., & ElMakhour, Y. (2017). Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of Lebanese propolis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 298-307. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.067>
- Okic-Djordjevic, I., Trivanovic, D., Krstic, J., Jaukovic, A., Mojsilovic, S., Santibanez, J. F., Terzic, M., Vesovic, D., & Bugarski, D. (2013). GE132+Natural : Novel promising dietetic supplement with antiproliferative influence on prostate, colon, and breast cancer cells. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 18(2), 504-510.

- Oliveira, R. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M., & Malaspina, O. (2014). Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae). *Environmental Toxicology*, 29(10), 1122-1133. <https://doi.org/10.1002/tox.21842>
- Özkök, D., & Silici, S. (2017). Antioxidant activities of honeybee products and their mixtures. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 201-206. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0027-0>
- Page, R. E., & Peng, C. Y.-S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4-6), 695-711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)
- Paradis, E. (2010). pegas : An R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- Paradis, E., & Schliep, K. (2019). ape 5.0 : An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526-528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly : A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Patel, N. K., Jaiswal, G., & Bhutani, K. K. (2016). A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin. *Natural Product Research*, 30(18), 2017-2027. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1107556>
- Pavel, C., Al, L., Mărghitaş, Bobis, O., Dezmirean, D., Şapcaliu, A., Radoi, I., & Mădaş, M. (2011). Biological Activities of Royal Jelly -Review. *Lucrari Stiintifice : Zootehnie si Biotehnologie*, 44.
- Pavel, C. I., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Tomoş, L. I., Bonta, V., Şapcaliu, A., & Buttstedt, A. (2014). Comparison between local and commercial royal jelly—Use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 116-123. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.12>
- Pessolato, A. G. T., Martins, D. D. S., Ambrósio, C. E., Mançanares, C. A. F., & De Carvalho, A. F. (2011). Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns*, 37(7), 1192-1201. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.05.016>
- Pitchai, D., Roy, A., & Ignatius, C. (2014). In vitro evaluation of anticancer potentials of lupeol isolated from *Elephantopus scaber* L. on MCF-7 cell line. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 5(4), 179. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.143037>
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V.,

- Kalofonos, H., Sivolapenko, G., Gawel-Bęben, K., Antosiewicz, B., & Chinou, I. (2017). Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland. *Molecules*, 22(7), 1159. <https://doi.org/10.3390/molecules22071159>
- Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., & Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3), 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007>
- Premratanachai, P., & Chanchao, C. (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 337-344. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1262>
- Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*, 24(11), 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
- Rådmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., & Samuelsson, B. (2007). 5-Lipoxygenase : Regulation of expression and enzyme activity. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(7), 332-341. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.06.002>
- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly : A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>
- Ramanauskienė, K., & Inkėnienė, A. M. (2011). Propolis oil extract : Quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. *Natural Product Research*, 25(15), 1463-1468. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.529440>
- Reчек, H., Haouat, A., Hamaidia, K., Pinto, D. C. G. A., Boudiar, T., Válega, M. S. G. A., Pereira, D. M., Pereira, R. B., & Silva, A. M. S. (2023). *Inula viscosa* (L.) Aiton Ethanolic Extract Inhibits the Growth of Human AGS and A549 Cancer Cell Lines. *Chemistry & Biodiversity*, 20(3), e202200890. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200890>
- Regueira-Neto, M. D. S., Tintino, S. R., Rolón, M., Coronal, C., Vega, M. C., De Queiroz Balbino, V., & De Melo Coutinho, H. D. (2018). Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.029>
- Reis, J. H. D. O., Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. D., Andrade, L. N., Padilha, F. F., Druzian, J. I., & Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLOS ONE*, 14(7), e0219063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219063>
- Ribera, J.-M., & Oriol, A. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia in Adolescents and Young Adults. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(5), 1033-1042. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.002>

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, ... X. Xu (Éds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Riva, C., (2017). Application de la démarche de drug-design pour la conception de nouveaux médicaments vétérinaires contre le parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). (Doctoral dissertation, Normandie).
- Robichaud, P. P., Poirier, S. J., Boudreau, L. H., Doiron, J. A., Barnett, D. A., Boilard, E., & Surette, M. E. (2016). On the cellular metabolism of the click chemistry probe 19-alkyne arachidonic acid. *Journal of Lipid Research*, 57(10), 1821-1830. <https://doi.org/10.1194/jlr.M067637>
- Rufatto, L. C., Dos Santos, D. A., Marinho, F., Henriques, J. A. P., Roesch Ely, M., & Moura, S. (2017). Red propolis : Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.06.009>
- Sak, K., Lust, H., Kase, M., & Jaal, J. (2017). Cytotoxic action of methylquercetins in human lung adenocarcinoma cells. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7466>
- Salatino, A., Teixeira, É. W., Negri, G., & Message, D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 33-38. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh060>
- Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hébert, M. P. A., Joy, A. P., Mai-Thi, N.-N., Barnett, D. A., Surette, M. E., Boudreau, L. H., & Touaibia, M. (2020). Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, 25(10), 2397. <https://doi.org/10.3390/molecules25102397>
- Sawaya, A. C. H. F., Abdelnur, P. V., Eberlin, M. N., Kumazawa, S., Ahn, M.-R., Bang, K.-S., Nagaraja, N., Bankova, V. S., & Afrouzan, H. (2010). Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta*, 81(1-2), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.11.043>
- Sawaya, A. C. H. F., Barbosa Da Silva Cunha, I., & Marcucci, M. C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>
- 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(9), 1256-1263. <https://doi.org/10.1002/ptr.2480>

- Seven, İ., ŞiMşek, Ü. G., Gökçe, Z., Tatli Seven, P., Arslan, A., & Yılmaz, Ö. (2014). The effects of royal jelly on performance and fatty acid profiles of different tissues in quail (*Coturnix coturnix japonica*) reared under high stocking density. *TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES*, 38, 271-277. <https://doi.org/10.3906/vet-1303-62>
- Seyhan, M. F., Yılmaz, E., Timirci-Kahraman, Ö., Saygılı, N., Kısakesen, H. İ., Gazioğlu, S., Gören, A. C., Eronat, A. P., Begüm Ceviz, A., Öztürk, T., Yılmaz-Aydoğan, H., & Öztürk, O. (2019). Different propolis samples, phenolic content, and breast cancer cell lines : Variable cytotoxicity ranging from ineffective to potent. *IUBMB Life*, 71(5), 619-631. <https://doi.org/10.1002/iub.1996>
- Shahinozzaman, M., Basak, B., Emran, R., Rozario, P., & Obanda, D. N. (2020). Artepillin C : A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. *Fitoterapia*, 147, 104775. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104775>
- Shimizu, T., Takeshita, Y., Takamori, Y., Kai, H., Sawamura, R., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, A., Park, Y. K., Yasukawa, K., Matsuno, K., Shiraki, K., & Kurokawa, M. (2011). Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antiherpetic Efficacies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2011/976196>
- Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 813-823. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 69-73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., & Zhang, H. (2015). Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/595393>
- Szliszka, E., Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A. Z., Jaworska, D., Czuba, Z. P., & Król, W. (2013). Ethanolic Extract of Polish Propolis : Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2013/757628>
- Tagliacollo, V. A., & Orsi, R. D. O. (2011). Quality of propolis commercialized in the informal market. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 752-757. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300031>
- Tan, C. X., Chong, G. H., Hamzah, H., & Ghazali, H. M. (2018). Comparison of subcritical CO₂ and ultrasound-assisted aqueous methods with the conventional solvent method in the extraction of avocado oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 135, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.036>

- Teixeira, R. R., de Souza, A. V., Peixoto, L. G., Machado, H. L., Caixeta, D. C., Vilela, D. D., Baptista, N. B., Franci, C. R., & Espindola, F. S. (2017). Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. *Neuroscience Letters*, *655*, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.010>
- Valença, I., Morais-Santos, F., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A. M., Almeida-Aguiar, C., & Baltazar, F. (2013). Portuguese propolis disturbs glycolytic metabolism of human colorectal cancer in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(1), 184. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-184>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D. R., & Pettis, J. S. (2009). Colony Collapse Disorder : A Descriptive Study. *PLoS ONE*, *4*(8), e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- vanEngelsdorp, D., & Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S80-S95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>
- Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujungiev, A., & Marcucci, M. C. (2000). Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, *71*(6), 693-696. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00213-6)
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*, *73*(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (2013). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, *54*(3), 134-139. <https://doi.org/10.2144/000114018>
- Wang, W., Zheng, L., Xu, L., Tu, J., & Gu, X. (2020). Pinocembrin mitigates depressive-like behaviors induced by chronic unpredictable mild stress through ameliorating neuroinflammation and apoptosis. *Molecular Medicine*, *26*(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00179-x>
- Wilson, M. B., Brinkman, D., Spivak, M., Gardner, G., & Cohen, J. D. (2015). Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *124*, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.005>
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity : Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, *54*(10-11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2014). Antibacterial Activities of Flavonoids : Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, *22*(1),

132-149. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>

- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., & Li, X. (2011). Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. *Molecules*, *16*(4), 3444-3455. <https://doi.org/10.3390/molecules16043444>
- Yangi, B., Cengiz Ustuner, M., Dincer, M., Ozbayer, C., Tekin, N., Ustuner, D., Colak, E., Kolac, U. K., & Entok, E. (2018). Propolis Protects Endotoxin Induced Acute Lung and Liver Inflammation Through Attenuating Inflammatory Responses and Oxidative Stress. *Journal of Medicinal Food*, *21*(11), 1096-1105. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0151>
- Yildirim, A., Duran, G. G., Duran, N., Jenedi, K., Bolgul, B. S., Miraloglu, M., & Muz, M. (2016). Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Medical Science Monitor*, *22*, 422-430. <https://doi.org/10.12659/MSM.897282>
- Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J.-M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts : Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>
- Zhang, S., Shao, Q., Geng, H., & Su, S. (2017). The effect of royal jelly on the growth of breast cancer in mice. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7078>
- Zhang, X., Lin, D., Jiang, R., Li, H., Wan, J., & Li, H. (2016). Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncology Reports*, *36*(1), 271-278. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4804>
- Zhao, Y., Li, Z., Tian, W., Fang, X., Su, S., & Peng, W. (2016). Differential volatile organic compounds in royal jelly associated with different nectar plants. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(5), 1157-1165. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61274-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61274-6)
- Zheng, Y.-Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D.-F., Guo, R., & Lai, R.-C. (2017). Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis : A Theoretical Study. *Scientific Reports*, *7*(1), 7543. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08024-8>
- Zulhendri, F., Felitti, R., Fearnley, J., & Ravalía, M. (2021). The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine : A review. *Journal of Oral Biosciences*, *63*(1), 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.01.001>

Résumés

RESUME

Les abeilles domestiques *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) sont importantes et contribuent grandement aux domaines agronomique, écologique, économique et thérapeutique. Elles produisent une large gamme de produits naturels dont la propolis et la gelée royale riches en molécules bioactives. L'objectif de cette étude est de valoriser la propolis et la gelée royale, des deux sous-espèces d'abeilles autochtones *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis* dans trois stations de fécondation contrôlée des reines d'abeilles en Algérie (Annaba, Médéa et Ghardaïa), en se basant sur la caractérisation et la détermination des activités biologiques et thérapeutiques de ces produits afin de renforcer la mise en place de conservatoires d'abeilles pour la protection du cheptel apicole local.

L'analyse génétique des abeilles a été faite à l'aide du test in-silico DraI mtDNA COI-COII. Une première caractérisation de la propolis et de la gelée royale fraîche et lyophilisée a été réalisée en mesurant leurs teneurs en composés phénoliques totaux. La caractérisation chimique a été faite par LC-MS/MS pour la propolis et la détection de l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA) par HPLC pour la gelée royale. Les capacités antiradicalaires et antioxydantes des échantillons de la propolis et de la gelée royale ont été évaluées par le test de DPPH et de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique. L'apoptose et l'activité antiprolifératrice de ces deux produits contre les lignées cellulaires cancéreuses Jurkat et Reh ont été évaluées, respectivement, par la cytométrie en flux et par l'essai de viabilité cellulaire. L'activité anti-inflammatoire de ces produits a été évaluée par l'inhibition de la biosynthèse des produits de la 5-lipoxygénase (5-LO). Finalement, l'activité antibactérienne de la propolis à l'égard de plusieurs souches bactériennes référencées ainsi que son effet acaricide contre l'acarien de l'abeille (*Varroa destructor*) ont été évalués.

Les abeilles ont été identifiées en tant que sous-espèces autochtones appartenant à la lignée africaine A. Plus de 20 composés ont été identifiés dans les extraits propolis. Le dosage des teneurs en composés phénoliques a montré que les extraits de propolis sont riches en polyphénols et en flavonoïdes totaux. Cette richesse pourrait expliquer la forte activité de piégeage des radicaux libres ainsi que l'activité antioxydante. Tous les extraits de propolis,

même à faibles concentrations, sont cytotoxiques et pro-apoptotiques à l'encontre des lignées cellulaires leucémiques humaines et présentent une forte activité anti-inflammatoire en inhibant la biosynthèse de la 5-lipoxygénase. Aussi, ces extraits ont montré une activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de la croissance plus élevés à l'égard des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) comparativement aux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Finalement, les extraits de propolis à 10 % ont conduit à une mortalité des acariens *V. destructor* sans atteinte à la survie des abeilles ce qui pourrait constituer une alternative pratique pour les apiculteurs locaux afin de contrôler les infestations de ces ectoparasites. D'autre part, les résultats ont montré la présence de composés phénoliques et de l'acide gras 10-HDA dans tous les échantillons de gelée royale fraîche et lyophilisée, ce qui renforce la qualité de la gelée royale et ses activités antiradicalaires et antioxydantes. Cependant, les échantillons de gelée royale n'ont pas montré une activité antitumorale contre les lignées de cellules cancéreuses Jurkat et Reh et sont sans effet notable sur l'inhibition de la biosynthèse de la 5-LO.

Mots clés : *Apis mellifera*, Propolis, Gelée royale, Activités biologiques.

ABSTRACT

Honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) are important and contribute greatly to the agronomic, ecological, economic and therapeutic fields. They produce a wide range of natural products, including propolis and royal jelly, rich in bioactive molecules. The aim of this study is to enhance the value of propolis and royal jelly harvested by the two native bee subspecies *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis* at three controlled queen bee fertilization stations in Algeria (Annaba, Medea and Ghardaia), based on the characterization and determination of the biological and therapeutic activities of these products, in order to reinforce the establishment of bee conservatories for the protection of the local bee populations.

Genetic analysis of the honey bees was carried out using the DraI mtDNA COI-COII in-silico test. An initial characterization of propolis and fresh and lyophilized royal jelly was carried out by measuring their total phenolic and flavonoid content. Chemical characterization was investigated by LC-MS/MS for propolis and detection of 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) by HPLC for royal jelly. The antiradical and antioxidant activities of the propolis and royal jelly samples were assessed by DPPH and linoleic acid oxidation inhibition assays. The apoptosis and anti-proliferative activity of these two products against Jurkat and Reh cancer cell lines were assessed by flow cytometry and cell viability assay, respectively. The anti-inflammatory activity of these products was assessed by inhibition of the biosynthesis of cellular 5-lipoxygenase (5-LO) products. Finally, the antibacterial activity of propolis against several referenced bacterial strains and its acaricidal effect against the bee mite (*Varroa destructor*) were evaluated.

The bees were identified as local subspecies belonging to the African A lineage. Over 20 compounds were identified in propolis extracts. The propolis extracts are rich in phenolic and flavonoid compounds. This richness could explain their strong free radical scavenging and antioxidant activity. All propolis extracts, even at low concentrations, are cytotoxic and pro-apoptotic against human leukemia cell lines, and display strong anti-inflammatory activity by inhibiting the 5-lipoxygenase products biosynthesis. Also, these extracts showed antibacterial activity with higher inhibition diameters towards Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) compared to Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Finally, the propolis extracts at concentration 10% led to the mortality of *V. destructor* mites without affecting bee survival, which could constitute a

practical alternative for local beekeepers to control infestations of these mites. On the other hand, the results also showed the presence of phenolic compounds and the fatty acid 10-HDA in all fresh and lyophilized royal jelly samples, reinforcing the quality of royal jelly and its antiradical and antioxidant activities. However, the royal jelly samples showed no anti-tumor activity against Jurkat and Reh cancer cell lines, and no significant effect on inhibition of 5-LO biosynthesis.

Keywords: *Apis mellifera*, Propolis, Royal jelly, biological activities.

المخلص

نحل العسل (*Apis mellifera* (Hymenoptera; Apidae) مهم ويساهم بشكل كبير في المجالات الزراعية والبيئية والاقتصادية والعلاجية. النحل ينتج مجموعة واسعة من المنتجات الطبيعية بما في ذلك العكبر وغذاء ملكات النحل الغني بالمكونات النشطة بيولوجياً. الهدف من هذه الدراسة هو تمييز العكبر وغذاء ملكات النحل، الذي يجمعه نوعان من النحل المحلي *Apis mellifera intermissa* و *Apis mellifera sahariensis* في ثلاث محطات للتخصيب المتحكم فيه لملكات النحل في الجزائر (عنابة، المدية وگرداية)، استناداً إلى توصيف المكونات وتحديد الأنشطة البيولوجية والعلاجية لهذه المنتجات من أجل تعزيز إنشاء محميات تربية النحل المحلي.

تم إجراء التحليل الوراثي للنحل باستخدام مقايسة mtDNA COI-COII. تم إجراء أول توصيف للعكبر وغذاء ملكات النحل عن طريق قياس إجمالي محتوياتهما من المركبات الفينولية. تم إجراء التوصيف الكيميائي بواسطة LC/MS للعكبر والكشف عن حمض 10-هيدروكسي-2-ديسينوبيك (HDA-10) بواسطة HPLC للغذاء الملكي. تم تقييم القدرات المضادة للجذور ومضادات الأكسدة لعينات العكبر والغذاء الملكي بواسطة اختبار تثبيط أكسدة حمض اللينوليك و DPPH. تم تقييم موت الخلايا المبرمج والنشاط المضاد للتكاثر لهذين المنتجين ضد نوعين من الخلايا السرطانية Reh و Jurkat عن طريق قياس التدفق الخلوي ومقايسة صلاحية الخلية. تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات لهذه المنتجات عن طريق تثبيط التخليق الحيوي للمنتجات الخلوية لـ 5-لييوكسيناز (LO-5). أخيراً، تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للعكبر ضد العديد من السلالات البكتيرية بالإضافة إلى تأثيره كمبيد حيوي ضد عث النحل (*Varroa destructor*).

