

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



UNIVERSITE BADJI- MOKHTAR-ANNABA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUEE

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE EN BIOLOGIE ANIMALE
ENVIRONNEMENTALE
OPTION: PHYSIOTOXICOLOGIE

**Effets des acaricides sur l'abeille domestique *Apis mellifera*
intermissa et analyse de l'activité antimicrobienne de la
propolis et du miel.**

Présentée par: Mme Neila NEDJI

Devant le jury composé de:

Président: M. Nouredine SOLTANI

Pr., Univ. Annaba

Directeur de thèse: Mme Wahida AYAD-LOUCIF

MCA, Univ. Annaba

Examineur: Mme Fouzia TINE-DJEBAR

MCA, Univ. Tébessa

Examineur: M. Kamel LOUADI

Pr., Univ. Constantine

Examineur: M. Mohamed ACHOU

Pr., Univ. Annaba

Examineur: Mme Selima BERCHI

Pr., E.N.S.B. Constantine

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 / 2015

Remerciements

Tout d'abord, je ne peux oublier de remercier le bon Dieu de m'avoir donné la foi et la sagesse et je m'incline humblement devant sa bonté, lui qui m'a donné le courage d'accomplir ce modeste travail.

Mes sincères remerciements vont à M. N. SOLTANI, Professeur à l'Université d'Annaba et Directeur du Laboratoire de Biologie Animale Appliquée, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

A Mme W. AYAD-LOUCIF, Maitre de conférences à l'Université d'Annaba, à qui j'exprime toute ma gratitude, ma plus profonde reconnaissance et mes sincères remerciements pour avoir accepté de diriger ce travail ainsi que pour ses précieux conseils et son soutien.

A M. K. LOUADI, Professeur à l'Université de Constantine, à qui j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury.

A Mme S. BERCHI, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie de Constantine, à qui j'exprime mes vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

A Mme F. TINE-DJEBAR, Maitre de conférences à l'Université de Tébessa, à qui j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury.

A M. M. ACHOV, Professeur à l'Université d'Annaba, à qui j'exprime mes vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions énormément Pr. D. KIRANE qui m'a permis d'effectuer toutes les analyses de microbiologie au niveau du Laboratoire de Microbiologie, Université d'Annaba.

Nous remercions également Dr I. BITAM, de l'institut Pasteur d'Alger, pour son aide précieuse en mettant à notre disposition des souches microbiennes de référence.

Un grand merci pour M. F. BOUSSOUAK, apiculteur, ainsi qu'à ses collaborateurs pour leur aide précieuse et généreuse au rucher.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mon travail.

Je présente mes chaleureux remerciements aux enseignants du département de biologie pour leur aide et leur orientation durant notre formation.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes Parents; qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout le long de mes études.

À mon cher mari Kamel qui m'a tant soutenu.

À mes chers beaux- parents.

À mes enfants Nourhene, faten et youness.

À mes sœurs et frères.

À mes neveux et nièces.

À mes amis.

À toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I. MATERIEL ET METHODES	9
1. Présentation de l'abeille, organisation sociale et technique d'élevage.....	9
1.1. Présentation de l'abeille.....	9
1.2. Organisation sociale.....	10
1.3. Technique d'élevage.....	10
2. Présentation des acaricides et traitements.....	11
2.1. Présentation du fluvalinate.....	12
2.2. Présentation de l'acide oxalique.....	12
3. Prélèvement des échantillons de miel et de la propolis, conservation et extraction....	13
3.1. Prélèvement et conservation du miel.....	13
3.2. Prélèvement, conservation et extraction de la propolis.....	13
4. Présentation des souches microbiennes.....	14
4.1. Souches microbiennes testées.....	14
4.2. Choix des souches microbiennes.....	14
5. Mesure des paramètres physico-chimiques du miel.....	15
5.1. Mesure de l'hygrométrie du miel.....	15
5.2. Mesure du pH.....	15
5.3. Mesure de la conductivité électrique.....	15
5.4. Mesure de la teneur en cendres.....	15
6. Dosage des composés phénoliques du miel et de la propolis.....	15
6.1. Principe du dosage.....	15
6.2. Dosage des composés phénoliques du miel.....	17
6.2.1. Dosage des polyphénols totaux du miel.....	17
6.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux du miel.....	17
6.3. Dosage des composés phénoliques de la propolis.....	17
6.3.1. Dosage des polyphénols totaux de la propolis.....	17
6.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux de la propolis.....	17
7. Mesure de l'activité antimicrobienne du miel et de la propolis.....	18
7.1. Méthode de la diffusion par disque sur gélose.....	18