تم التعرف على النحل على أنه نوع فرعي محلي ينتمي إلى السلالة الأفريقية A. وقد تم التعرف على أكثر من 20 مركباً في مستخلصات العكبر. أظهر تحديد محتويات المركبات الفينولية أن مستخلصات العكبر غنية بالبوليفينول والفلافونويدات. يمكن أن يفسر هذا الثراء نشاط الكسح القوي للجذور الحرة بالإضافة إلى نشاط مضادات الأكسدة. جميع مستخلصات البروبوليس، حتى بتركيزات منخفضة، سامة للخلايا ومؤيدة للاستماتة ضد خلايا سرطان المستعملة وتظهر نشاطاً قوياً مضاداً للالتهابات عن طريق تثبيط التخليق الحيوي لـ 5-لييوكسيناز. كما أظهرت هذه المستخلصات نشاطاً مضاداً للبكتيريا مع أقطار تثبيط نمو أعلى ضد البكتيريا إيجابية الغرام مقارنة بالبكتيريا سالبة الغرام.

أخيراً، أدت مستخلصات العكبر بتركيز 10% إلى موت عث الفاروا المدمر دون التأثير على حياة النحل، مما قد يشكل بديلاً فعالاً لمربي النحل المحليين للسيطرة على تفشي هذه الطفيليات الخارجية. من ناحية أخرى أظهرت النتائج أيضاً وجود المركبات الفينولية والحمض الدهني HDA-10 في جميع عينات غذاء ملكات النحل مما يعزز جودة غذاء ملكات النحل ونشاطه كمضادات المؤكسدات. ومع ذلك، لم تظهر عينات غذاء ملكات النحل نشاطاً مضاداً للورم ضد الخلايا السرطانية Reh و Jurkat ولم يكن لها أي تأثير ملحوظ على تثبيط التخليق الحيوي LO-5.

الكلمات المفتاحية: العكبر, الغذاء الملكي , الأنشطة البيولوجية , *Apis mellifera*.

Annexes

Production scientifique

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- 1- **Ayad, A.S.**, Benchaabane, S., Daas, T., Smaghe, G., Loucif-Ayad, W. (2024). Assessment of Efficacy of Algerian Propolis against the Parasitic Mite *Varroa destructor* and Safety for Honey Bees by Spray Treatment. *Insects* 15, 75. DOI: 10.3390/insects15010075. Facteur d'impact (2 ans): 3,14; Index H: 53.
- 2- **Ayad, A.S.**, Hébert, M., Doiron, J., Loucif-Ayad, W., Daas, T., Smaghe, G., Alburaki, M., Barnett, D.A., Touaibia, M., & Marc Surette, M. (2024). Algerian propolis from distinct geographical locations: chemical profiles, antioxidant capacity, cytotoxicity and inhibition of 5- lipoxygenase product biosynthesis. *Chemistry and Biodiversity*, e202301758. DOI: 10.1002/cbdv.202301758. Facteur d'impact (2 ans): 2,74; Index H: 79.
- 3- Loucif-Ayad Wahida, Vercelli Monica, **Ayad Ahmed Sabri.**, Menail Ahmed Hichem, Benchaabane Samia, Piot Niels, & Smaghe Guy (2023). Status of local honey bees in Algeria. *Naturalista sicil.*, S. IV, XLVII (1), 229-231.<https://doi.org/10.5281/ZENODO.8165336>
- 4- Benchaâbane, S., **Ayad, A. S.**, Loucif-Ayad, W., & Soltani, N. (2022). Multibiomarker responses after exposure to a sublethal concentration of thiamethoxam in the African honeybee (*Apis mellifera intermissa*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 257, 109334. DOI:10.1016/j.cbpc.2022.109334. Facteur d'impact (2 ans): 4,52; Index H: 117.

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

- 1- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Machreki Y., Ben Mansour H., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. Antibacterial activity of Algerian propolis against multidrug-resistant bacteria. 1st Tunisian-Algerian International Scientific Congress (Valorization of Natural Resources and Biomonitoring ‘ 1st SISTA-VRNB’, Monastir- Tunisie, 20-22 Décembre 2023.
- 2- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. The varroacidal action of Algerian propolis. The 1st International Webinar of Animal Biodiversity, Protection and Environment " WIBAPE2022 ", Alger, 26-27 mai 2022.
- 3- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. Propolis as a natural acaricidal against the ectoparasite of honey bees *Varroa destructor*. The 5th International Conference on Life and Engineering Sciences, Antalya-TURKEY, 19-22 mai 2022.
- 4- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. The antibacterial effect of the Algerian propolis. The International Online Conference on Valuation of Alternative Plants, Degraded & Marginal Lands, El-Oued, 10-11 mai 2022.

COMMUNICATIONS NATIONALES




- 1- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. Valorization of propolis as therapeutic product. National Doctoral Days “Applied Sciences and Innovation”, Annaba, 15-16 Novembre 2023.
- 2- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. Biological valorization of the Algerian Propolis. 1er Séminaire National sur la Valorisation des Ressources Naturelles et de l’Environnement (VRNE), Sétif, 30 mars 2022.
- 3- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. Qualité de la propolis et méthodes d’extraction. La Première Journée Scientifique Nationale Phytodiversité et Valorisation, Saida, 26 mars 2022.
- 4- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smagghe G., Loucif-Ayad W. Bioactivity of propolis from different geographical origins. 1er Séminaire National sur l’Évaluation des Activités Biologiques des Plantes Médicinales et Docking Moléculaire SNABPMDM, Batna, 22 mars 2022.

- 5- **Ayad A.S.**, Benchaabane S., Daas T., Smaghe G., Loucif-Ayad W. Evaluation biologique de la propolis Algérienne. The first national Seminar on Green Chemistry and Natural Products (GCNP'22), El-Oued, 14-15 mars 2022.

**Assessment of Efficacy of Algerian Propolis
against the Parasitic Mite Varroa
destructor and Safety for Honey Bees by
Spray Treatment**

Article

Assessment of Efficacy of Algerian Propolis against the Parasitic Mite *Varroa destructor* and Safety for Honey Bees by Spray Treatment

Ahmed Sabri Ayad ¹, Samia Benchaabane ¹, Tarek Daas ¹, Guy Smagghe ^{2,3,4,*} and Wahida Loucif-Ayad ^{1,5,*}

¹ Laboratory of Applied Animal Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria; ayad_sabri@yahoo.fr (A.S.A.); tarek63daas@yahoo.fr (T.D.)

² Department of Plants and Crops, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium

³ Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China

⁴ Department of Biology, Vrije Universiteit Brussel (VUB), 1050 Brussels, Belgium

⁵ Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University, Annaba 23000, Algeria

* Correspondence: guysma9@gmail.com (G.S.); wahloucif@yahoo.fr (W.L.-A.)

Simple Summary: *Varroa destructor* is an ectoparasitic mite that affects honey bee colonies and it is considered one of the most important causes of honey bee losses. Botanical origins have emerged as natural alternative acaricides to diminish the population levels of Varroa mites. Propolis is a natural product, consisting of a complex mixture of resinous substances collected by honey bees from different plant sources. In this study, we investigated the effect of propolis, collected by native Algerian honey bees, on *V. destructor* by a spraying method. The results indicated that propolis extracts at 10% are effective in killing Varroa mites and are harmless for honey bees. Propolis extracts could be used in honey bee colonies by spraying to control Varroa mite infestations, and further investigations are required for a better understanding of the mechanism(s) of this acaricide activity.

Abstract: *Varroa destructor* is an ectoparasitic mite and is considered one of the most important causes of honey bee population loss. In the last years, substances of botanical origin have emerged as natural alternatives to diminish the mite population levels. Propolis is a natural product and is used by honey bees for multiple tasks, including protection from pathogens and parasites, and varroacidal activity of propolis extracts has been shown. In this study, we investigated the potential of propolis, collected by native Algerian honey bee subspecies (*Apis mellifera intermissa* and *A. m. sahariensis*) in different locations in Algeria and extracted by ultrasound, to control mites of *V. destructor* and tested the safety for the honey bees. The most important results were that the best propolis extracts at 10% killed 100% of the Varroa mites within 3–4 h in a Petri dish assay. In addition, when we sprayed *A. m. intermissa* bees infested with Varroa mites with a 10% concentration in a mini-hive setup, we scored a high mite mortality of 85–87% with the best propolis extracts, and importantly, there was no mortality in the bees. Our data demonstrated that propolis extracts in Algeria could be used in honey bee colonies by spraying against Varroa mite infestations, which may develop as an easy method for local beekeepers to control Varroa in their hives. Further research should investigate the mechanism of action.

Keywords: propolis; *Varroa destructor*; acaricide activity; *Apis mellifera*; spray



Citation: Ayad, A.S.; Benchaabane, S.; Daas, T.; Smagghe, G.; Loucif-Ayad, W. Assessment of Efficacy of Algerian Propolis against the Parasitic Mite *Varroa destructor* and Safety for Honey Bees by Spray Treatment. *Insects* **2024**, *15*, 75. <https://doi.org/10.3390/insects15010075>

Academic Editor: T'ai H. Roulston

Received: 12 December 2023

Revised: 11 January 2024

Accepted: 19 January 2024

Published: 22 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Honey bees are effective pollinators of multiple crops, and managed honey bees become increasingly important for the regulation of ecosystems [1]. In the past decade, beekeepers have been confronted with high levels of mortality in their colonies worldwide [2]. Several factors are associated with honey bee population decline, including a loss

of natural habitat, climate change, the use of pesticides, and diseases caused by a large spectrum of bacteria, viruses, or fungi [3–5]. The parasitic mite, *Varroa destructor* [6], plays a fundamental role in the decline of honey bees. This parasite feeds on the bee's fat body and hemolymph [7], causing a number of detrimental effects on bees at the individual level [8], and is involved in the transmission of several bee viruses [9]. Infestation with Varroa mites is generating a fatal disease epidemic within the colony and causing great economic losses to the beekeeping industry [10,11].

Various methods, including physical, biological, and chemical ones, have been applied to control the Varroa mites. Synthetic acaricides (e.g., tau-fluvalinate, flumethrin, amitraz, and coumaphos) have been the traditional way of control during the last years, but they cause lethal effects on bees, and there is a build-up of chemical residues in hive products and the development of insecticide-resistant mite populations [12,13]. New natural treatments that minimize the above hazards have been developed using organic acids (formic acid, oxalic acid, and lactic acid), essential oils (thymol, carvacrol, and menthol) [3,14,15], and propolis [16–20] because they naturally occur in bee colonies and possess significant acaricide activities [21].

Propolis is a resinous mixture collected by honey bees from tree buds, sap flows, and other botanical sources and mixed with bee secretions. It is a fundamental substance for the sealing and sterilizing of the hives to prevent the development of microbial diseases, such as bacteria, viruses, and fungi [22]. The chemical composition of propolis varies depending on many factors, including the source of the plant, and generally, it is composed of 50% resins, 30% vegetable balsams, 10% wax, 5% aromatic and essential oils, 5% pollen, and other natural products [23]. Several studies have shown the biological activities of various propolis as having anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, and antifungal properties, and these interesting properties are attributed to the presence of different compounds, such as flavonoids, phenolic compounds, aromatic acids, and terpenes, which can work alone or together [24,25]. In detail, propolis is used by honey bees for multiple tasks, including protection from pathogens and parasites, but low solubility prevents some of its active components from having a direct effect; also, varroacidal activity of propolis extracts has been shown in several papers [21–31].

The aim of this study was to investigate the acaricide activity of propolis extracts collected by the two native Algerian honey bee subspecies. *V. destructor* mites were topically treated in a Petri dish setup. In addition, we infested honey bees with Varroa mites, sprayed them with the propolis extracts in a mini-hive setup, and followed the efficacy against the mites and the safety of the honey bees. We believe that our data contribute to the use of propolis extracts by spraying honey bee colonies to control Varroa mite infestations. For instance, local beekeepers that are confronted with high levels of mortality in their colonies can be helped by this easy approach that is efficient and safe for their bees.

2. Materials and Methods

2.1. Propolis Collection and Extraction

The propolis samples (about 30 g per location) were collected with the help of beekeepers of the National Association of Professional Beekeepers from three queen breeding stations that are located in Annaba (36°54'40.8" N 7°41'46.5" E), Medea (36°14'12.9" N 2°57'22.6" E), and Ghardaia (32°44'54.5" N 4°31'10.9" E), which are in the northeast, center, and south of Algeria, respectively. The local bee subspecies present at apiaries of Annaba and Medea was *Apis mellifera intermissa*, and *Apis mellifera sahariensis* was at Ghardaia. *A. m. intermissa* is a dark honey bee with a long tongue that is prone to swarming, shows aggressive behavior, and has abundant use of propolis [9]. Also, this subspecies seems to be more susceptible to Varroa mites than other African subspecies and is more affected by these mites compared to other bee species in the rest of Africa. *A. m. sahariensis* is smaller and yellowish-reddish, has a short tongue, small hairs, and a large tomentum, and is characterized by a moderate swarming tendency, little use of propolis, and a weak

defense reaction [32]. The propolis samples were collected from plastic grills previously placed in the hives and stored in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until extraction.

For ultrasound extraction, we followed the protocol of [33]. At first, the propolis samples were crushed in a chilled mortar, sieved, and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ once powdered. Then, 5 g of powder propolis sample was added to 20 mL of 70% ethanol and placed in an ultrasound liquid processor (Sonics: Vibra-Cell VCX130 Ultrasonic Processor with Sound Abating Enclosure) for 20 min (40 W; 20% amplitude). These mixtures were kept for 24 h and then were centrifuged for 10 min at $1644\times g$. The suspensions were frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and filtered to remove waxes, and the solutions were dried under vacuum at room temperature.

2.2. Toxicity Bioassays with *Varroa Mites* and Honey Bees

In the first series of experiments, we tested the efficacy of the propolis extract against *Varroa* mites in a setup to score acute mortality in a Petri dish setup (Figure 1a), using the protocol of [26] with some slight modifications. We used *V. destructor* mites from honey bees (*A. m. intermissa*) that were not treated in the preceding 12 months. The mites were collected with a fine paintbrush and placed in a Petri dish with live honey bee larvae and pupae to prevent starvation during harvesting operations. For the topical treatment of the mites, we placed six mites on a filter paper ($3\times 3\text{ cm}$), and then we applied 200 μL of different concentrations of the propolis extracts per mite (Figure 1a). The different concentrations (w/v) of the dried propolis extract powder were prepared in 40% ethanol and consisted of 5%, 7.5%, and 10%. After the contact with the propolis for 30 s, the mites were placed in a new untreated Petri dish and scored for survival at 10, 30, and 60 min and then each hour for 7 h in total. Mortality was evaluated by gently prodding each mite with a narrow paintbrush; lack of response to consecutive stimulus was considered an indication of death. In the control, the topical treatment was performed with 200 μL of 40% ethanol alone. For each concentration, we performed three biological repetitions.

In a second experiment, we sprayed the concentration that caused 100% mite mortality in the Petri dish assay (i.e., 10%), on the *Varroa* mites, and on the honey bees (*A. m. intermissa*) they were feeding on in a mini-hive setup (Figure 2a) based on the protocol of [26] with some slight modifications. At first, we placed 10 adult female mites and 10 newly emerged bee workers together in a plastic box ($13\times 9\times 4\text{ cm}$) that was lined with filter paper on the bottom. Then, once the mites were attached to the body of the honey bee in each experimental box, we sprayed 3.4 mL of the propolis extract concentration on the paper arena (with the honey bees and mites) with a hand sprayer. The 10% concentration (w/v) of the dried propolis extract powder was prepared in 40% ethanol, as in the first experiment. For the control groups, we sprayed 10 mites and 10 bees per box with 3.4 mL of 40% ethanol. After treatment, the boxes were placed in an insect incubator in darkness at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 70% relative humidity, and we provided sugar syrup as food to the bees. The mortality of mites and honey bees was assessed after 1, 2, and 3 days by prodding each mite or honey bee with a narrow paintbrush. Lack of response to consecutive stimulus over 1 min was considered an indication of death. Per concentration, we performed three biological repetitions.

All experiments were performed in triplicate, and the data were denoted as mean \pm standard error of the mean (SEM). Survival curves of mites and honey bees were set up following the Kaplan–Meier method and compared to each other by a log-rank Mantel–Cox test. The results were analyzed with Prism 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

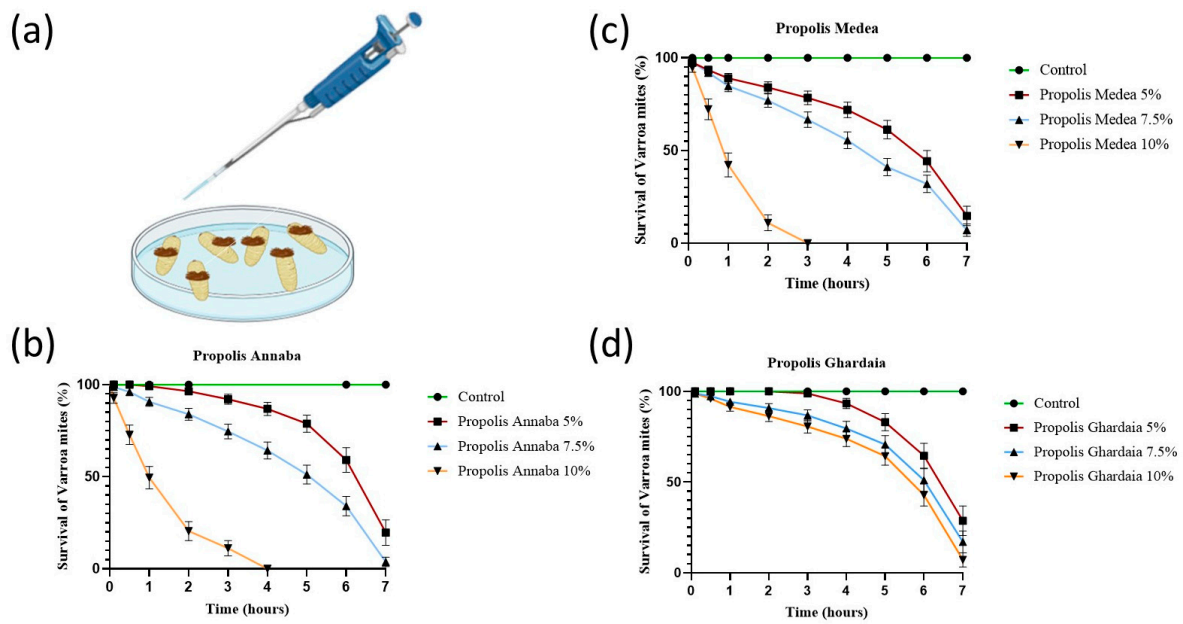


Figure 1. (a) Petri dish setup wherein *V. destructor* mites were treated by the topical method. We used *V. destructor* mites from honey bees (*A. m. intermissa*) that were not treated in the preceding 12 months. For the topical treatment of the mites, we placed 6 mites on a filter paper (3 × 3 cm), and then we applied 200 µL of different concentrations of the propolis extracts (prepared in 40% ethanol) per mite. The controls were treated with 200 µL of 40% ethanol. Survival rates of *V. destructor* after treatment with the three different Algerian propolis extracts from (b) Annaba, (c) Medea, and (d) Ghardaia at three concentrations of 5%, 7.5%, and 10% (*w/v*) by the topical method. The survival curves of Varroa mites were analyzed according to the Kaplan–Meier method and compared to each other by a log-rank Mantel–Cox test. We used 6 mites per experimental unit (*n* = 6), and the experiment was performed with 3 replicates, according to the protocol of [26].

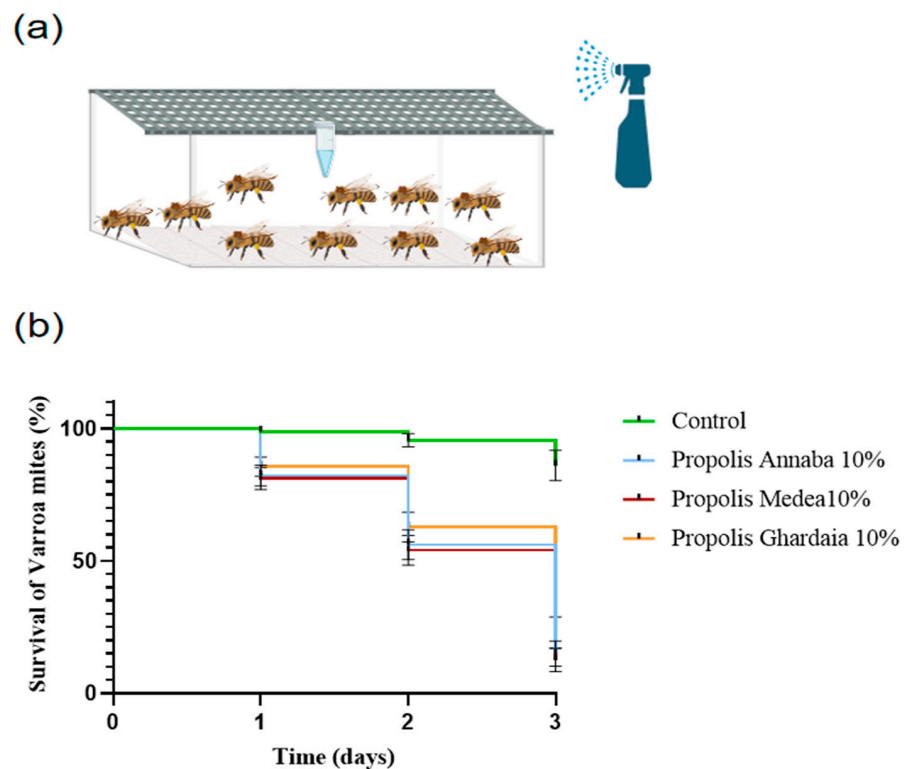


Figure 2. *Cont.*

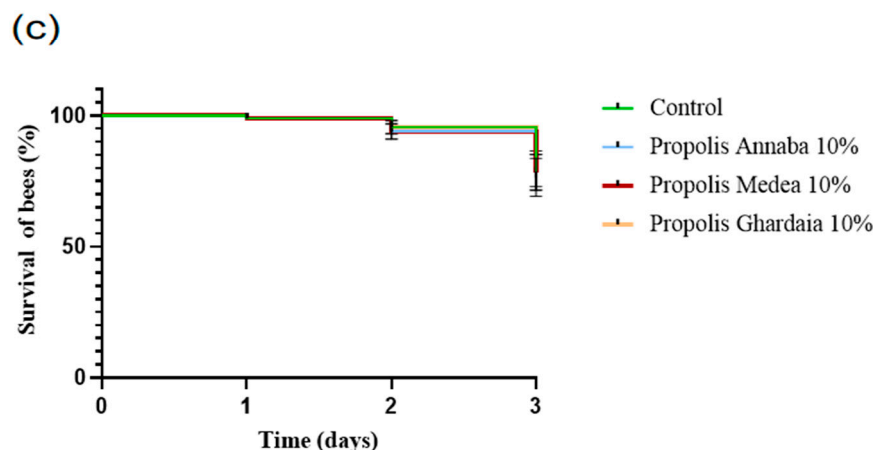


Figure 2. (a) Mini-hive setup wherein *V. destructor* mites and honey bees (*A. m. intermissa*) were treated by spraying. We placed 10 adult female mites and 10 newly emerged bee workers together in a plastic box (13 × 9 × 4 cm) that was lined with filter paper on the bottom, and a 1.5 mL Eppendorf tube provided sugar syrup to the honey bee workers. Then, once the mites were attached to the body of the honey bee in each experimental box, we sprayed 3.4 mL of the 10% propolis extract concentration (prepared in 40% ethanol) on the paper arena (with the honey bees and mites) with a hand sprayer. The controls were sprayed with 3.4 mL of 40% ethanol. Survival rates of (b) *V. destructor* and (c) honey bees (*A. m. intermissa*) after treatment with three different Algerian propolis extracts at 10% (*w/v*) by the spraying method. Data were analyzed according to the Kaplan–Meier method and compared to each other by a log-rank Mantel–Cox test. We used 10 mites and 10 bees per experimental unit ($n = 10$), and the experiment was performed with 3 replicates, according to the protocol of [26].

3. Results

Figure 1b–d present the acaricide activity of the propolis samples from three different locations and at three different concentrations against *V. destructor* in a Petri dish setup to score acute mortality. Seven hours after topical treatment of the mites, it was clear that the Varroa mites were highly susceptible to the propolis extracts, and the percentage of mites killed by the treatment ranged between 71% and 100% over the three concentrations and the three propolis samples. The survival curves showed a significant decrease for the mites after exposure to the propolis of Annaba (log-rank test: $\chi^2 = 251.8$; $p < 0.0001$), Medea ($\chi^2 = 317$; $p < 0.0001$), and Ghardaia ($\chi^2 = 39.72$; $p < 0.0001$). The mortality of mites increased with an increase in concentration. The extract concentration of 10% was very effective, killing 100% of the mites with the propolis from Annaba and Medea and 92% with the propolis from Ghardaia, but this difference was not significant ($p > 0.05$). The propolis of Medea and Annaba had the strongest acaricide activity of 100% mortality of mites after only 3–4 h ($p > 0.05$). The propolis of Ghardaia caused 92% of mites to die after 7 h ($p < 0.01$).

In the second experiment, we sprayed the best concentration of the previous assay (i.e., 10%) on the Varroa mites and the honey bees they were feeding on in a mini-hive setup. In this setup, the spraying of a 10% concentration of propolis extracts from the three locations could significantly kill the mites (log-rank test $\chi^2 = 65.65$; $p < 0.0001$). Figure 2b shows that 10% of Annaba and Medea propolis extract caused 85% and 87% mortality in the mites at 3 days after spraying compared the control ($p < 0.05$), while Ghardaia propolis results in 77% mortality, but the difference was not significant ($p > 0.05$) compared to Annaba and Medea. On the other hand, the survival curves of the honey bees (on which the mites were feeding), after the spraying with 10% propolis extracts (Figure 2c), demonstrated that there was no loss of survival compared to the control (log-rank test: $\chi^2 = 0.1002$; $p > 0.05$), confirming that the three Algerian propolis extracts at 10% are harmless to honey bees. The mortality in the control honey bees that were sprayed with 3.4 mL of 40% ethanol (with no propolis extract) was also less than 25%.

4. Discussion

In this study, we showed that propolis extracts from Algeria can be used to control Varroa mites efficiently by spraying, and it did not kill the honey bees. Our results contribute to the search and development of new alternative strategies to control Varroa mites in order to reduce the use of and the amount of synthetic acaricides in the honey bee hives. We believe that our data will be very useful for practice, particularly for local beekeepers who are confronted with high levels of mortality in their colonies and who can use this easy method of spraying that is efficient and safe for their honey bees. In addition, it should be remarked that extracts of propolis also have extra interesting benefits to the health of honey bee hives with a remarkable action against many microorganisms, such as the causative agents of chalkbrood (*Ascospheera apis*) [22] and American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) [27,28].

In our study, the spraying of Varroa mites and honey bees in a mini-hive setup with 10% Algerian propolis extract killed the Varroa mites efficiently and was harmless for the bees. At present, there is unfortunately no information available on the mode of action of the propolis extracts. Based on Garedeu et al. [34] and Hassan et al. [35], it is suggested that contact with the propolis solution could lead to a weakening of the mite's cuticle, which could facilitate entry of the active compounds present in propolis. In propolis, a wide spectrum of bioactives is reported to be present; for instance, flavonoids, phenolic compounds, aromatic acids, and terpenes, and these can act synergistically [25]. However, nothing is known so far about their mechanism to kill mites. Future investigations should unravel the mechanism(s) of the high acaricide activity. Also, it should be reported that propolis may increase the honey bee's immunity with an enhancement of its defensive response [30]. Similar results have been obtained with propolis from Germany and Argentina at a concentration of 10%, which killed 100% of Varroa mites [26,29]. The latter results, together with ours, clearly demonstrate that Varroa mites are highly susceptible to propolis and that propolis extracts cause narcosis and the death of mites after a contact treatment. The results obtained based on the contact with propolis extracts, at the concentration tested, suggest that this method should be recommended. A spray treatment is easy and practical. A treatment of propolis extract via oral intake is not recommendable since [31] found that delivering propolis via the bee syrup affected the abdominal fat bodies and the hypopharyngeal gland development of the honey bees. Also, previous research has shown that currently used acaricides and insecticides pose negative effects on honey bees of *A. m. intermissa* at the concentrations used to control Varroa mites [36–38]. Further research is required to identify the best concentration of propolis extract and frequency of treatment by spraying honey bee hives in practice.

Under normal conditions, the honey bee workers apply propolis on the walls of the beehive and the frames; however, the Varroa mites that are living in these hives are not affected, and no direct acaricide activity is detected. It is likely that propolis is insoluble in the interior of the bee hive since most active components of propolis are water-insoluble [31,39]. When propolis is extracted from an organic solvent, such as ethanol, the most biologically active components are obtained [39,40]. Also, the use of ultrasound technology enhanced the extraction of propolis compounds [33,40], generating extracts with higher biological activity [41]. Garedeu et al. [29] and Ding et al. [42] reported that a concentration of 70% was most efficient in extracting, and this finding agreed with a high lethal activity against mites. However, the authors did not score the safety of honey bees for such high ethanol concentrations. In fact, ingestion of ethanol in honey bees can cause immune suppression [43], affect appetitive learning and olfactory perception [44], and cause mortality in a dose-dependent manner [45]. In our experiments, after drying the propolis extracts, we used 40% ethanol to reduce the effect of the strong ethanol solution and after, we used it in the spraying method to treat honey bees against Varroa mites in a safe manner. More research in extraction optimization is possible.

In this study, we investigated propolis samples from three regions in Algeria. Particularly, we used propolis from Annaba, which is from Mediterranean northern Algeria and produced by *A. m. intermissa*, which is a long-tongued bee, and propolis from Medea,

which is produced by the same bee strain in a more transitional climate in the northern hills. These two regions are rich in plants and water. On the other hand, Ghardaia propolis was collected from a more southern desert region in Algeria by *A. m. sahariensis*, and the climate is dry in this region. *A. m. sahariensis* is short-tongued and adapted to the date palm (*Phoenix dactylifera*) and other Saharan flora. In parallel to this project, an LC-MS analysis of the three propolis samples [46] identified more than 20 compounds, and pinocembrin and pinobanksin-3-acetate were amongst the most abundant compounds identified in the extracts of the three locations. But, there were some differences between the extracts. Particularly, pinostrobin was more abundant in the Annaba extract than in the Medea extract, and this component was not detected in the Ghardaia propolis extract. The Ghardaia extract contained more ferulic acid compared to the other two extracts. We think that the variability between the results obtained by Algerian propolis samples, although the differences in activity were small (<20%), could be due to the difference between bee subspecies and botanical sources since previous research has demonstrated that the composition of propolis may depend on these factors [47,48]. However, future experiments with a more specific experimental design should answer these questions. In addition, we note that based on the literature, several of the identified components in the propolis samples are considered the main effective phytochemical components responsible for biological activities attributed to propolis [46,49]. As a consequence, we believe that the acaricide activity of propolis extracts is due to the bioactive components, such as phenols and flavonoids, present in propolis [19,26,50]. Future investigations should unravel the mechanism(s) behind the high acaricide activity.

5. Conclusions

In conclusion, our data do not only show that the spraying of a 10% concentration of propolis extract (made in 40% ethanol) was very efficient and could kill 100% of the Varroa mites in 3 days in a mini-hive setup but also that this spray treatment was safe for the honey bees. In turn, these findings suggest that propolis extracts from Algeria could be used in honey bee colonies by spraying to control Varroa mite infestations. But, further optimization on extraction, appropriate doses, and concentration to be administered is useful. Also, future research should unravel the mode of action of this high acaricide activity by propolis extracts.

Author Contributions: Conceptualization, W.L.-A., T.D. and G.S.; methodology, A.S.A., S.B., W.L.-A., T.D. and G.S.; investigation, A.S.A., S.B. and W.L.-A.; resources, W.L.-A. and G.S.; data curation, A.S.A., S.B., T.D. and W.L.-A.; writing—original draft preparation, A.S.A., W.L.-A., T.D. and G.S.; writing—review and editing, W.L.-A. and G.S.; supervision, W.L.-A., T.D. and G.S.; funding acquisition, W.L.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (PRFU project D01N01UN230120220003) to W.L.-A.

Data Availability Statement: Dataset available on request from the authors.