7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel et de la propolis.....	20
7.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel.....	20
7.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la propolis.....	20
8. Test de toxicité: application topique de l'acide oxalique sur les abeilles ouvrières.....	21
9. Dosages de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase chez les abeilles ouvrières.....	21
10. Etude histopathologique de l'intestin moyen des abeilles ouvrières.....	23
11. Localisation des régions de prélèvement des échantillons de miel et de la propolis pour l'étude de l'activité antimicrobienne à l'encontre des bactéries pathogènes transmises par les aliments.....	24
12. Analyses statistiques.....	25

CHAPITRE I: Impact de deux acaricides (fluvalinate et acide oxalique) sur *Apis mellifera intermissa*.

I. RESULTATS.....	26
1. Comparaison des paramètres physico-chimiques du miel avant et après traitement aux acaricides.....	26
2. Comparaison des composés phénoliques du miel avant et après traitement aux acaricides.....	27
2.1. Teneurs en polyphénols totaux du miel.....	27
2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux du miel.....	28
3. Analyse de l'activité antimicrobienne du miel.....	29
3.1. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes.....	29
3.2. Concentration minimale inhibitrice du miel.....	32
4. Comparaison des composés phénoliques de la propolis avant et après traitement aux acaricides.....	33
4.1. Teneurs en polyphénols totaux de la propolis.....	33

4.2. Teneurs en flavonoïdes totaux de la propolis.....	33
5. Analyse de l'activité antimicrobienne de la propolis.....	34
5.1. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes.....	34
5.2. Concentration minimale inhibitrice de la propolis.....	37
6. Effet de l'acide oxalique par application topique sur l'activité spécifique de la Glutathion S-Transférase des ouvrières d' <i>A.mellifera intermissa</i>	38
7. Effet de l'acide oxalique sur l'histopathologie de l'intestin moyen des ouvrières d' <i>A. mellifera intermissa</i>	39
II. DISCUSSION	40
 CHAPITRE II: Activité antimicrobienne du miel et de la propolis à l'égard des bactéries pathogènes transmises par les aliments.	
I. RESULTATS	
1. Comparaison des paramètres physico-chimiques du miel des différentes régions phytogéographiques.....	46
2. Comparaison des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux du miel et de la propolis des différentes régions phytogéographiques.....	47
3. Analyse de l'activité antimicrobienne du miel et de la propolis des différentes régions phytogéographiques à l'égard des bactéries pathogènes transmises par les aliments.....	48
II. DISCUSSION	49
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	54
RESUMES	56
Français.....	56
Anglais.....	58
Arabe.....	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
ANNEXES (PRODUCTION SCIENTIFIQUE)	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison des valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques du miel avant traitement aux acaricides.....	26
Tableau 2. Comparaison des valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques du miel après traitement aux acaricides.....	27
Tableau 3. Concentrations minimale inhibitrice du miel (mg/ml) avant et après traitement aux acaricides pour chaque souche microbienne.....	32
Tableau 4. Concentration minimale inhibitrice de l'extrait éthanolique de la propolis (µg/ml) avant et après traitement aux acaricides pour chaque souche microbienne.....	37
Tableau 5. Comparaison des valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques du miel en fonction des régions.....	46
Tableau 6. Comparaison des valeurs moyennes des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux du miel et de la propolis en fonctions des régions.....	47

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Morphologie de l'abeille.....	10
Figure 2. Position géographique du site d'échantillonnage du miel et de la propolis.....	11
Figure 3. Structure chimique du fluvalinate	12
Figure 4. Structure chimique de l'acide oxalique.....	12
Figure 5. Courbe étalon du dosage des polyphénols.....	16
Figure 6. Courbe étalon du dosage des flavonoïdes.....	16
Figure 7. Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).....	23
Figure 8. Localisation des régions d'échantillonnage du miel et de la propolis.....	24
Figure 9. Teneurs en polyphénols totaux du miel avant et après traitements aux acaricides.....	28
Figure 10. Teneurs en flavonoïdes totaux du miel avant et après traitements aux acaricides.....	29
Figure 11. Présentation des résultats de l'activité antimicrobienne du miel à l'égard des sept souches microbiennes.....	30
Figure 12. Diamètres des zones d'inhibition (mm) du miel avant traitement (A) et après traitement (B) aux acaricides pour chaque souche microbienne.....	31
Figure 13. Teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques de propolis avant et après traitement aux acaricides.....	33
Figure 14. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques de la propolis avant et après traitements aux acaricides.....	34
Figure 15. Présentation des résultats de l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques de la propolis à l'égard des sept souches microbiennes.....	35
Figure 16. Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait éthanolique de propolis avant traitement (A) et après traitement (B) aux acaricides pour chaque souche microbienne.....	36

Figure 17. Activité spécifique de la glutathion S-transférases ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) de l'intestin moyen des ouvrières nouvellement émergées après application topique de l'acide oxalique.....	38
Figure 18. Images microscopiques de l'épithélium intestinal d'une abeille traitée par l'acide oxalique (3,5%).....	39
Figure 19. Images microscopiques de l'épithélium intestinal d'une abeille traitée par l'acide oxalique (20%).....	39
Figure 20. Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne par le miel au niveau de chaque région phytogéographique.....	48
Figure 21. Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne par l'extrait éthanolique de propolis au niveau de chaque région phytogéographique.....	49

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Environ 70% des cultures mondiales utilisées directement pour la consommation humaine dépendent des insectes pollinisateurs (Gallai *et al.*, 2008). Parmi ces derniers, les abeilles domestiques, *Apis mellifera* (Hymenoptera; Apidae) constituent un maillon essentiel de la chaîne qui contribue à maintenir les écosystèmes (Straub, 2007). Elles jouent un rôle primordial dans les diverses phases de la vie de nombreuses espèces végétales et animales. Si les abeilles disparaissaient, diverses plantes ne pourraient plus se reproduire et disparaîtraient. Leur absence engendrerait la perte de nombreuses espèces animales dont l'homme se nourrit. En effet, les abeilles, présentent de multiples intérêts dont la pollinisation de nombreux végétaux (Gallai *et al.*, 2009; Rader *et al.*, 2009; Moritz *et al.*, 2010), le maintien de la diversité génétique (Anderson *et al.* 2011; Krupke *et al.*, 2012), ainsi que la production du miel, de la propolis, de la gelée royale, du pollen et de la cire. 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 (Bogdanov, 2006).

Parmi les produits de la ruche, le miel résulte de la transformation du nectar des plantes ou du miellat des insectes prélevé par les butineuses et sa transformation dans leurs jabots sous l'action de ferments et d'enzymes présents dans leur tube digestif. Le saccharose du nectar va ainsi se transformer en différents sucres dont le glucose et le fructose. De retour à la ruche, les butineuses vont transférer par trophallaxie leurs récoltes aux abeilles qui, par régurgitations successives d'une abeille à une autre, vont terminer la transformation amorcée, avant d'aller dégorger dans les alvéoles de cire. Lors de ce processus, la teneur en eau s'amenuise et parallèlement le liquide s'enrichit en sucres gastriques et en enzymes salivaires. La chaleur de la ruche et la ventilation par les abeilles vont aboutir à une concentration de la solution sucrée obtenue d'environ 80% de sucre pour un peu moins de 18% d'eau (Clément, 2002). Une fois la teneur en eau inférieure à vingt pour cent, l'alvéole est operculée. Le miel est alors constitué en majorité de sucres principalement d'hexoses (Jacobsen, 2009; Recrosio, 2010). La propolis, un autre produit de la ruche, est une substance résineuse et gommeuse de consistance visqueuse, recueillie par les abeilles sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) des végétaux (Challem, 1995; Ghisalberti, 1979; Kujumgiev *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). La résine récoltée, mélangée à la cire et aux enzymes de la salive est



transformée en propolis par les ouvrières (Lognon, 2009; Lotti *et al.*, 2010). La propolis est utilisée pour réparer les fissures et combler les interstices de la ruche (Challem, 1995; Ghisalberti, 1979; Valcic *et al.*, 1999; Spürgin, 2008). Son effet bactéricide et fongicide est utilisé pour désinfecter les alvéoles avant le dépôt des œufs, du miel ou du pollen et protéger la ruche des infections et des parasites (Burdock, 1998; Sforcin & Bankova, 2011). Généralement la propolis se compose de cire (30%), de résine (50%), des huiles essentielles et aromatiques (5%) et de pollen (5%) ainsi que divers composés organiques, essentiellement phénoliques (Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Lotti *et al.*, 2010; Tylkowski *et al.*, 2010).