Acknowledgments: All authors are very thankful to four anonym reviewers to improve the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Potts, S.G.; Imperatriz-Fonseca, V.; Ngo, H.T.; Aizen, M.A.; Biesmeijer, J.C.; Breeze, T.D.; Dicks, L.V.; Garibaldi, L.A.; Hill, R.; Settele, J.; et al. Safeguarding Pollinators and Their Values to Human Well-Being. *Nature* **2016**, *540*, 220–229. [[CrossRef](#)]
2. van Engelsdorp, D.; Evans, J.D.; Saegerman, C.; Mullin, C.; Haubruge, E.; Nguyen, B.K.; Frazier, M.; Frazier, J.; Cox-Foster, D.; Chen, Y.; et al. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6481. [[CrossRef](#)]
3. Tutun, H.; Koç, N.; Kart, A. Plant Essential Oils Used Against Some Bee Diseases. *Turk. J. Agric. Food Sci. Technol.* **2018**, *6*, 34–45. [[CrossRef](#)]
4. Evans, J.D. Diverse Origins of Tetracycline Resistance in the Honey Bee Bacterial Pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* **2003**, *83*, 46–50. [[CrossRef](#)]

5. Shen, M.; Yang, X.; Cox-Foster, D.; Cui, L. The Role of Varroa Mites in Infections of Kashmir Bee Virus (KBV) and Deformed Wing Virus (DWW) in Honey Bees. *Virology* **2005**, *342*, 141–149. [[CrossRef](#)]
6. Anderson, D.L.; Trueman, J.W.H. Varroa Jacobsoni (Acari: Varroidae) Is More than One Species. *Exp. Appl. Acarol.* **2000**, *24*, 165–189. [[CrossRef](#)]
7. Ramsey, S.D.; Ochoa, R.; Bauchan, G.; Gulbranson, C.; Mowery, J.D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J.M.; Ellis, J.D.; et al. *Varroa destructor* Feeds Primarily on Honey Bee Fat Body Tissue and Not Hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1792–1801. [[CrossRef](#)]
8. Annoscia, D.; Del Piccolo, F.; Nazzi, F. How Does the Mite Varroa Destructor Kill the Honeybee *Apis Mellifera*? Alteration of Cuticular Hydrocarbons and Water Loss in Infested Honeybees. *J. Insect Physiol.* **2012**, *58*, 1548–1555. [[CrossRef](#)]
9. Grozinger, C.M.; Flenniken, M.L. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annu. Rev. Entomol.* **2019**, *64*, 205–226. [[CrossRef](#)]
10. Orantes-Bermejo, F.J.; Pajuelo, A.G.; Megías, M.M.; Fernández-Piñar, C.T. Pesticide Residues in Beeswax and Beebread Samples Collected from Honey Bee Colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible Implications for Bee Losses. *J. Apic. Res.* **2010**, *49*, 243–250. [[CrossRef](#)]
11. Nazzi, F.; Brown, S.P.; Annoscia, D.; Del Piccolo, F.; Di Prisco, G.; Varricchio, P.; Della Vedova, G.; Cattonaro, F.; Caprio, E.; Pennacchio, F. Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. Acaricide Residues in Some Bee Products. *J. Apic. Res.* **1998**, *37*, 57–67. [[CrossRef](#)]
13. Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B. Biology and Control of Varroa Destructor. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103*, S96–S119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Akyol, E.; YeniNar, H. Use of Oxalic Acid to Control *Varroa Destructor* in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **2009**, *33*, 285–288. [[CrossRef](#)]
15. Smodiš Škerl, M.I.; Nakrst, M.; Žvokelj, L.; Gregorc, A. The Acaricidal Effect of Flumethrin, Oxalic Acid and Amitraz against Varroa Destructor in Honey Bee (*Apis mellifera* Carnica) Colonies. *Acta Vet. Brno* **2011**, *80*, 51–56. [[CrossRef](#)]
16. Pusceddu, M.; Annoscia, D.; Floris, I.; Frizzera, D.; Zanni, V.; Angioni, A.; Satta, A.; Nazzi, F. Honeybees Use Propolis as a Natural Pesticide against Their Major Ectoparasite. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2021**, *288*, 20212101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pusceddu, M.; Floris, I.; Mura, A.; Theodorou, P.; Cirotto, G.; Piluzza, G.; Bullitta, S.; Angioni, A.; Satta, A. The Effects of Raw Propolis on Varroa-Infested Honey Bee (*Apis mellifera*) Workers. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 3527–3535. [[CrossRef](#)]
18. Bragança Castagnino, G.L.; Meana, A.; Cutuli De Simón, M.T.; Batista Pinto, L.F. Propolis and Its Effects on Bee Diseases and Pests: A Systematic Review. *J. Apic. Res.* **2023**, *62*, 171–184. [[CrossRef](#)]
19. Drescher, N.; Klein, A.-M.; Neumann, P.; Yañez, O.; Leonhardt, S. Inside Honeybee Hives: Impact of Natural Propolis on the Ectoparasitic Mite *Varroa destructor* and Viruses. *Insects* **2017**, *8*, 15. [[CrossRef](#)]
20. Hussein, M.A. Propolis impact on the honey bee life span, Varroa mite infestation and population growth of the colony. *J. Univ. Duhok* **2019**, *22*, 300–311. [[CrossRef](#)]
21. Vilarem, C.; Piou, V.; Vogelweith, F.; Vétillard, A. *Varroa destructor* from the Laboratory to the Field: Control, Biocontrol and IPM Perspectives—A Review. *Insects* **2021**, *12*, 800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Simone-Finstrom, M.; Borba, R.; Wilson, M.; Spivak, M. Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects* **2017**, *8*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rufatto, L.C.; Dos Santos, D.A.; Marinho, F.; Henriques, J.A.P.; Roesch Ely, M.; Moura, S. Red Propolis: Chemical Composition and Pharmacological Activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2017**, *7*, 591–598. [[CrossRef](#)]
24. Nedji, N.; Loucif-Ayad, W. Antimicrobial Activity of Algerian Propolis in Foodborne Pathogens and Its Quantitative Chemical Composition. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2014**, *4*, 433–437. [[CrossRef](#)]
25. Bhargava, P.; Mahanta, D.; Kaul, A.; Ishida, Y.; Terao, K.; Wadhwa, R.; Kaul, S.C. Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. *Nutrients* **2021**, *13*, 2528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Damiani, N.; Maggi, M.D.; Gende, L.B.; Faverin, C.; Eguaras, M.J.; Marcangeli, J.A. Evaluation of the Toxicity of a Propolis Extract on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *J. Apic. Res.* **2010**, *49*, 257–264. [[CrossRef](#)]
27. Bastos, E.M.A.F.; Simone, M.; Jorge, D.M.; Soares, A.E.E.; Spivak, M. In Vitro Study of the Antimicrobial Activity of Brazilian Propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* **2008**, *97*, 273–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wilson, M.B.; Brinkman, D.; Spivak, M.; Gardner, G.; Cohen, J.D. Regional Variation in Composition and Antimicrobial Activity of US Propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *124*, 44–50. [[CrossRef](#)]
29. Garedew, A.; Lamprecht, I.; Schmolz, E.; Schrickler, B. The Varroacidal Action of Propolis: A Laboratory Assay. *Apidologie* **2002**, *33*, 41–50. [[CrossRef](#)]
30. Evans, J.D.; Aronstein, K.; Chen, Y.P.; Hetru, C.; Imler, J.-L.; Jiang, H.; Kanost, M.; Thompson, G.J.; Zou, Z.; Hultmark, D. Immune Pathways and Defence Mechanisms in Honey Bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* **2006**, *15*, 645–656. [[CrossRef](#)]
31. Damiani, N.; Porrini, M.P.; Lancia, J.P.; Álvarez, E.; Garrido, P.M.; Domínguez, E.; Gende, L.B.; Eguaras, M.J. Effect of Propolis Oral Intake on Physiological Condition of Young Worker Honey Bees, *Apis mellifera* L. *J. Apic. Sci.* **2017**, *61*, 193–202. [[CrossRef](#)]
32. Ruttner, F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1988; ISBN 978-3-642-72649-1.

33. Sambou, M.; Jacques, J.-F.; Ndongou Moutombi, F.J.; Doiron, J.A.; Hébert, M.P.A.; Joy, A.P.; Mai-Thi, N.-N.; Barnett, D.A.; Surette, M.E.; Boudreau, L.H.; et al. Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules* **2020**, *25*, 2397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Garedew, A.; Schmolz, E.; Schrickler, B.; Lamprecht, I. Microcalorimetric Toxicity Investigation of Propolis on *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Thermochim. Acta* **2002**, *394*, 239–245. [[CrossRef](#)]
35. Hassan, S.E.; Abou-El-Dobal, S.K.; Hegazi, A.G. Bioassay of Egyptian Propolis on *Toxocara vitulorum* Adult Worms. *World Appl. Sci. J.* **2016**, *34*, 283–289.
36. Menail, A.H.; Boutefnouchet-Bouchema, W.F.; Haddad, N.; Taning, C.N.T.; Smagghe, G.; Loucif-Ayad, W. Effects of Thiamethoxam and Spinosad on the Survival and Hypopharyngeal Glands of the African Honey Bee (*Apis mellifera intermissa*). *Entomol. Gen.* **2020**, *40*, 207–215. [[CrossRef](#)]
37. Loucif-Ayad, W.; Aribi, N.; Smagghe, G.; Soltani, N. Comparative Effectiveness of Some Acaricides Used to Control *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Algeria. *Afr. Entomol.* **2010**, *18*, 259–266. [[CrossRef](#)]
38. Loucif-Ayad, W.; Aribi, N.; Smagghe, G.; Soltani, N. A Scientific Note on the Impact of Acaricides on the Nutritional Biochemistry of *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* **2010**, *41*, 135–137. [[CrossRef](#)]
39. 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.D.O. Factors That Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 964–970. [[CrossRef](#)]
40. Tan, C.X.; Chong, G.H.; Hamzah, H.; Ghazali, H.M. Comparison of Subcritical CO₂ and Ultrasound-Assisted Aqueous Methods with the Conventional Solvent Method in the Extraction of Avocado Oil. *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *135*, 45–51. [[CrossRef](#)]
41. Fonseca, S.F.; Padilha, N.B.; Thurow, S.; Roehrs, J.A.; Savegnago, L.; De Souza, M.N.; Fronza, M.G.; Collares, T.; Buss, J.; Seixas, F.K.; et al. Ultrasound-Promoted Copper-Catalyzed Synthesis of Bis-Arylselanyl Chrysin Derivatives with Boosted Antioxidant and Anticancer Activities. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *39*, 827–836. [[CrossRef](#)]
42. Ding, Q.; Sheikh, A.R.; Gu, X.; Li, J.; Xia, K.; Sun, N.; Wu, R.A.; Luo, L.; Zhang, Y.; Ma, H. Chinese Propolis: Ultrasound-assisted Enhanced Ethanolic Extraction, Volatile Components Analysis, Antioxidant and Antibacterial Activity Comparison. *Food Sci. Nutr.* **2021**, *9*, 313–330. [[CrossRef](#)]
43. Ptasińska, A.A.; Borsuk, G.; Mułenko, W.; Olszewski, K. Impact of Ethanol on *Nosema* spp. Infected Bees. *Med. Weter.* **2013**, *69*, 736–740.
44. Mustard, J.A.; Edgar, E.A.; Mazade, R.E.; Wu, C.; Lillvis, J.L.; Wright, G.A. Acute Ethanol Ingestion Impairs Appetitive Olfactory Learning and Odor Discrimination in the Honey Bee. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2008**, *90*, 633–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mustard, J.A.; Oquita, R.; Garza, P.; Stoker, A. Honey Bees (*Apis mellifera*) Show a Preference for the Consumption of Ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2019**, *43*, 26–35. [[CrossRef](#)]
46. Ayad, A.S.; Hébert, M.P.A.; Doiron, J.A.; Loucif-Ayad, W.; Daas, T.; Smagghe, G.; Alburaki, M.; Barnett, D.A.; Touaibia, M.; Surette, M.E. Algerian Propolis from Distinct Geographical Locations: Chemical Profiles, Antioxidant Capacity, Cytotoxicity and Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Biosynthesis. *Chem. Biodivers.* **2023**; submitted. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dantas Silva, R.P.; Machado, B.A.S.; Barreto, G.D.A.; Costa, S.S.; Andrade, L.N.; Amaral, R.G.; Carvalho, A.A.; Padilha, F.F.; Barbosa, J.D.V.; Umsza-Guez, M.A. Antioxidant, Antimicrobial, Antiparasitic, and Cytotoxic Properties of Various Brazilian Propolis Extracts. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Salatino, A.; Teixeira, É.W.; Negri, G.; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2005**, *2*, 33–38. [[CrossRef](#)]
49. Dos Santos, L.; Hochheim, S.; Boeder, A.M.; Kroger, A.; Tomazzoli, M.M.; Dal Pai Neto, R.; Maraschin, M.; Guedes, A.; De Cordova, C.M.M. Chemical Characterization, Antioxidant, Cytotoxic and Antibacterial Activity of Propolis Extracts and Isolated Compounds from the Brazilian Stingless Bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. *J. Apic. Res.* **2017**, *56*, 543–558. [[CrossRef](#)]
50. Habbi-Cherifi, A.; Adjlane, N.; Medjdoub-Bensaad, F.; Lakhdari, O.; Haddad, N. Preliminary Trials on The Efficacy of Propolis in The Control of The *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) Ectoparasite of The Honey Bee *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae). *Mellifera* **2021**, *21*, 49–58.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**Algerian propolis from distinct
geographical locations: chemical profiles,
antioxidant capacity, cytotoxicity and
inhibition of 5-lipoxygenase product
biosynthesis**

Algerian Propolis from Distinct Geographical Locations: Chemical Profiles, Antioxidant Capacity, Cytotoxicity and Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Biosynthesis

Ahmed Sabri Ayad,^[a] Mathieu P. A. Hébert,^[b, c] Jérémie A. Doiron,^[b, c] Wahida Loucif-Ayad,^[d] Tarek Daas,^[a] Guy Smagghe,^[e, f, g] Mohamed Alburaki,^[h] David A. Barnett,^[b, i] Mohamed Touaibia,^[c] and Marc E. Surette^{*[b, c]}

Propolis was collected from honeybee hives in three geographically distinct Algerian climates and extracts were characterized for composition and bioactivity. Bees were identified as native subspecies using an *in-silico* Dral mtDNA COI-COII test. Over 20 compounds were identified in extracts by LC-MS. Extracts from the Medea region were more enriched in phenolic content (302 ± 28 mg GAE/g of dry extract) than those from Annaba and Ghardaia regions. Annaba extracts had the highest flavonoid content (1870 ± 385 mg QCE/g of dry extract). Medea extracts presented the highest free-radical scavenging activity ($IC_{50} = 13.5$ μ g/mL) using the DPPH radical assay while Ghardaia

extracts from the desert region were weak ($IC_{50} > 100$ μ g/mL). Antioxidant activities measured using AAPH oxidation of linoleic acid were similar in all extracts with IC_{50} values ranging from 2.9 to 4.9 μ g/mL. All extracts were cytotoxic (MTT assay) and proapoptotic (Annexin-V) against human leukemia cell lines in the low μ g/mL range, although the Annaba extract was less active against the Reh cell line. Extracts inhibited cellular 5-lipoxygenase product biosynthesis with IC_{50} values ranging from 0.6 to 3.2 μ g/mL. Overall, examined propolis extracts exhibited significant biological activity that warrant further characterization in cellular and *in vivo* models.

Introduction

Propolis is a complex mixture formed by resinous and balsamic material originating from various parts of plants that is collected by honey bees and mixed with their saliva.^[1,2] It is used by honey bees as a protective barrier in order to seal the beehive against unfavorable weather conditions,^[3] to sterilize the hive to prevent the proliferation of invading microorganisms and to shut off pathogens and predators.^[4,5] Propolis is composed of 50% resins, 30% vegetable balsams, 10% wax, 5% aromatic and essential oils, 5% pollen and other constituents including the derivatives of phenolic acids, amino acids and flavonoids.^[6,7] The chemical composition of propolis depends on the source of the plants, the geographical location,^[8] the bee subspecies,^[9] the season of the year and the time of collection.^[10] Propolis exhibits a large spectrum of biological activities including antibacterial,^[11] anti-fungal,^[9] immunomodulatory,^[12] antiviral^[13] and antiparasitic properties,^[14] as well as antioxidant,^[15,16] anti-inflammatory^[15,17] and anticancer activity.^[18,19] Flavonoids and phenolic compounds are the most bioactive classes of molecules present in propolis.

During the last decade, beekeeping activity in Algeria has grown considerably with a remarkable interest in hive products, such as propolis, and two endemic honey bee subspecies belonging to the African lineage A have been recorded: *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*.^[20,21] Although the importation of honey bees is prohibited by Algerian law, a weak introgression among the local honey bees has been detected, most likely due to the illegal importation of foreign queens by some beekeepers, which so far has not lead to major impacts on the genetic diversity of the native honey bee

[a] A. S. Ayad, Prof. Dr. T. Daas
Laboratory of Applied Animal Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, 2300 Annaba, Algeria

[b] M. P. A. Hébert, J. A. Doiron, Dr. D. A. Barnett, Prof. Dr. M. E. Surette
New Brunswick Centre for Precision Medicine, Moncton, NB, E1A 3E9, Canada
E-mail: marc.surette@umoncton.ca

[c] M. P. A. Hébert, J. A. Doiron, Prof. Dr. M. Touaibia, Prof. Dr. M. E. Surette
Department of Chemistry and Biochemistry, Université de Moncton, Moncton, NB, E1A 3E9, Canada

[d] Prof. Dr. W. Loucif-Ayad
Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University, 23000 Annaba, Algeria

[e] Prof. Dr. G. Smagghe
Ghent University, 9000 Ghent Belgium

[f] Prof. Dr. G. Smagghe
Institute of Entomology, Guizhou University, 550025 Guiyang, China

[g] Prof. Dr. G. Smagghe
Department of Biology, Vrije Universiteit Brussel (VUB), 1050 Brussels, Belgium

[h] M. Alburaki
Bee Research Laboratory, United States Department of Agriculture, 20705 Beltsville, MD, United States

[i] Dr. D. A. Barnett
Atlantic Cancer Research Institute, Moncton, NB, E1C 8X3, Canada

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301758>

© 2024 The Authors. Chemistry & Biodiversity published by Wiley-VHCA AG. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

populations.^[20] The conservation of these two native subspecies should be a priority given that they possess important desired genetic attributes such as adaptation to local environment and resistance to local biotic and abiotic stressors. Therefore, queen breeding stations in Algeria were created to provide beekeepers with locally mated and adapted queens based on their needs.

Considering the various applications of propolis and its increased use, the objectives of this study were first to evaluate the genetic status of the honey bee populations located in the three current queen breeding stations in Algeria, and to evaluate the composition and antioxidant properties of extracts of the propolis collected by the two native Algerian honey bee subspecies within the breeding stations located in distinct geographical locations having diverse climates. Additional objectives were to test the pro-apoptotic and anti-proliferative activities of the propolis extracts against human acute lymphocytic leukemia cell lines, as well as the potential anti-inflammatory properties of the propolis extracts in an established cellular 5-lipoxygenase assay.

Results

Subspecies identification

Based on the Dral mtDNA (mitochondrial DNA) COI-COII Test conducted *in silico*, samples of honey bee workers collected from breeding stations were the native subspecies of Algeria (*A. m. intermissa* and *A. m. sahariensis*). A total of 17 haplotypes at various frequencies belonged to the African lineage (A). Overall, the honey bee populations of the breeding stations exhibited a high haplotype diversity of 0.908 with significant Tajima's P-value (Figure 1). Among 17 identified haplotypes, 14 were novel haplotypes never recorded before and 3 were classic haplotypes previously reported in the African lineage A (Table 1). Novel haplotypes were named according to the nomenclature proposed in.^[22] The three most dominant haplotypes were A9-828-2-DZA (24%) followed by A8d (14%) and A8-828-2-DZA (12%). Other haplotypes were recorded: A1-637-3-DZA and A2-637-3-DZA (7.14%); A8f, A3-637-3-DZA, A3-637-3-DZA (4.8%); A5-638-2-DZA, A7-638-3-DZA, A14-637-3-DZA, A6-828-2-DZA, A10-827-2-DZA, A11-828-3-DZA, A12-828-3-DZA, A13-828-2-DZA (2.4%) (Table 1). Haplotype sequences were made available at NCBI under the accession numbers going from OM994490 to OM994531.

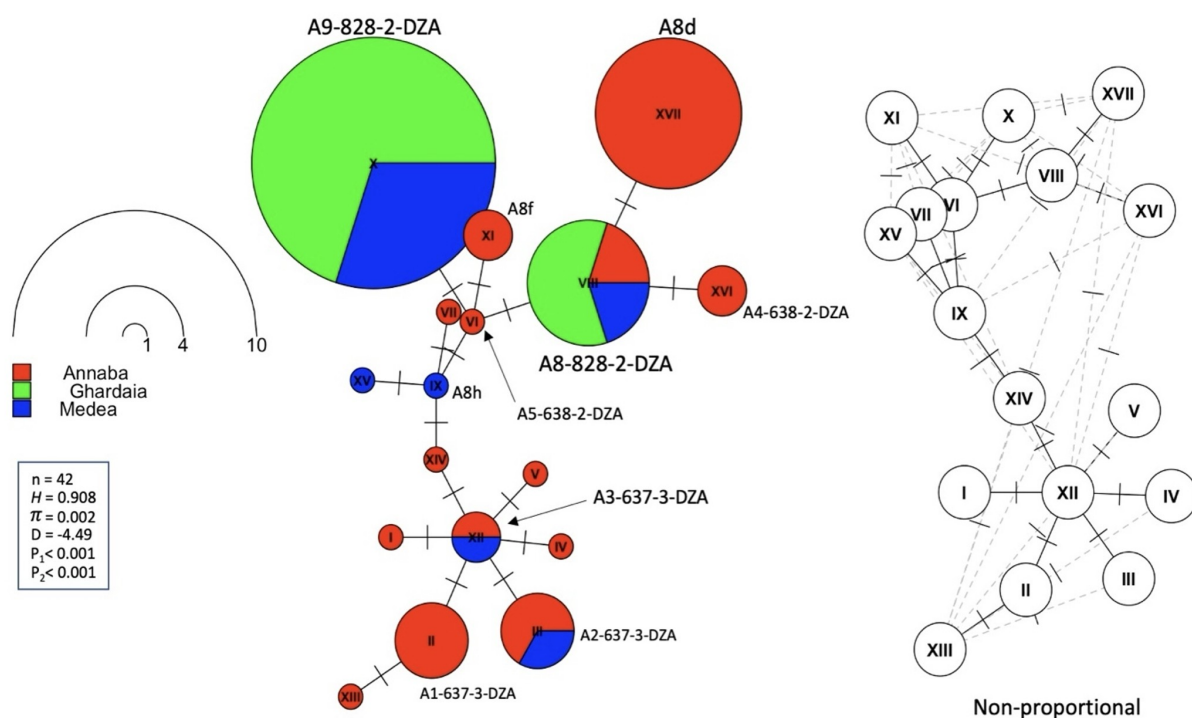


Figure 1. Haplotype network of the mtDNA COI-COII region. Number of samples (n), haplotype diversity (H), nucleotide diversity (π), Tajima's statistic (D), Tajima's P-values under normal (P_1) and beta (P_2) distributions. Circle size is relative to number of haplotype copies present in the dataset. Perpendicular lines on branches represent single nucleotide polymorphism (SNP) events. Non-proportional subfigure shows haplotype secondary network (dotted line) without haplotype copy representation.

Table 1. COI-COII genetic structure (S), evolutionary lineage (L), restriction profile of the Dral (bp) *in silico*, sequence length (bp), accession of best NCBI match and its percentage, expected subspecies, number of samples (n) and overall percentage of each haplotype (%).

S	L	Haplotype	Dral Profile (bp)	bp	NCBI Reference	Blast %	subspecies	n	%
P0Q	A	A8d	47/590	637	KX463819	100	<i>intermissa/sahariensis</i>	6	14.3
P0Q	A	A8f	47/591	638	KX463821	100	<i>intermissa/sahariensis</i>	2	4.76
P0Q	A	A8h	47/590	637	KX463823	100	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q	A	A1-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	3	7.14
P0Q	A	A2-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	3	7.14
P0Q	A	A3-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	99.9	<i>intermissa/sahariensis</i>	2	4.76
P0Q	A	A4-638-2-DZA	47/591	638	KX463820	99.9	<i>intermissa/sahariensis</i>	2	4.76
P0Q	A	A5-638-2-DZA	47/591	638	KX463821	99.9	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q	A	A7-638-3-DZA	47/109/482	638	MW677201	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q	A	A14-637-3-DZA	47/108/482	637	MW677201	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q2	A	A6-828-2-DZA	47/781	828	KX463839	99.9	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q2	A	A8-828-2-DZA	47/781	828	KX463836	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	5	11.9
P0Q2	A	A9-828-2-DZA	47/781	828	KX463836	99.9	<i>intermissa/sahariensis</i>	10	23.8
P0Q2	A	A10-827-2-DZA	47/780	827	KX463839	99.9	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q2	A	A11-828-3-DZA	47/299/482	828	KX463839	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q2	A	A12-828-3-DZA	47/299/482	828	KX463839	99.6	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
P0Q2	A	A13-828-2-DZA	47/781	828	KX463836	99.8	<i>intermissa/sahariensis</i>	1	2.38
Total								42	100

Extraction yield, and total phenolic and flavonoid content

The yields in weight percent ($100 \times (\text{dry weight extract (g)} / \text{weight crude propolis (g)})$) of the extractions were $23.5 \pm 1.4\%$ for Annaba, $18.0 \pm 2.3\%$ for Medea, and $10.7 \pm 1.3\%$ for Ghardaia extracts (means \pm SD, $n = 3$).

The total phenolic content of propolis extracts is represented in terms of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry propolis extract. As indicated in Figure 2A, the Medea samples

had the greatest total phenolic content followed by that of the Annaba and of the Ghardaia regions.

The total flavonoid content of propolis extracts is expressed as quercetin equivalents (QCE) per gram of dry propolis extract. As reported in Figure 2B, the values of propolis extracts ranged from 787 ± 207 to 1870 ± 385 mg QCE/g, with the propolis extracts from Annaba exhibiting significantly greater quantities than the propolis extracts from the other two regions. It is noteworthy that the mg QCE exceeded the mass of the Annaba extract and this is likely due to the nature of the assay since

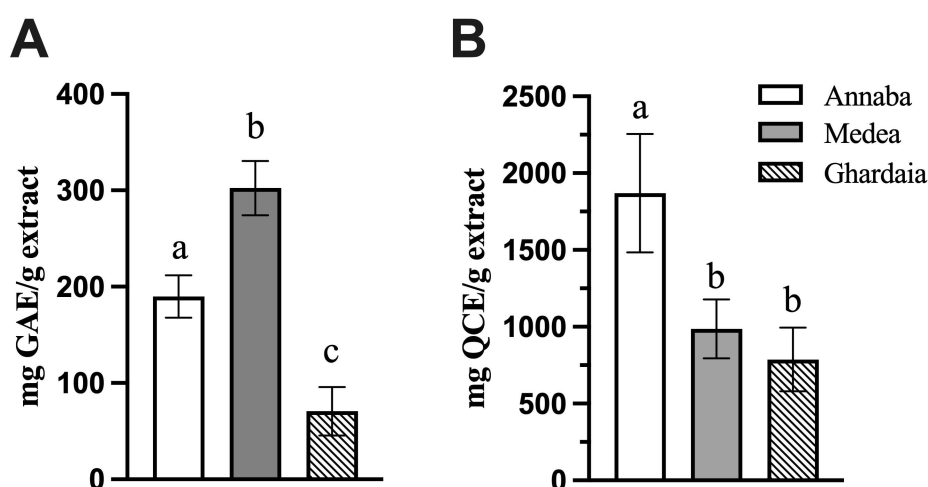


Figure 2. Total phenolic (A) and flavonoid (B) content of propolis extracts. Values are the means \pm SD of three independent experiments performed using an extract obtained from a pool of propolis samples collected from 5–6 hives per region. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as determined by one-way ANOVA with subsequent Tukey's adjustment; GAE: gallic acid equivalents; QCE: Quercetin equivalents.

many flavonoid compounds can give significantly greater responses than that of the quercetin reference material in this assay.^[23,24]

Chemical profiles by LC-MS analysis

The propolis extracts were analyzed by LC-MS using 22 selected standards and performed in duplicate. Intensity signals were recorded for the 30 analytes listed in Table 2. The identities of 20 of these compounds were confirmed by comparing the m/z values and the retention time with those of the analytical

Table 2. Determination of the chemical composition of Algerian propolis extracts by LC-MS. For each propolis extract, the compounds with the greatest intensity signals are in red and the least intense are green. The darkest red indicates the most abundant compounds based on peak height, and the darkest green indicates the least abundant compounds. The identification was performed in duplicate. Compounds were confirmed using analytical standards. Compound identification in propolis extracts were based on very stable retention times that matched those of standards within a few seconds. Non-confirmed compounds were suggested based on exact mass measurements.

Compound	[M-H], m/z	t_R , min	Confirmed	Annaba Propolis Extract Peak heights		Ghardaia Propolis Extract Peak heights		Medea Propolis Extract Peak heights	
				Trial#1	Trial#2	Trial#1	Trial#2	Trial#1	Trial#2
Cinnamic acid	147.0441	9.68	yes	3.35E+06	3.92E+06	2.94E+05	2.85E+05	2.87E+05	2.58E+05
Vanillin	151.0386	6.5	no	4.60E+06	4.76E+06	8.89E+05	8.69E+05	1.52E+07	1.60E+07
p-Coumaric acid	163.039	7.68	yes	8.76E+07	1.02E+08	3.72E+07	3.77E+07	4.58E+07	4.85E+07
Caffeic acid	179.0339	6.89	yes	1.46E+08	1.58E+08	5.30E+07	5.53E+07	2.54E+08	2.51E+08
Ferulic Acid	193.0495	7.92	yes	1.82E+07	2.10E+07	2.46E+07	2.37E+07	5.58E+06	5.99E+06
3,4-Dimethoxycinnamic acid	207.0652	8.84	yes	1.15E+07	1.29E+07	6.14E+06	5.83E+06	4.75E+06	5.55E+06
Ethyl caffeate	207.0652	9.64	yes	9.92E+06	1.08E+07	3.23E+06	3.26E+06	1.11E+07	1.21E+07
Isoprenyl coumarate	231.1012	12.26	no	7.20E+07	7.90E+07	1.67E+07	1.49E+07	6.11E+07	6.04E+07
isopentyl caffeate	249.1118	11.91	no	2.61E+07	2.62E+07	1.35E+07	1.29E+07	3.60E+07	3.48E+07
Pinocembrin	255.0652	11.6	no	2.72E+08	2.82E+08	1.87E+08	1.94E+08	2.25E+08	2.54E+08
Apigenin	269.0444	9.89	yes	4.99E+07	5.17E+07	3.00E+07	3.13E+07	3.70E+07	3.85E+07
Galangin	269.0444	11.73	yes	7.16E+07	7.83E+07	6.76E+07	6.80E+07	8.52E+07	8.28E+07
Benzyl caffeate	269.0808	11.34	no	6.95E+07	7.50E+07	6.25E+07	6.31E+07	1.58E+07	1.62E+07
Pinostrobin	269.0808	12.76	yes	5.24E+07	5.41E+07	nd	nd	4.19E+06	3.84E+06
Pinobanksin	271.0601	10.18	yes	1.64E+08	1.69E+08	1.53E+08	1.55E+08	1.39E+08	1.42E+08
Caffeic acid phenylethylester	283.0965	11.69	yes	7.78E+07	7.68E+07	3.77E+07	3.78E+07	1.61E+07	1.72E+07
Kaempferol	285.0394	10.12	yes	2.19E+07	2.22E+07	1.62E+07	1.85E+07	1.61E+07	1.73E+07
Sakuranetin	285.0757	11.51	yes	1.89E+07	1.99E+07	3.15E+06	3.13E+06	1.98E+07	2.07E+07
Isosakuranetin	285.0757	11.58	yes						
Chrysin	253.0495	11.47	yes	1.90E+08	1.93E+08	1.32E+08	1.35E+08	1.25E+08	1.25E+08
Cinnamyl caffeate	295.0965	12.18	yes	1.01E+08	1.03E+08	4.02E+07	4.03E+07	2.91E+07	2.98E+07
Isokaempferide	299.055	10.27	yes	3.02E+07	3.23E+07	1.84E+07	2.01E+07	1.99E+07	2.06E+07
Kaempferide	299.055	11.74	yes	5.03E+06	4.90E+06	3.40E+06	3.58E+06	7.92E+06	8.14E+06
Rhamnocitrin	299.055	11.74	yes						
Quercetin	301.0343	9.38	yes	2.10E+07	2.17E+07	1.01E+07	1.10E+07	1.22E+07	1.33E+07
Hesperetin	301.0707	10.13	no	1.86E+06	2.03E+06	5.29E+05	5.09E+05	8.25E+06	8.98E+06
Pinobanksin-3-acetate	313.0707	11.72	no	1.99E+08	1.95E+08	1.28E+08	1.34E+08	1.73E+08	1.70E+08
Isorhamnetin	315.0499	10.13	yes	1.60E+07	1.77E+07	6.05E+06	6.98E+06	1.61E+07	1.60E+07
Rhamnetin	315.0499	10.82	yes	1.75E+07	1.80E+07	1.23E+07	1.29E+07	1.15E+07	1.05E+07
Pinobanksin-3-propionate	327.0863	12.41	no	4.56E+07	4.61E+07	1.50E+07	1.63E+07	8.10E+06	6.91E+06

t_R , min = retention time of analytical standards; nd = not detected.

standards while empirical formulae were predicted for an additional 8 compounds based on exact mass measurements.^[25] The MS was calibrated routinely such that the measured *m/z* values of the substances that have no reference material are within 10 ppm of the calculated value.

The data are described as semi-quantitative in the sense that we did not (a) establish external calibration curves, (b) implement internal standards or (c) evaluate the linearity of response for any of the compounds. This is because the goal of these analyses was not to provide an exhaustive list of compounds and their exact quantities, but rather to analyze select compounds commonly found in propolis to highlight some differences in the three sources of propolis. The results revealed that pinocembrin and pinobanksin-3-acetate were amongst the most abundant compounds identified in each extract, whereas cinnamic acid was the least abundant of the identified molecules in each extract. Notable differences between extracts include the relatively greater content of ferulic acid in the Ghardaia extract than that observed in the other two extracts. Also, pinostrobin was relatively abundant in the Annaba extract but was one of the least abundant compounds identified in the Medea extract and was not detected in Ghardaia propolis extract. Since propolis extracts can contain hundreds of compounds,^[4,5,26] a more comprehensive character-

Table 3. Antiradical activity of propolis extracts measured by DPPH free radical scavenging.	
Samples	IC ₅₀ (μg/mL) Mean (95 % CI)
Propolis Annaba	39 (28–52) R ² = 0.96
Propolis Medea	13 (8.1–20) R ² = 0.95
Propolis Ghardaia	> 100
Ascorbic acid	9.1 (6.1–13) R ² = 0.93
Ethanol	NI

Values are from three independent experiments. CI = confidence interval. NI = no inhibition.

Table 4. IC₅₀ values of the antioxidant activity of propolis extracts against the AAPH-induced oxidation of linoleic acid.

Samples	IC ₅₀ (μg/mL) Mean (95 % CI)
Propolis Annaba	2.9 (2.6–3.4) R ² = 0.95
Propolis Medea	4.9 (4.4–5.5) R ² = 0.93
Propolis Ghardaia	4.4 (3.9–5.0) R ² = 0.93

Values are from three independent experiments. CI = confidence interval.

ization of the chemical composition and quantification of compounds would require the use of authentic standards and is beyond the scope of this study.

Scavenging of DPPH Free Radical

The free radical scavenging activity varied significantly between propolis extracts with propolis Medea showing the greatest activity having an IC₅₀ value that was comparable to that of ascorbic acid (Table 3). Propolis from Annaba was less active showing a significantly higher IC₅₀ value, while the scavenging activity of propolis from Ghardaia was too weak to establish an IC₅₀ value.

Antioxidant activity

The antioxidant activity of propolis extracts was evaluated by monitoring the AAPH-induced oxidation of linoleic acid. The results showed that all propolis extracts demonstrated antioxidant activity (Figure 3) with IC₅₀ values that ranged from 2.9 to 4.9 μg/mL (Table 4). Propolis extracts from Annaba showed a greater antioxidant activity than those from the other regions.

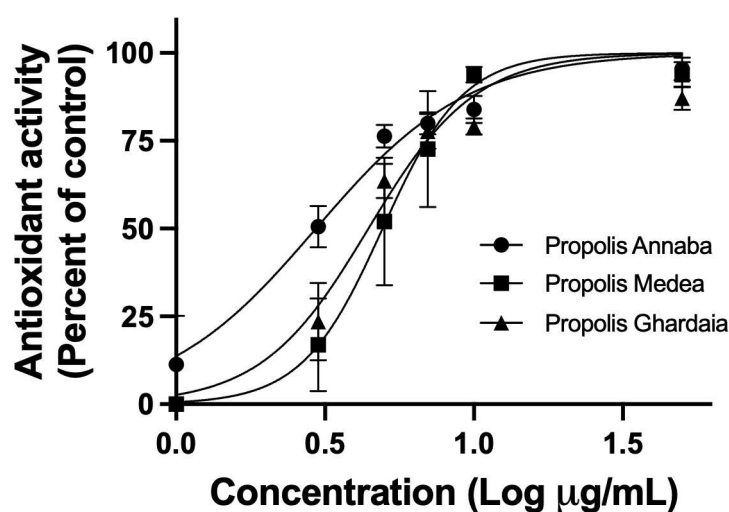


Figure 3. The antioxidant activity of propolis extracts expressed as the percent of diluent control values for the oxidation of linoleic acid. Values are means \pm SD of three independent experiments performed using an extract obtained from a pool of propolis samples collected from 5–6 hives per region.