Le miel peut exercer plusieurs effets positifs sur la santé tels que des effets gastroprotecteurs (Belostotskiï *et al.*, 2009), hépatoprotecteurs (Al-Waili, 2004), hypoglycémiques (Ansorge *et al.*, 2003), énergétiques et nutritionnels (Domerego *et al.*, 2009), antioxydants (Wahdan, 1998; Al-Mammary *et al.*, 2002; Blasa *et al.*, 2006; Cooper, 2007; Van Den Berg *et al.*, 2008; Hegazi *et al.*, 2009; Rodriguez-Malaver *et al.*, 2009; Tomczak, 2010), antifongiques (Wahdan, 1998; Al-Waili, 2005; Koç *et al.*, 2011) et anti-inflammatoires (Schreck *et al.*, 1991; Van Den Berg *et al.*, 2008; Molan, 2009; Tomczak, 2010). Le miel a également des actions immunostimulatrices et anticancéreuses (Orsolić *et al.*, 2003; Attia *et al.*, 2008), cicatrisantes (Iftikhar *et al.*, 2010; Tomczak, 2010; Al-Waili *et al.*, 2011) et antibactériennes (Recrosio, 2010). La propolis présente également plusieurs propriétés biologiques, antifongiques (Kujumgiev *et al.*, 1999; Ozcan *et al.*, 2004; Quintero-Mora *et al.*, 2008; Koç *et al.*, 2011), anti-inflammatoires (Dobrowolski *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 2005; Sosa, 2007; Donadieu, 2008), cicatrisantes (Perri de Carvalho *et al.*, 1991; Gabrys, 1986; Domerego *et al.*, 2009; Pessolato *et al.*, 2011) et immunomodulatrices (Dimov *et al.*, 1992; Simões *et al.*, 2004; Orsatti & Sforcin, 2011), antioxydantes (Shimizu *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011), anticancéreuses (Song *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2009; Chikaraishi *et al.*, 2010; Cavalcante *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Umthong *et al.*, 2011), antivirales (Shimizu *et al.*, 2011), antiparasitaires (Abdel-Fattah & Nada 2007; Monzote *et al.*, 2011) et antibactériennes (Grange & Davey, 1990; Wu-yuan *et al.*, 1990; Bankova *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2002; Koru *et al.*, 2007; Boukraâ & Sulaiman, 2009; Domerego *et al.*, 2009; Trusheva *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Orsi *et al.*, 2011; Ramanauskienė & Inkėnienė, 2011).



Le miel et la propolis, en raison de leur propriété antibactérienne, constituent des alternatives intéressantes dans la technologie alimentaire (Erkmen, 2008; El-Bassiony *et al.*, 2012). Beaucoup de micro-organismes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été rapportés comme agents responsables des intoxications alimentaires (Erkmen, 2008; EL-Bassiony *et al.*, 2012). Avec le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Levy, 2002; Levy & Marshall, 2004), la recherche de nouvelles molécules plus efficaces s'impose et on s'oriente vers de nouvelles sources comme les produits naturels (Erkmen, 2008).

Plusieurs études ont été menées pour déterminer la composition chimique de la propolis et du miel. Divers composés phénoliques ont été identifiés. Ces derniers sont reconnus comme étant parmi les principaux responsables de l'activité antioxydante et antibactérienne du miel (Yao *et al.*, 2003; Uthurry *et al.*, 2011) et de la propolis (Pepeljnjak *et al.*, 1985; Walker & Crane, 1987). Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes et participent à la défense des plantes contre les invasions microbiennes et les agressions environnementales (Jussi-Pekka, 2001). La présence et les concentrations des composés phénoliques dans le miel peuvent varier selon la source florale, les conditions géographiques et climatiques (Gheldof & Engeseth, 2002; Socha *et al.*, 2009; Tsiapara *et al.*, 2009). De même, la spécificité de la végétation locale est responsable de la composition chimique de la propolis collectée par les abeilles au niveau de leurs différents écosystèmes (Bankova, 2005).