Apoptotic cell death

To evaluate the effect of propolis on cell death, Jurkat and Reh cells were incubated for 72 h with different concentrations of propolis extracts. The flow cytometry results showed a dose-dependent reduction in the number of non-apoptotic Jurkat (Figure 4A) and Reh (Figure 4B) lymphocytic leukemia cells when exposed to the propolis extracts.

Supplemental Tables 1 and 2 show the distribution of Annexin V-Zombie aqua flow cytometry results. The propolis extracts decreased the proportion of double negative cells in a dose-dependent manner, which was accompanied by increases in both early (Annexin V⁺/Zombie⁻) and late (Annexin V⁺/Zombie⁺) apoptotic cells, with little accumulation of Annexin V⁻/Zombie⁺ cells that are generally indicative of necrosis.

The calculated IC₅₀ values for the reduction in the number of non-apoptotic cells were similar for the three propolis extracts and for the two cells lines, except for the Annaba

extract that was significantly less potent when incubated with Reh cells (Table 5).

After determination of the induction of apoptosis in Jurkat and Reh cell lines, the impact of these extracts on the induction of apoptosis were measured in peripheral blood lymphocytes as a model of normal, non-transformed cells. These latter cells were incubated with propolis extract concentrations close to the IC₅₀ (3 μg/mL) and about 3x IC₅₀ (10 μg/mL) measured in cancer cell lines (Figure 5 and Supplemental Table 3). The results showed that treatment with Medea propolis at 10 μg/ml reduced the number of double negative cells with an increase in the number of early apoptotic cells (Annexin V⁺/Zombie⁻). The other treatment conditions did not induce significant changes compared to controls, although there was a trend for an increase in early apoptotic cells (Supplemental Table 3).

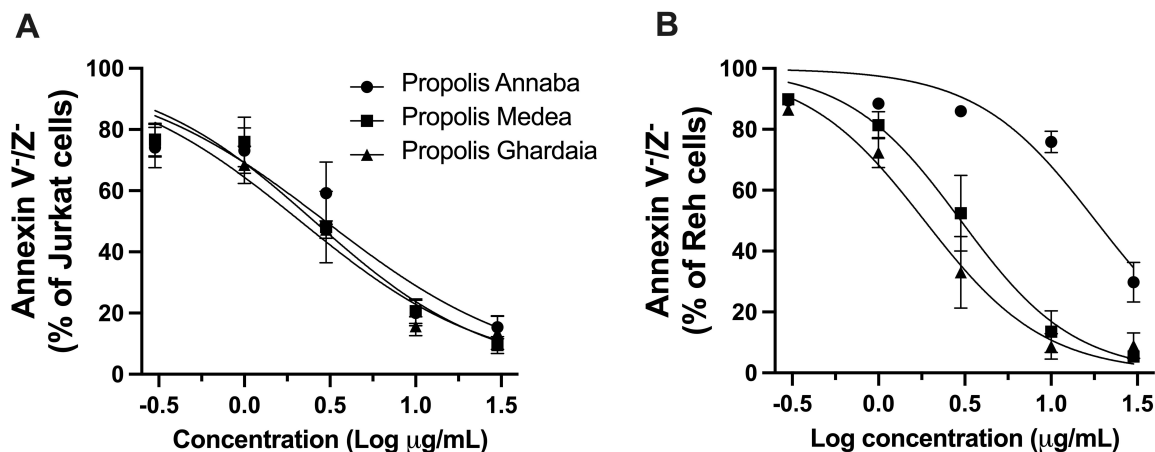


Figure 4. Average percentages of non-apoptotic Jurkat cells (A) and Reh cells (B) after treatment with propolis extracts for 3 days in the presence of the indicated propolis extract concentrations. Cells were incubated with Annexin V-647 and Zombie aqua and then analyzed by flow cytometry. Values show the percent of cells that are negative for staining with Annexin V and Zombie aqua, and represent the means \pm SD of 3 independent experiments, each performed in duplicate.

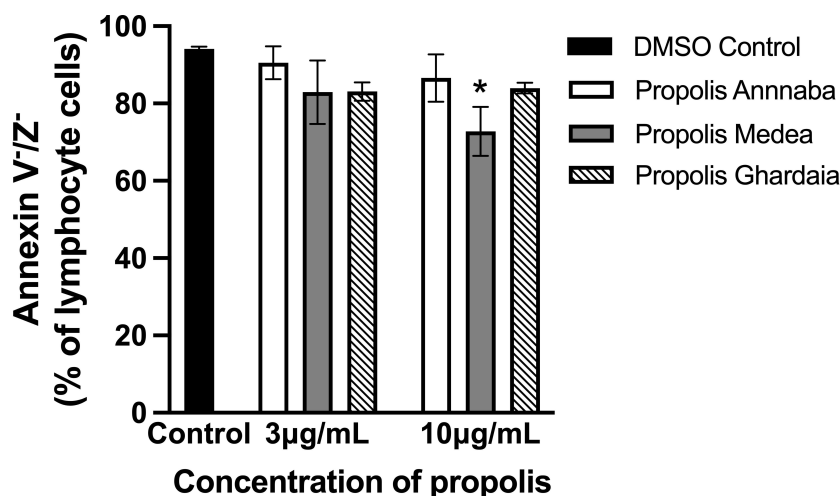


Figure 5. Average percentages of non-apoptotic lymphocytes after 3 days treatment with the indicated propolis extract concentrations. Cells were incubated with Annexin V-647 and Zombie aqua and then analyzed by flow cytometry. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments each performed in duplicate. *Values significantly different ($p < 0.05$) from control (DMSO) as determined by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test.

Table 5. IC₅₀ values for loss of non-apoptotic (Annexin V⁻/Zombie⁻) Jurkat and Reh cells after treatment with propolis extracts for 72 hours.

Samples	IC ₅₀ (μg/mL) Mean (95% CI)	
	Jurkat cells	Reh Cells
Propolis Annaba	3.0 (2.0–4.4) R ² = 0.87	18 (14–25) R ² = 0.87
Propolis Medea	2.5 (1.9–3.5) R ² = 0.91	2.2 (1.8–2.7) R ² = 0.97
Propolis Ghardaia	2.1 (1.6–2.7) R ² = 0.94	1.9 (1.5–2.3) R ² = 0.96

Values are means from three independent experiments, each performed in duplicate. CI = 95% confidence interval.

Cell viability

After determination of concentrations at which propolis extracts induced apoptotic death, the antiproliferative effects of propolis extracts on Jurkat and Reh cells were assessed using the Cell Titer Blue assay. A dose response experiment was performed using concentrations of 0.3, 1, 3, 10 and 30 μg/mL and the calculated IC₅₀ values are indicated in Table 6. All extracts showed similar anti-proliferative activity, with one exception where Reh cells were significantly less sensitive to propolis of Annaba.

5-Lipoxygenase product biosynthesis

HEK293 cells that ectopically express human 5-lipoxygenase (5-LO) were used to evaluate the effect of propolis extracts on 5-LO product biosynthesis. Cells were incubated with the propolis extracts at various concentrations and then the IC₅₀ were determined (Figure 6, Table 7). As illustrated in Figure 6, all propolis extracts induced a concentration-dependent decrease in 5-LO product biosynthesis compared to controls incubated with diluent (DMSO). Propolis extracts from Annaba and Medea showed similar inhibition of 5-LO product biosynthesis with IC₅₀ values below 1 μg/mL and overlapping 95% CIs, while propolis of Ghardaia showed a significantly weaker inhibitory activity.

Table 6. IC₅₀ values for Jurkat and Reh cell viability using the MTT assay after incubation with propolis extracts for 72 hours.

Samples	IC ₅₀ (μg/mL) Mean (95% CI)	
	Jurkat cells	Reh Cells
Propolis Annaba	2.0 (1.3–8.4) R ² = 0.87	28 (18–62) R ² = 0.77
Propolis Medea	2.4 (1.1–20) R ² = 0.60	2.2 (1.8–2.7) R ² = 0.94
Propolis Ghardaia	1.1 (0.7–1.6) R ² = 0.80	0.54 (0.46–0.65) R ² = 0.97

Values are means from three independent experiments. CI = confidence interval.

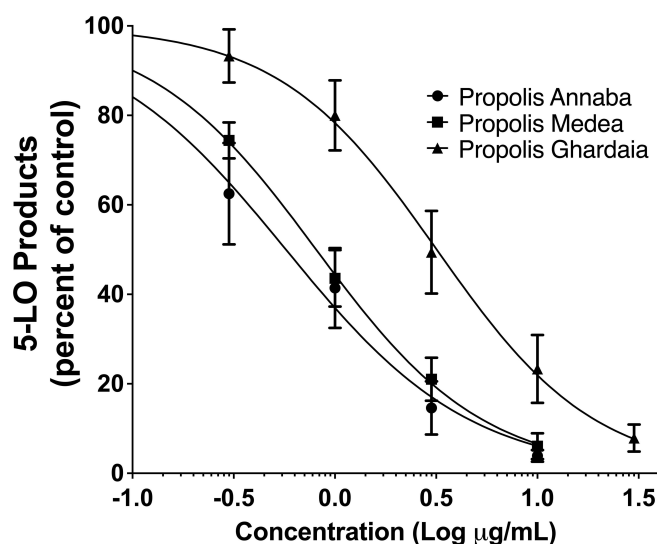


Figure 6. Inhibition of 5-LO product biosynthesis in HEK293 cells by different propolis extracts. Cells were incubated with the indicated concentrations of each propolis extract or diluent for 5 minutes prior to stimulation with arachidonic acid and calcium ionophore. 5-LO products were measured by RP-HPLC and results are expressed as a percent of 5-LO metabolite production versus production in cells that were preincubated with the diluent (DMSO). Values are the means ± SEM of four independent experiments, each performed in duplicate.

Table 7. IC₅₀ values for the inhibition of the biosynthesis of 5-LO products by propolis extracts in HEK293 cells.

Samples	IC ₅₀ (μg/mL) Mean (95% CI)
Propolis Annaba	0.57 (0.38–0.87) R ² = 0.88
Propolis Medea	0.81 (0.65–1.0) R ² = 0.96
Propolis Ghardaia	3.2 (2.4–4.3) R ² = 0.91

Values are means from four independent experiments, each performed in duplicate. CI = confidence interval.

Discussion

The chemical composition of propolis from different geographical regions show striking variability and complexity, and is related to the great variability of their botanical sources, geographical location, collection seasons and bee populations.^[9,27,28] Such chemical diversity can correspondingly result in varying biological activities. In this context, the current study focused on investigating the honey bee populations, and the chemical composition and biological activity of the extracts of propolis collected from honey bee breeding stations of three geographical areas of Algeria. Annaba propolis was from the Mediterranean northern Algeria, Medea propolis from a more transitional climate of the northern hills, while Ghardaia propolis was from a more southern desert region of the country.

The genetic analysis of honey bee populations collected from the breeding stations revealed the presence of a single lineage, which is the native African lineage A. This lineage is spread across the African continent and is highly diverse.^[20,21,29]

The current analysis confirms the absence of foreign mtDNA introgression in the breeding stations, and that all worker bees that collected the propolis analyzed in this study were the native subspecies of Algeria subspecies *A.m. intermissa* and *A.m. sahariensis*. Three of the seventeen haplotypes (A8d, A8f, A8h) were previously identified in the Algerian honey bee populations.^[20,29] However, a remarkable number of novel haplotypes were recorded for the first time which, according to the haplotype network analysis, clearly differed by one or more SNP from the previously known haplotypes.

An initial characterization of the extracts of Algerian propolis collected from the three queen breeding stations was performed by measuring their total phenolic and flavonoid content. For total phenolic content, the results obtained in this study were similar to those reported for Chinese propolis extracts that ranged from 89 to 202 mg GAE/g as well as those obtained for Brazilian propolis extracts (278 to 398 mg GAE/g).^[2,30] However, the values of total flavonoid content identified in this study were higher than those reported for different extracts of Chinese propolis that ranged from 166 to 520 mgQCE/g.^[30] The measured content of propolis extracts is also dependent on the extraction method and the type of solvents used.^[16,31,32] In the current study the ultrasound method in 70% ethanol was chosen because it was reported that ethanol (70–75%) is the most effective solvent for propolis extraction and that the ultrasound method results in higher total phenolic and flavonoid yields^[33,34] generating extracts with higher biological activity.^[35,36]

The preliminary chemical analyses of select compounds by LC/MS revealed that the compounds detected in different Algerian propolis extracts are commonly found in different types of propolis from various regions around the world. Asian, African and European propolis contain predominantly phenolics, alkaloids, and flavonoids, including galangin, pinocembrin, apigenin, pinobanksin, chrysin, cinnamyl caffeate, caffeic acid and *p*-coumaric acid^[37,38] that were also amongst the more abundant compounds identified in the current study. Although the LC/MS analysis of these extracts was semi-quantitative, and the molecular characterization of extracts from the three regions revealed many similarities, a few clear differences emerged where pinostrobin was much more enriched in the Annaba extracts while ferulic acid was relatively more abundant in the Ghardaia extracts than the other two. The differences in the relative abundance of the identified compounds in the propolis extracts is likely based on the differences in flora found in each of these geographically distinct regions. It is noteworthy that pinostrobin was not detected in propolis from the Ghardaia region. Although several plants are known to contain pinostrobin,^[39] this suggests that flowering plants rich in this phytochemical were not abundant in the vicinity of the hives in this region located in the Sahara desert. Alternatively, the possibility cannot be excluded that the sub species of bees identified in the hives from this desert region, *A. mellifera sahariensis*, do not collect pollen from plants that contain pinostrobin.^[9] It is also likely that in our study the phenolics and flavonoids are considered the main effective phytochemical

components responsible for several biological activities attributed to propolis.^[40]

At this time, it is not possible to identify with any certainty what aspect of the molecular signatures of the different extracts may be responsible for any differences in biological activities of the three extracts, but some clear differences in biological activity were measured. Propolis extracts from the Medea region had the strongest free radical scavenging activity that was possibly related its more elevated total phenolic content,^[16,30] while the Ghardaia propolis extract showed very weak anti-radical activity consistent with its lower phenolic acid content. While the very weak anti-radical activity of the Ghardaia extract may be explained by the relative phenolic and flavonoid content of the 3 extracts, caution should be exercised when relating anti-radical activity to the total phenolic and/or flavonoid content of such extracts. Overall, the anti-radical activity of the Annaba and Medea extracts reported here were similar with those reported for Greek, Moroccan, Turkish and Brazilian propolis which show IC₅₀ values that range from 8 to 100 µg/mL using the same DPPH assay.^[41–44] Further studies are required to clarify the molecular mechanisms responsible for the biological activity that we measured in these propolis extracts.

In contrast to the anti-radical activities, all three Algerian propolis extracts showed similar and quite potent antioxidant activity with IC₅₀ values in the low µg/mL range, with the Annaba extract being significantly more effective at limiting AAPH-induced linoleic acid oxidation than the other two extracts. This activity was greater than that reported using the same assay with an Indian propolis extract that showed an IC₅₀ of 710 µg/mL,^[45] and that of Roumania propolis extracts that showed approximately 50% inhibition at concentrations of 40 µg/mL.^[46] The antioxidant potential of various propolis extracts, evaluated by several antioxidant tests, shows a high degree of correlation with phenolic and flavonoids content.^[43,47–49] Indeed, several compounds previously shown to possess physiologically relevant antiradical and antioxidant properties were identified in the current study including caffeic acid phenethyl ester, chrysin, coumaric acid, quercetin, kaempferol, pinocembrin, cinnamic acid and ferulic acid that have been suggested to incorporate into cell membranes and protect them from free radical attacks.^[34,50–52] However, it is difficult to indicate the most effective components, considering the fact that several compounds in a propolis extract could synergistically act on the antiradical and antioxidant capacities.^[53,54] Indeed, we agree that more testing is necessary to reveal the synergistic potential of compounds in the propolis extracts.

Numerous studies have demonstrated that propolis extracts possess a marked effect on cancer cell proliferation and survival.^[55–57] In this study, the anti-proliferative and the pro-apoptotic effects of Algerian propolis extracts were investigated in the Jurkat human T cell acute lymphoblastic leukemia and Reh human acute lymphocytic leukemia cell lines. All three Algerian propolis extracts induced apoptosis in a dose-dependent manner in both cell lines. While the Medea and Ghardaia extracts were equally effective, inducing apoptosis in the 1.9–2.5 µg/mL range in both cell lines, the Annaba extract was

significantly less effective in Reh cells by an order of magnitude. Similarly, all three extracts showed potent inhibition of cell proliferation using the MTT assay in both cell lines, again with the Annaba extract being significantly less effective only in Reh cells. The explanation for this decreased effectiveness of the Annaba extract in Reh cell is currently unknown. Whether this is due to a particular resistance of B-cell acute lymphoblastic leukemia cells to the composition of the Annaba extract may merit further investigation. With regard to Jurkat cells, our extracts were considerably more potent than a Lebanese propolis extract^[58] where Jurkat cell proliferation was inhibited with an IC₅₀ value of 72 µg/mL and apoptosis was induced at with an apparent IC₅₀ of approximately 60 µg/mL.

Importantly, the Algerian propolis extracts in the current study showed little to no induction of apoptosis in normal peripheral blood lymphocyte cells at concentrations of 10 µg/mL, suggesting selectivity for cancer cells. Moreover, the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the extracts with IC₅₀ values in the 2–3 µg/mL range suggest the presence of molecules or combinations of molecules at concentrations that could be clinically relevant since the U.S. National Cancer Institute NCI-60 Cell One-Dose screening for potential therapeutic molecules is conducted at a concentration of 10 µM (https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm),^[59] and crude plant extracts showing IC₅₀ values at concentrations of 20 µg/mL or lower would be considered as active extracts.^[60,61] We confirm this interesting result deserves to be tested further.