L'augmentation de la pression environnementale et anthropique à laquelle sont exposées les populations d'abeilles domestiques est soupçonnée d'être à la base de leur déclin à l'échelle mondiale (Beismeyer *et al.*, 2006; Oldroyd, 2007; ; Paxton, 2007 ; Stokstad, 2007; Grixti *et al.*, 2009; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Ratnieks & Carreck, 2010; Whitehorn *et al.*, 2012). Divers facteurs tels que les prédateurs, les pathogènes, les parasites, les résidus des pesticides, la perte de la diversité génétique (Henry *et al.*, 2012; James & Xu, 2012) agissant seuls ou en synergie contribuent à l'affaiblissement et aux mortalités des colonies d'abeilles (vanEngelsdorp *et al.*, 2009; vanEngelsdorp & Meixner, 2010).



Parmi les parasites de l'abeille, *Varroa destructor* (Acari : Varroidae) (Anderson & Trueman, 2000) est considéré comme une des plus sérieuses menaces pour *Apis mellifera* (de la Rúa *et al.*, 2009; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Brodschneider *et al.*, 2010; Chauzat *et al.*, 2010; Dahle, 2010; Genersch *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Potts *et al.*, 2010; Rosenkranz *et al.*, 2010; Schäfer *et al.*, 2010; Topolska *et al.*, 2010; Vanengelsdorp *et al.*, 2010; Noireterre, 2011; Martin *et al.*, 2012). *V. destructor* est un acarien ectoparasite de l'abeille qui se nourrit de son hémolymphe (Dahle, 2010; Martin *et al.*, 2010; 2012; Nazzi *et al.*, 2012). Il peut avoir trois types d'action sur *Apis mellifera*: mécanique (Kanbar & Engels, 2003), vecteur de nombreux agents infectieux de l'abeille (Weinberg & Madel, 1985; Tentcheva *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Prisco *et al.*, 2011; Wendling, 2012; Dainat *et al.*, 2012) et spoliateur (Duay *et al.*, 2003). Les conséquences de la varroase sur les abeilles sont principalement une réduction du corps corporel, de la concentration des protéines et des glucides hémolympatiques à l'émergence (Smirnov 1978; De Jong *et al.*, 1982, Weinberg & Madel, 1985; Achou & Soltani, 1997; Bowen-Waker & Gunn, 2001) et de la longévité (De Jong & De Jong, 1983; Schneider & Drescher 1987; Kovak & Craisheim, 1988, Amdan *et al.*, 2004). On assiste aussi à une activité de butinage précoce des ouvrières (Schneider & Drescher 1987) et à des difficultés à survivre pendant l'hiver (Kovac & Crailsheim, 1988). D'autres caractéristiques physiologiques consistent en une dégénérescence des corps adipeux et un sous-développement des glandes hypopharyngiennes (De jong *et al.*, 1982; De Jong & De Jong, 1983; Schneider & Drescher, 1987). On assiste également à une altération de l'ontogenèse et de l'expression des glycoprotéines des spermatozoïdes avec une réduction du diamètre de la glande à mucus et de la vésicule séminale ainsi que du nombre de spermatozoïdes (Rinderer *et al.*, 1999). Une diminution de la taille du flagelle antennaire et du nombre de sensilles antennaires (Abd EL-Wahab *et al.*, 2006) ainsi qu'une diminution de la survie à l'émergence (Rinderer *et al.*, 1999); du nombre de bourdons atteignant l'âge de la maturité sexuelle (Collins & Pettis, 2001) et des fréquences de vol (Schneider, 1987) ont été enregistrées. Tous ces effets affectent négativement le processus compétitif de l'accouplement (Bubalo *et al.*, 2005).



Diverses méthodes de contrôle de cet acarien ont été étudiées. On retrouve des méthodes biotechniques (Boot *et al.*, 1995), biologiques (Nazzi *et al.*, 2004), génétiques (Martin *et al.*, 2001) et chimiques par l'utilisation des acaricides. Ces dernières sont celles qui sont les plus utilisées sur le terrain (Maggi *et al.*, 2009; Calderone, 2010). Les traitements chimiques correspondent à l'utilisation de plusieurs familles de pesticides à l'intérieur de la ruche: des pyréthrinoïdes (fluvalinate et fluméthrine), des organophosphorés (coumaphos) et des formamidines (amitraze) (Bogdanov, 2006; Haubruge *et al.*, 2006). Divers travaux ont montré que les acaricides utilisés dans la lutte contre le varroa entraînaient des modifications dans la signalisation cellulaire. Les pyréthrinoïdes (fluméthrine, fluvalinate) perturbent l'ouverture des canaux sodium voltage-dépendant (Soderlund & Bloomquist, 1989; Narahashi *et al.*, 1992) et les formamidines (amitraze) agissent comme agonistes des récepteurs d'octopamine dans les synapses excitatrices du système nerveux des arthropodes (Wang *et al.*, 2012). Il a été démontré que la sensibilité envers les pyréthrinoïdes variait selon les races d'abeilles (Danka & Rinderer, 1986; Elzen *et al.*, 2000; Claudianos *et al.*, 2006). Parmi les pyréthrinoïdes utilisés dans la lutte anti varroa, le fluvalinate apparaît comme la molécule la plus fréquemment retrouvée dans de nombreuses études (Bernal *et al.*, 2010; Mullin *et al.*, 2010; Orantes-Bermejo *et al.*, 2010). Le fluvalinate est une molécule insecticide et acaricide non sélective qui agit principalement sur la transmission nerveuse et le modulateur des canaux sodium (Sherby *et al.*, 1986; Colin *et al.*, 1997; Ray & Fry, 2006; Davies *et al.*, 2007; Rosenkranz *et al.*, 2010). Cette molécule est non volatile et liposoluble. Elle est bien tolérée par les colonies d'abeilles aux doses utilisées pour le contrôle de *V. destructor* (Colin *et al.*, 1997). Comparativement aux autres pyréthrinoïdes qui sont très toxiques pour les abeilles, le fluvalinate, à forte concentration, semble être toléré par les abeilles du en partie, à la détoxification rapide par la famille des cytochromes P450 mono-oxygénases (Johnson *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2011). Cependant, la fréquence d'utilisation du fluvalinate a diminué ces dernières années suite à l'apparition de phénomènes de résistance du varroa (Lodesani *et al.*, 1995; Colin *et al.*, 1997; Baxter *et al.*, 1998; Trouiller, 1998; Wang *et al.*, 2002; Gracia-Salinas *et al.*, 2006) et de résidus dans le miel (Lodesani *et al.*, 1992; Wallner, 1999; Lodesani *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009) et dans la cire (Wallner, 1999; Bogdanov, 2006; Berry, 2009; Mullin *et al.*, 2010). De plus, le fluvalinate présente des effets secondaires néfastes sur la santé de l'abeille (Stoner *et al.*, 1985; Sokol, 1996; Currie, 1999; Rinderer *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2000; Fell & Tignor, 2001; Haarmann *et al.*, 2002;



Lodesani & Costa, 2005; Martel *et al.*, 2007; Frazier *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2009; Locke *et al.*, 2012), d'où l'importance de s'orienter vers des molécules naturelles de moindre toxicité et non polluantes tels que les acides organiques (acide oxalique, acide formique) et les huiles essentielles (thymol, menthol, eucalyptol) (Quarles, 1996; Imdorf *et al.*, 1999; Lindberg *et al.*, 2000; Gregorc & Planincy, 2002; Ariana *et al.*, 2002; Eguaras *et al.*, 2003; Stanghellini & Raybold, 2004; Floris *et al.*, 2004; Satta *et al.*, 2005). Parmi ces molécules, l'acide oxalique, constitue une alternative intéressante en remplacement des acaricides chimiques du fait de son action acaricide efficace à l'encontre de *V. destructor* (Prandin *et al.*, 2001; Gregorc & Planinc, 2001; 2002; Marcangeli *et al.*, 2003; Nanetti *et al.*, 2003; Rademacher & Harz, 2006; Marinelli *et al.*, 2006; Bacandritsos *et al.*, 2007). Il est aussi naturellement présent dans le miel (Bogdanov, 2006; Rademacher & Harz, 2006) et son utilisation (Prandin *et al.*, 2001; Gregorc & Planinc, 2001; 2002; Marcangeli *et al.*, 2003; Nanetti *et al.*, 2003; Marinelli *et al.*, 2006; Rademacher & Harz, 2006; Bacandritsos *et al.*, 2007), ne pose pas de problèmes de résistance et de contamination des produits de la ruche (Bogdanov *et al.*, 2002). Le mode d'action de l'acide oxalique contre *V. destructor* est encore inconnu, mais un contact entre cet acarien et l'acide oxalique est nécessaire pour obtenir une efficacité de ce traitement (Aliano & Ellis, 2008). L'acide oxalique est efficace à l'encontre de *V. destructor* quand il est administré en solution sucrée, permettant une bonne adhésion des produits actifs aux abeilles (Aliano & Ellis, 2008). Par contre, diluée dans l'eau seulement, il ne présente aucun effet sur l'ectoparasite (Charrière & Imdorf, 2002). La majorité des tests ont montré la grande efficacité de l'acide oxalique et sa bonne tolérance par l'abeille (Imdorf *et al.*, 1997). Néanmoins, l'acide oxalique n'est pas sans danger pour les abeilles et des recherches ont montré sa toxicité envers *A. mellifera* (Higes *et al.*, 1999; Nozal *et al.*, 2003; Gregorc *et al.*, 2004; Hatjina & Haristos, 2004; Gregorc & Smodis Skerl, 2007; Martin-Hernandez, 2007; Aliano & Ellis, 2008; Wagnitz & Ellis, 2010; Scheinder *et al.*, 2011; Carrasco-Letelier *et al.*, 2012; Locke *et al.*, 2012; Wermelinger *et al.*, 2013).