Flavonoids and phenolics such as CAPE (caffeic acid phenethyl ester), caffeic acid, apigenin, quercetin, genistein, chrysin, p-coumaric acid, naringenin, kaempferol and formononetin are abundantly found in different propolis extracts, including those described here, and could have antitumor activity.^[58,62–64] Accordingly, propolis and its components have shown pro-apoptotic activity by inducing both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.^[55] Chrysin, for example, was shown to initiate apoptosis via the mitochondrial pathway and induces cytotoxic effects causing a loss of mitochondrial membrane potential (MMP), while increasing the production of reactive oxygen species (ROS), cytoplasmic Ca²⁺ levels, and lipid peroxidation.^[65] Galangin, another component of propolis, mediates anticancer activity through multiple signaling pathways^[58,66,67] and was shown to decrease tumor progression in mice bearing B16F1 melanoma cells.^[67] Caffeic acid is known to arrest cell cycle in a dose- and time-dependent manner and activate apoptosis,^[68–70] while quercetin, a flavonoid present in propolis, inhibits the growth of human lung adenocarcinoma cell lines (A549 and HCC-44)^[71] and JB6 P+ cells^[72] by inducing caspase-3-dependent apoptosis.^[73–75] Ferulic acid was shown to modulate several molecular pathways involved in a multitude of biological functions. Accordingly, ferulic acid was shown to reverse multiple drug resistance against paclitaxel,^[76] and regulated epithelial-to-mesenchymal transitions resulting in the inhibition of metastasis in MDA-MB-231 breast carcinoma cells.^[77]

Another reported biological activity of propolis is its anti-inflammatory properties, although the cellular and molecular

mechanisms by which propolis extracts exhibit anti-inflammatory activity in some studies have not been completely elucidated.^[62,78] 5-LO and its products, the leukotrienes, are intimately involved in the inflammatory process. 5-LO is a validated anti-inflammatory target, however to date only zileuton has been approved for use in the United States and despite clinical effectiveness, its poor pharmacokinetic properties and liver toxicity issues have limited its use.^[79] The present study shows that Algerian propolis extracts inhibit the biosynthesis of 5-LO products in a cell-based model with IC₅₀ concentrations below 1 µg/mL. The extract from Ghardaia propolis, however, was less effective than the other extracts, perhaps due to poor-antiradical activity.^[80] Our findings are in agreement with results showing that Canadian propolis extracts at a final concentration of 5 µg/mL inhibit approximately 40% of 5-LO biosynthesis,^[81] although the Algerian propolis showed a more potent inhibition. Phenolic and flavonoid compounds including CAPE, pinocembrin, chrysin and kaempferol possess remarkable anti-inflammatory properties by inhibiting the release of arachidonic acid from the cell membrane and/or its subsequent metabolism,^[82] and are associated with a broad range of inflammatory signaling pathways.^[83,84] The presence of these compounds may explain the inhibition of 5-LO biosynthesis exhibited by Algerian propolis extracts.

Conclusions

Overall, the extracts of propolis collected from three Algerian honey bee breeding stations present significant biological activity. Our data do not only show that they are very rich in phenolic and flavonoid compounds and present high free-radical scavenging (two of the three extracts) and antioxidant activities that are associated with potent inhibition of 5-LO product biosynthesis, but these propolis extracts also show a new interesting potential as an anticancer compound by reducing proliferation and inducing apoptosis of cancer cell lines at relatively low concentrations. This deserves to be tested further to understand the mechanisms of propolis action and to identify which compounds and environmental factors are responsible for the dissimilar activities in the extracts from different geographical regions.

Experimental

Chemicals

Folin-Ciocalteu reagent, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•), quercetin, gallic acid, calcium ionophore A23187, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and LC-MS standards were purchased from Sigma-Aldrich (ON, Canada). Arachidonic acid was purchased from Nu-Chek Prep (MN, USA) and linoleic acid was purchased from Cayman Chemical (MI, USA).

Honey bee samples

Honey bees were collected from three queen breeding stations located at Annaba (36°54'40.8"N 7°41'46.5"E) and Medea (36°14'12.9"N 2°57'22.6"E) in the North-East and center of Algeria, respectively, and Ghardaia (32°44'54.5"N 4°31'10.9"E) in the South of Algeria. The local bee strains present at apiaries of Annaba and Medea are *Apis mellifera intermissa*, while *A. mellifera sahariensis* was present at the apiary of Ghardaia. At each locality, bees were sampled from 8 to 24 hives. An average of 4 worker bees were sampled per hive during winter of 2022. Samples were stored in absolute ethanol until the DNA extraction process.

DNA extraction

A single leg was dissected from each bee sample and the DNA was extracted in 96-well PCR plates using the Chelex method^[85] with slight modifications.^[86] Each leg was individually placed in a plate well with 100 μ L of warm (60°C) 10% Chelex solution and was constantly stirred. The Chelex solution consisted of 1 g of Chelex powder and 10 mL of molecular biology grade water. Prior to sealing the plates, 6 μ L of Proteinase K (10 mg/mL) was added to each well and the sealed plates were placed on a CFX1000 Touch Bio-Rad Thermocycler with the following cycling: 60°C for 1 h, 99°C for 15 min, 37°C for 1 min, 99°C for 15 min, and a final hold at 5°C. DNA extracts were stored at -20°C for further downstream analyses.

Identification of honey bee subspecies

In order to identify the honey bee subspecies, the *in silico* cytochrome oxidase subunit I and subunit II gene of mitochondrial DNA (mtDNA COI-COII) test was carried out as previously described.^[22] The intergenic non-coding region of the mtDNA located between the cytochrome oxidase I and II was amplified using a validated set of primers^[86] able to capture the full sequence length of the COI-COII region. This PCR amplification was conducted on a total volume of 14 μ L which included 6 μ L of Master Mix for PCR (2X), (Bio-Rad, USA), 0.5 μ L of each primer (10 μ M), 5 μ L of nuclease free water and 2 μ L of DNA. PCR cycling was conducted as follows: 92°C for 3 min, followed by 35 cycles of (92°C for 30 s, 47°C for 90 sec, 63°C for 2 min), 63°C for 10 min and a final hold at 5°C. The primer sequences were COI_Seq-F: ACCACCTTAGATCATTACATTT and COII_Seq-R: AGGATG-GAACTGTTTCATGAATGAA. Electrophoresis on 1% agarose gel was occasionally conducted on a random set of samples to verify proper amplification of the region prior to Sanger sequencing of the PCR products.

Propolis extraction

Propolis samples were collected from the previously mentioned apiaries. Sampling was conducted between January and April 2022. The samples from 5 to 6 hives per geographical site were pooled and stored as crude (not dried) samples in the dark at -20°C. Propolis samples were crushed using a chilled mortar and pestle, sieved and the resulting powder kept at -20°C. Ten grams of powdered propolis was added to 40 mL of 70% ethanol and placed in an ultrasound liquid processor (Sonicator: Qsonica ultrasound processor, Qsonica L.L.C, Newtown, CT, USA) equipped with a probe for 20 min (40 W; 20% amplitude). The mixtures were kept for 24 h then centrifuged for 10 min at 1 644xg. The suspensions were kept at -20°C for 24 h and filtered to remove any potential residual waxes.^[87] Solutions were evaporated and dried under vacuum at room temperature. The resulting products were weighed to

determine the yield and represent the propolis extracts used for the remainder of the study. The yield was calculated as weight percent as indicated the following equation:

$$\text{Weight percent} = 100 \times (\text{dried extract (g)}/\text{crude propolis (g)}) \quad (1)$$

Total phenolic content

The total phenolic content of propolis extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method.^[81] Briefly, 100 μ L of methanolic propolis samples (1 mg/mL) were mixed with 500 μ L of distilled water and 100 μ L of Folin-Ciocalteu. After 6 min, 1 mL of 7% sodium carbonate and 500 μ L of distilled water were added. The obtained solutions were kept for 90 min in the dark. Afterwards, 100 μ L of each sample was plated in triplicate in a 96-well plate and the absorbance was measured at 760 nm using a multiplate spectrophotometer (Synergy H1 Hybrid, Biotek Instruments). Total phenolic content was calculated from the external calibration curve ($y = 1.0447x + 0.0977$ and $R^2 = 0.99$) using gallic acid solutions (0.03–1.0 mg/mL) and were expressed as mg of gallic acid equivalents per gram of sample (mgGAE/g).

Total flavonoid content

Total flavonoid content was evaluated by a colorimetric method as previously described^[81] by adding 500 μ L of distilled water and 100 μ L of 5% sodium nitrate to 100 μ L of the methanolic propolis samples (1 mg/mL). After 6 min, 150 μ L of 10% aluminum chloride solution was added to the mixture and 5 min later, 200 μ L of 1 M sodium hydroxide was sequentially added. One hundred μ L of the obtained solution was plated in triplicate in a 96-well plate and the absorbance was measured at 510 nm with a multiplate spectrophotometer (Synergy H1 Hybrid, Biotek Instruments). The total flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalents per gram of sample (mgQCE/g) by calculating an external calibration curve ($y = 0.1138x + 0.4124$ and $R^2 = 0.99$) using quercetin solutions (0.12–10 mg/mL) under the same conditions.

Chemical profiles by LC-MS analysis

The chemical profiles of propolis extracts were analyzed by gradient microscale liquid chromatography (Ultimate 3000, Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a high-resolution/accurate mass quadrupole-Orbitrap mass spectrometer using a pneumatically-assisted electrospray ionization ion source using negative ion mode as previously described.^[81] Complex extract samples were fractionated using on-line gradient liquid chromatography with a 10 cm long, 1.0 mm diameter reversed-phase (Altima C18) column with 3 μ m diameter particles (VWR, Mississauga, ON, Canada). Solvents "A" and "B" were delivered to the column at a combined flow rate of 40 μ L/min. Solvent "A" consisted of 0.1% aqueous formic acid while solvent "B" was composed of 90/9.9/0.1 v/v/v acetonitrile/water/formic acid. The LC gradient began at 5% B and was ramped to 100% B over 20 min. The column was then flushed at 100% B for 5 min and re-equilibrated at 5%B for an additional 15 min prior to the injection of the next sample. Each extract was first dissolved in 500 μ L of ethanol and then diluted 20-fold in 50/50 ethanol/water. For compound detection, the mass spectrometer was operated in negative ion mode at the maximum resolution setting of 140,000 over a mass-to-charge range of 100–700 Thomson (Th). The mass spectrometer was calibrated using the commercial negative ion calibration mixture from Thermo-Fisher

Scientific immediately prior to submission of the batch analysis the extracted samples. Retention times were compared to 24 standards.^[81]

Scavenging of free radicals using DPPH

The DPPH assay was used to evaluate the radical-scavenging activity.^[88] For this assay, 200 μ L of a 250 μ M DPPH solution in ethanol was added to 200 μ L of propolis extracts prepared at various concentrations in ethanol (1, 5, 10, 25, 50, 100 and 125 μ g/mL). The tubes were shaken for 30 min in the dark at room temperature and the absorbance measured at 517 nm using a multiplate spectrophotometer (Synergy H1 Hybrid, Biotek Instruments). Ascorbic acid was employed as a positive reference. The radical scavenging activity of the samples was calculated as follows:

$$\% \text{ Inhibition} = [(A1 - A2) / A1] \times 100, \quad (2)$$

where A1 is the absorbance of the addition of ethanol and A2 is the absorbance of test sample solution. DPPH inhibition concentrations at 50% (IC_{50}) were determined based on the percent inhibition of each sample dilution and the results were expressed in micrograms of dry propolis extract per mL (μ g/mL).

Antioxidant activity

The antioxidant assay was performed as previously described.^[89] Briefly, 3.5 μ L of ethanolic propolis extracts at different concentrations (5, 1, 0.3, 0.1 mg/mL) were added to a mix of 350 μ L of phosphate-buffered solution (5 mM, pH 7.4) containing 0.05% Tween[®]20 and 0.16 mM linoleic acid. The oxidation reaction was started by adding 8.75 μ L of AAPH solution (2 mM). One hundred μ L of the mixture was then added into a UV-transparent flat bottom 96-well plate. A condition without linoleic acid was used for a matrix subtraction while a condition without AAPH (no oxidation) served as the reaction control. After the addition of AAPH, or PBS for the control reaction, the rate of lipid oxidation was determined by measuring the absorbance of each sample every 5 min for 180 min at 234 nm with the microplate compartment on the instrument set at 37°C (Biotek Synergy H1 Hybrid Microplate Reader). Inhibition of linoleic acid oxidation was calculated following the formula, where 0% represents poor antioxidant properties while values close to 100% suggest a greater antioxidant activity potential:

$$\% = \left(1 - \frac{\text{rate of absorbance change of test compound}}{\text{rate of absorbance change of reaction control}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Cell culture

Jurkat (human acute T cell leukemia; Jurkat, Clone E6-1 – ATCC TIB-152) and Reh (human acute lymphocytic leukemia; ATCC CRL-8286) immortalized human cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA) and were cultured at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂ using RPMI 1640 medium (Corning, 10-041-CV) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Corning, 35-077-CV) and 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (1% pen/strep). HEK293 cells stably transfected to simultaneously express human 5-lipoxygenase (5-LO) and 5-LO activating protein (FLAP)^[90] were cultured as above except using DMEM medium (Corning, 10-013-CV) supplemented with 10% FBS and 1% pen/strep.

Lymphocyte isolation and culture

Fresh blood was obtained from consenting healthy donors in tubes containing the anticoagulant acid citrate dextrose. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by gradient centrifugation using a lymphocyte separation medium cushion (density, 1.077 g/mL; Corning, 25-072-CV) as previously described.^[91] PBMCs were cultured overnight (37°C, 5% CO₂) in RPMI 1640 containing 10% FBS and 1% Pen/Strep for monocyte depletion via plastic adherence. Non-adherent lymphocytes were collected the next day. This project was approved by the *Comité d'éthique de la recherche avec les êtres humains* at the Université de Moncton (protocol number 1314-029).

Apoptotic cell death assay

Jurkat and Reh cells were seeded in 12-well plates at a density of 1×10^6 cells/well in a volume of 2 mL of RPMI 1640 medium with 10% FBS and 1% of pen/step. Afterward, 4 μ L of different concentrations of propolis extracts were added to cells to final concentrations of 30, 10, 3, 1 or 0.3 μ g/mL. The effects of propolis on apoptosis were measured after 72 h by flow cytometry using Annexin V and Zombie Aqua (BioLegend[®]). Briefly, 500 μ L of cell suspensions were centrifuged at 500 \times g for 5 min and resuspended in 100 μ L of Master mix solution (98.5 μ L of annexin V Buffer + 1 μ L of annexin V Alexa Fluor[™] 647 + 0.5 μ L Zombie aqua) and incubated in the dark for 15 min at room temperature. Apoptosis was measured using flow cytometry (Attune NxT, Invitrogen) with FACS Attune NxT Software v4.2.0. The human lymphocytes isolated from peripheral blood in the previous section were incubated with the propolis extracts at concentrations of 3 and 10 μ g/mL (near the IC_{50} determined for the Jurkat and Reh cells lines) for 72h to assess the effect of propolis on normal non-transformed human cells.

Cell viability assay

The cell viability assay was performed using the CellTiter-Blue assay (Promega, Madison, WI, USA) as previously described.^[92] Briefly, 1×10^4 Jurkat or Reh cells/100 μ L in complete culture medium were seeded in 96-well plates and incubated with propolis extracts at different concentrations (30, 10, 3, 1, 0.3, 0 μ g/mL) for 72 h. Afterwards, 20 μ L of CellTiter Blue substrate was added to the treated cell suspensions and incubated at 37°C for 1 h for Jurkat cells and for 2h for Reh cells. The plates were analyzed on a fluorescence microplate reader (Synergy H1 Hybrid Microplate Reader) then the IC_{50} were determined for each propolis extract.

5-LO Product biosynthesis assays in HEK293 cells

Assays for the biosynthesis of 5-LO products used HEK293 cells stably co-transfected to express 5-LO and FLAP as previously described.^[90] Transfected HEK293 cells were collected following trypsinization and were resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 1.6 mM CaCl₂ at a concentration of 10^6 cells/mL. Cells were preincubated with propolis extracts at various concentrations (30, 10, 3, 1, 0.3 μ g/mL) at 37°C for 5 min. Cells were then stimulated for 15 min at 37°C with 10 μ M calcium ionophore A23187 and 10 μ M arachidonic acid. The reaction was stopped by adding 0.5 volumes of cold stop solution (MeOH:MeCN, 1:1) containing 200 ng/mL of 19-OH prostaglandin B₂ (PGB₂) as an internal standard.^[81,93] Samples were vortexed and placed at –20°C overnight to maximize protein denaturation and precipitation. Samples were then analyzed for 5-LO products (leukotriene B₄ (LTB₄), 6-trans-LTB₄, 6-trans-12-epi-LTB₄, 5-hydroxyicosatetraenoic acid (5-HETE) by reverse-phase high-performance liquid chromatog-

raphy (RP-HPLC) and UV detection at 236 nm and 270 nm as previously described^[94] with an updated Agilent 1260 system.^[89]

Statistical analyses

Sequence alignment and generation of FASTA files were conducted using Geneious Prime 2022.0.1 (<https://www.geneious.com>). Generation of haplotype networks and computation of genetic relationships (haplotype and nucleotide diversity, Tajima's statistic) were conducted according to^[95] and^[96] in R environment (R CORE TEAM 2022) (v. 2022.07.0) using two main Libraries: "ape" and "pegas".^[97,98] Statistical analyses of propolis extract data were performed with GraphPad Prism 9.3.1 software as described in the figure legends (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Author Contributions

Participated in research design: Ahmed Sabri Ayad, Marc E. Surette, Tarek Daas, Guy Smaghe, Loucif-Ayad; conducted experiments: Ahmed Sabri Ayad, Mathieu P. A. Hébert, Jérémie A. Doiron, David A. Barnett, Mohamed Alburaki; performed data analysis: Ahmed Sabri Ayad, Mathieu P. A. Hébert, Jérémie A. Doiron, David A. Barnett, Mohamed Alburaki, Marc E. Surette; wrote or contributed to the writing and editing of the manuscript: Ahmed Sabri Ayad, Wahida Loucif-Ayad, Mohamed Alburaki, Guy Smaghe, Tarek Daas, Mohamed Touaibia, Marc E. Surette.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria (PRFU project D01 N01UN230120220003 to W. Loucif-Ayad), the New Brunswick Innovation Foundation (Research Chair Program and RPI2020-007) to Marc E Surette, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Mohamed Touaibia.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords: Algerian honey bees · Anti-inflammatory · Antioxidants · Cytotoxicity · Algerian honey bees · Anti-inflammatory · Antioxidants · Cytotoxicity · Propolis

[1] M.-R. Ahn, S. Kumazawa, T. Hamasaka, K.-S. Bang, T. Nakayama, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7286–7292.

- [2] J. H. de O Reis, G. de A Barreto, J. C. Cerqueira, J. P. dos Anjos, L. N. Andrade, F. F. Padilha, J. I. Druzian, B. A. S. Machado, *PLoS One* **2019**, *14*, e0219063.
- [3] N. Wilson-Rich, S. T. Dres, P. T. Starks, *J. Insect Physiol.* **2008**, *54*, 1392–1399.
- [4] V. Bankova, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 114–117.
- [5] S. Huang, C.-P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li, F.-L. Hu, *Molecules* **2014**, *19*, 19610–19632.
- [6] V. S. Bankova, S. L. de Castro, M. C. Marcucci, *Apidologie* **2000**, *31*, 3–15.
- [7] L. C. Rufatto, D. A. dos Santos, F. Marinho, J. A. P. Henriques, M. Roesch Ely, S. Moura, *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, *7*, 591–598.
- [8] R. P. Dantas Silva, B. A. S. Machado, G. de A Barreto, S. S. Costa, L. N. Andrade, R. G. Amaral, A. A. Carvalho, F. F. Padilha, J. D. V. Barbosa, M. A. Umsza-Guez, *PLoS One* **2017**, *12*, e0172585.
- [9] S. Silici, S. Kutluca, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 69–73.
- [10] V. A. Tagliacollo, R. de O Orsi, *Ciênc. E Tecnol. Aliment.* **2011**, *31*, 752–757.
- [11] N. Nedji, W. Loucif-Ayad, *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2014**, *4*, 433–437.
- [12] K.-W. Cheung, D. M.-Y. Sze, W. K. Chan, R.-X. Deng, W. Tu, G. C.-F. Chan, *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *138*, 463–471.
- [13] A. Yildirim, G. G. Duran, N. Duran, K. Jenedi, B. S. Bolgul, M. Miraloglu, M. Muz, *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2016**, *22*, 422–430.
- [14] A. P. Dantas, B. P. Olivieri, F. H. M. Gomes, S. L. De Castro, *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *103*, 187–193.
- [15] B. Yangi, M. Cengiz Ustuner, M. Dincer, C. Ozbayer, N. Tekin, D. Ustuner, E. Colak, U. K. Kolac, E. Entok, *J. Med. Food* **2018**, *21*, 1096–1105.
- [16] J. Kocot, M. Kiełczykowska, D. Luchowska-Kocot, J. Kurzepa, I. Musik, *Oxid. Met.* **2018**, *2018*, 1–29.
- [17] F. Hu, H. R. Hepburn, Y. Li, M. Chen, S. E. Radloff, S. Daya, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 276–283.
- [18] H. Doğan, S. Silici, A. A. Ozcimen, *Turk. J. Agric. – Food Sci. Technol.* **2020**, *8*, 573–579.
- [19] E. Szliszka, A. Sokół-Łętowska, A. Z. Kucharska, D. Jaworska, Z. P. Czuba, W. Król, *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2013**, *2013*, 757628.
- [20] M. Achou, W. Loucif-Ayad, H. Legout, H. hmidan, M. Alburaki, L. Garnery, *J. Data Min. Genomics Proteomics* **2015**, *06*, DOI 10.4172/2153-0602.1000166.
- [21] W. Loucif-Ayad, M. Achou, H. Legout, M. Alburaki, L. Garnery, *Apidologie* **2015**, *46*, 392–402.
- [22] M. Alburaki, S. Madella, J. Lopez, M. Bouga, Y. Chen, D. vanEngelsdorp, *Front. Genet.* **2023**, *13*, 1092121.
- [23] A. Pełal, K. Pyrzynska, *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1776–1782.
- [24] A. M. Shraim, T. A. Ahmed, M. M. Rahman, Y. M. Hijji, *LWT* **2021**, *150*, 111932.
- [25] Y. Al Naggar, J. Sun, A. Robertson, J. P. Giesy, S. Wiseman, *J. Apic. Res.* **2016**, *55*, 305–314.
- [26] V. S. Bankova, S. L. de Castro, M. C. Marcucci, *Apidologie* **2000**, *31*, 3–15.
- [27] H. Laaroussi, P. Ferreira-Santos, Z. Genisheva, M. Bakour, D. Ousaaid, J. A. Teixeira, B. Lyoussi, *Food Biosci.* **2021**, *42*, 101160.
- [28] N. El Menyiy, M. Bakour, A. El Ghouizi, S. El Guendouz, B. Lyoussi, *Int. J. Food Sci.* **2021**, *2021*, 1–12.
- [29] N. Chahbar, I. Muñoz, R. Dall'Olio, P. De la Rúa, J. Serrano, S. Doumandji, *J. Insect Conserv.* **2013**, *17*, 385–392.
- [30] Q. Ding, A. R. Sheikh, X. Gu, J. Li, K. Xia, N. Sun, R. A. Wu, L. Luo, Y. Zhang, H. Ma, *Food Sci. Nutr.* **2021**, *9*, 313–330.
- [31] C. Sun, Z. Wu, Z. Wang, H. Zhang, *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2015**, *2015*, 595393.
- [32] S. Narimane, E. Demircan, A. Salah, B. Ö. Ozcelik, R. Salah, *Pak. J. Pharm. Sci.* **2017**, *30*, 1417–1423.
- [33] C. X. Tan, G. H. Chong, H. Hamzah, H. M. Ghazali, *J. Supercrit. Fluids* **2018**, *135*, 45–51.
- [34] D. Devequi-Nunes, B. A. S. Machado, G. de A Barreto, J. Rebouças Silva, D. F. da Silva, J. L. C. da Rocha, H. N. Brandão, V. M. Borges, M. A. Umsza-Guez, *PLoS One* **2018**, *13*, e0207676.
- [35] A. C. H. F. Sawaya, P. V. Abdelnur, M. N. Eberlin, S. Kumazawa, M.-R. Ahn, K.-S. Bang, N. Nagaraja, V. S. Bankova, H. Afrouzan, *Talanta* **2010**, *81*, 100–108.
- [36] S. F. Fonseca, N. B. Padilha, S. Thurow, J. A. Roehrs, L. Savegnago, M. N. de Souza, M. G. Fronza, T. Collares, J. Buss, F. K. Seixas, D. Alves, E. J. Lenardão, *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *39*, 827–836.
- [37] S. Huang, C.-P. Zhang, K. Wang, G. Q. Li, F.-L. Hu, *Mol. Basel Switz.* **2014**, *19*, 19610–19632.
- [38] A. C. de Groot, *Dermat. Contact Atopic Occup. Drug* **2013**, *24*, 263–282.
- [39] N. K. Patel, G. Jaiswal, K. K. Bhutani, *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 2017–2027.

- [40] L. dos Santos, S. Hochheim, A. M. Boeder, A. Kroger, M. M. Tomazzoli, R. Dal Pai Neto, M. Maraschin, A. Guedes, C. M. M. de Cordova, *J. Apic. Res.* **2017**, *56*, 543–558.
- [41] H. Laaroussi, P. Ferreira-Santos, Z. Genisheva, M. Bakour, D. Ousaaid, J. A. Teixeira, B. Lyoussi, *Food Biosci.* **2021**, *42*, 101160.
- [42] K. M. Kasiotis, P. Anastasiadou, A. Papadopoulos, K. Machera, *PLoS One* **2017**, *12*, e0170077.
- [43] E. T. da Cruz Almeida, M. C. D. da Silva, J. M. D. S. Oliveira, R. U. Kamiya, R. E. D. S. Arruda, D. A. Vieira, V. da C Silva, P. B. Escodro, I. D. Basilio-Júnior, T. G. do Nascimento, *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 280–287.
- [44] H. A. Kahraman, H. Tutun, M. M. Kaya, M. S. Usluer, S. Tutun, C. Yaman, S. Sevin, E. Keyvan, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2022**, *36*, 45–56.
- [45] S. Kumari, P. Naik, B. L. Vishma, S. R. Salian, R. A. Devkar, S. Khan, S. Mutalik, G. Kalthur, S. K. Adiga, *Cytotechnology* **2016**, *68*, 1789–1800.
- [46] F. Gatea, A. O. Matei, E. D. Teodor, G. L. Radu, *Rev. Roum. Chim.* **2015**, *60*, 65.
- [47] M. S. Hernández Zarate, M. del R Abraham Juárez, A. Cerón García, C. Ozuna López, A. J. Gutiérrez Chávez, J. de J. N Segoviano Garfias, F. Avila Ramos, *Food Sci. Technol.* **2018**, *38*, 210–215.
- [48] A. C. H. F. Sawaya, I. Barbosa da Silva Cunha, M. C. Marcucci, *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 27.
- [49] R. R. Naik, A. K. Shakya, G. A. Oriquat, S. Katekhaye, A. Paradkar, H. Fearnley, J. Fearnley, *Molecules* **2021**, *26*, 5076.
- [50] I. V. G. A. Bastos, T. B. D. Oliveira, M. D. Rodrigues, G. C. G. Militão, T. G. D. Silva, I. C. C. Turatti, N. P. Lopes, S. J. D. Melo, *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89*, 991–1001.
- [51] L. Barrientos, C. L. Herrera, G. Montenegro, X. Ortega, J. Veloz, M. Alvear, A. Cuevas, N. Saavedra, L. A. Salazar, *Braz. J. Microbiol.* **2013**, *44*, 577–585.
- [52] D. Pitchai, A. Roy, C. Ignatius, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2014**, *5*, 179.
- [53] J. E. Johnston, H. A. Sepe, C. L. Miano, R. G. Brannan, A. L. Alderton, *Meat Sci.* **2005**, *70*, 627–631.
- [54] M. Küçük, S. Kolaylı, Ş. Karaoğlu, E. Ulusoy, C. Baltacı, F. Candan, *Food Chem.* **2007**, *100*, 526–534.
- [55] E. Forma, M. Bryś, *Nutrients* **2021**, *13*, 2594.
- [56] N. Zabaoui, A. Fouache, A. Trousson, S. Baron, A. Zellagui, M. Lahouel, J.-M. A. Lobaccaro, *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *207*, 214–222.
- [57] K. Aso, S.-I. Kanno, T. Tadano, S. Satoh, M. Ishikawa, *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 727–730.
- [58] H. Noureddine, R. Hage-Sleiman, B. Wehbi, H. Fayyad-Kazan, S. Hayar, M. Traboulsi, O. A. Alyamani, W. H. Faour, Y. ElMakhour, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 298–307.
- [59] R. H. Shoemaker, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813–823.
- [60] J. Boik, *Natural Compounds in Cancer Therapy: Promising Nontoxic Antitumor Agents from Plants and Other Natural Sources*, Oregon Medical Press, Princeton, **2001**.
- [61] G. M. Cragg, D. J. Newman, in *Bioact. Nat. Prod. Dir. Isol. Struct. Determ.*, CRC Press/Taylor and Francis, London, **2006**, pp. 323–370.
- [62] O. Belmehdi, N. El Menyiy, A. Bouyahya, A. El Baaboua, N. El Omari, M. Gallo, D. Montesano, D. Naviglio, G. Zengin, N. Skali Senhaji, B. H. Goh, J. Abrini, *Food Rev. Int.* **2023**, *39*, 6078–6128.
- [63] M. F. Seyhan, E. Yılmaz, Ö. Timirci-Kahraman, N. Saygılı, H. İ. Kısakesen, S. Gazioğlu, A. C. Gören, A. P. Eronat, A. Begüm Ceviz, T. Öztürk, H. Yılmaz-Aydoğan, O. Öztürk, *IUBMB Life* **2019**, *71*, 619–631.
- [64] I. Valença, F. Morais-Santos, V. Miranda-Gonçalves, A. M. Ferreira, C. Almeida-Aguiar, F. Baltazar, *BMC Complementary Altern. Med.* **2013**, *13*, 184.
- [65] S. Naz, M. Imran, A. Rauf, I. E. Orhan, M. A. Shariati, lahtisham-Ul-Haq, I. Yasmin, M. Shahbaz, T. B. Qaisrani, Z. A. Shah, S. Plygun, M. Heydari, *Life Sci.* **2019**, *235*, 116797.
- [66] L. Benguedouar, M. Lahouel, S. C. Gangloff, A. Durlach, F. Grange, P. Bernard, F. Antonicelli, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2016**, *16*, 1172–1183.
- [67] C. Liu, M. Ma, J. Zhang, S. Gui, X. Zhang, S. Xue, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 1415–1421.
- [68] K. Celińska-Janowicz, I. Zareba, U. Lazarek, J. Teul, M. Tomczyk, J. Pałka, W. Milytyk, *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 336.
- [69] A. Kabala-Dzik, A. Rzepecka-Stojko, R. Kubina, Ż. Jastrzębska-Stojko, R. Stojko, R. Wojtyczka, J. Stojko, *Molecules* **2017**, *22*, 1554.
- [70] K. M. M. Espíndola, R. G. Ferreira, L. E. M. Narvaez, A. C. R. Silva Rosario, A. H. M. da Silva, A. G. B. Silva, A. P. O. Vieira, M. C. Monteiro, *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 541.
- [71] K. Sak, H. Lust, M. Kase, J. Jaal, *Oncol. Lett.* **2017**, DOI 10.3892/ol.2017.7466.
- [72] J. Li, M. Mottamal, H. Li, K. Liu, F. Zhu, Y.-Y. Cho, C. P. Sosa, K. Zhou, G. T. Bowden, A. M. Bode, Z. Dong, *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 459–465.
- [73] F. Zuhendri, R. Felitti, J. Fearnley, M. Ravalía, *J. Oral Biosci.* **2021**, *63*, 23–34.
- [74] Y.-Z. Zheng, G. Deng, Q. Liang, D.-F. Chen, R. Guo, R.-C. Lai, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7543.
- [75] H. Reчек, A. Haouat, K. Hamaidia, D. C. G. A. Pinto, T. Boudiar, M. S. G. A. Válega, D. M. Pereira, R. B. Pereira, A. M. S. Silva, *Chem. Biodiversity* **2023**, DOI 10.1002/cbdv.202200890.
- [76] G. Muthusamy, A. Balupillai, K. Ramasamy, M. Shanmugam, S. Gunaseelan, B. Mary, N. R. Prasad, *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *786*, 194–203.
- [77] X. Zhang, D. Lin, R. Jiang, H. Li, J. Wan, H. Li, *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 271–278.
- [78] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez, *J. Food Sci.* **2008**, *73*, R117–R124.
- [79] E. Israel, J. Cohn, L. Dubé, J. M. Drazen, *Jama* **1996**, *275*, 931–936.
- [80] L. H. Boudreau, J. Maillet, L. M. LeBlanc, J. Jean-François, M. Touaibia, N. Flamand, M. E. Surette, *PLoS One* **2012**, *7*, e31833.
- [81] M. Sambou, J. Jean-François, F. J. Ndongou Moutombi, J. A. Doiron, M. P. A. Hébert, A. P. Joy, N.-N. Mai-Thi, D. A. Barnett, M. E. Surette, L. H. Boudreau, M. Touaibia, *Molecules* **2020**, *25*, 2397.
- [82] O. K. Mirzoeva, P. C. Calder, *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **1996**, *55*, 441–449.
- [83] W. Wang, L. Zheng, L. Xu, J. Tu, X. Gu, *Mol. Med.* **2020**, *26*, 53.
- [84] M. Shahinozzaman, B. Basak, R. Emran, P. Rozario, D. N. Obanda, *Fitoterapia* **2020**, *147*, 104775.
- [85] P. S. Walsh, D. A. Metzger, R. Higushi, *BioTechniques* **2013**, *54*, 134–139.
- [86] S. Madella, K. Grubbs, M. Alburaki, *Insects* **2020**, *12*, 19.
- [87] 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. D. O. Carvalho, *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 964–970.
- [88] P. Ferreira-Santos, Z. Genisheva, C. Botelho, J. Santos, C. Ramos, J. A. Teixeira, C. M. R. Rocha, *Antioxidants* **2020**, *9*, 334.
- [89] M. P. A. Hébert, A. Selka, A. A. Lebel, J. A. Doiron, A. Isabel Chiasson, V. L. Gauvin, A. J. Matthew, M. J. G. Hébert, M. S. Doucet, A. P. Joy, D. A. Barnett, M. Touaibia, M. E. Surette, L. H. Boudreau, *Int. Immunopharmacol.* **2023**, *121*, 110419.
- [90] E. P. Allain, L. H. Boudreau, N. Flamand, M. E. Surette, *PLoS One* **2015**, *10*, e0132607.
- [91] A. Böyum, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **1968**, *97*, 51–76.
- [92] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor, in *Assay Guid. Man.* (Eds.: S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, X. Xu), Eli Lilly & Company and The National Center For Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), **2004**.
- [93] J. Doiron, L. H. Boudreau, N. Picot, B. Villebonnet, M. E. Surette, M. Touaibia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1118–1121.
- [94] P. P. Robichaud, S. J. Poirier, L. H. Boudreau, J. A. Doiron, D. A. Barnett, E. Boilard, M. E. Surette, *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 1821–1830.
- [95] M. Nei, *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, **1987**.
- [96] M. Nei, F. Tajima, *Genetics* **1981**, *97*, 145–163.
- [97] E. Paradis, *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2010**, *26*, 419–420.
- [98] E. Paradis, K. Schliep, *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2019**, *35*, 526–528.

Manuscript received: November 7, 2023

Accepted manuscript online: January 19, 2024

Version of record online: February 7, 2024