L'abeille mellifère possède les caractéristiques propres d'une espèce sentinelle (Lagadic *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 2011) et constitue un modèle biologique d'intérêt majeur. De nombreuses études ont montré que les abeilles et les matrices associées (miel, pollen ...) pouvaient être utilisées comme sentinelles de la contamination de l'environnement par les xénobiotiques (Celli & Maccagnani, 2003; Porrini *et al.*, 2003; Ghini *et al.*, 2004; Devillers &



al., 2005; Sabatini, 2005; Ponikvar *et al.*, 2005; Bogdanov, 2006). L'abeille représente un véritable témoin de la qualité de l'environnement par le biais de ses caractéristiques biologiques et son activité intense de butinage qui la mettent en contact avec les produits phytopharmaceutiques et autres polluants environnementaux (Wallwork-Barber *et al.*, 1982; Saifutdinova & Shangaraeva, 1997; Kevan, 1999; Devillers & Pham-Delègue, 2002; Celli & Maccagnani, 2003; Porrini *et al.*, 2003; Ghini *et al.*, 2004; Leita *et al.*, 2004; Sabatini, 2005; Balayiannis & Balayiannis, 2008; Chauzat *et al.*, 2011; Perugini *et al.*, 2011). En effet, pour détecter la présence de pesticides et leur impact sur l'environnement, une des méthodes utilisées est l'approche biologique basée sur l'étude d'espèces bioindicatrices et de leurs marqueurs biologiques. Les abeilles constituent un modèle pertinent pour le développement des biomarqueurs afin d'évaluer la contamination de l'environnement (Wallwork-baker *et al.*, 1982; Leita *et al.*, 2004).

Différents biomarqueurs, notamment ceux du système de détoxification, ont été étudiés (Hyne & Maher, 2003; Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012). Ces biomarqueurs sont fortement stimulés après une exposition aux molécules toxiques. Le suivi de leur activité dans le temps constitue le système de veille environnementale et la modification de leur activité crée l'alerte. Parmi ces biomarqueurs enzymatiques, les Glutathion S-Transférases (GSTs) jouent un rôle important dans le mécanisme de détoxification (Motoyama & Dauterman, 1980; Clark *et al.*, 1985; Fournier *et al.*, 1992; Kostaropoulos *et al.*, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2004). Les GSTs représentent une famille de mutagènes de protéines multifonctionnelles, appartenant au système de détoxification de la phase II, enzymes cytosoliques qui catalysent la conjugaison du glutathion réduit (GSH) à une variété de composés électrophiles endogènes ou exogènes (Maxwell, 1992; Stone *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2005). Chez les abeilles, la GST est principalement localisée au niveau de l'intestin moyen. La GST pourrait aussi jouer un rôle important dans la protection des tissus contre le stress oxydatif (Hyne & Maher, 2003; Babczynska *et al.*, 2006). L'histopathologie, comme outil d'analyse, peut également apporter des renseignements sur l'impact de l'environnement. Elle fournit des biomarqueurs qui sont sensibles puisque les tissus et les organes sont altérés même à faibles concentrations des contaminants (Abdallah, 2004; Szymas *et al.*, 2012).



Plusieurs travaux ont porté sur l'impact des acaricides sur les colonies d'abeilles, sur la composition physico-chimique du miel et de la propolis ainsi que sur les propriétés biologiques des produits de la ruche. Cependant, à ce jour, il n'existe pas de données scientifiques sur la relation entre la santé des colonies d'abeilles et la composition ainsi que les propriétés biologiques de leurs propolis ou de leurs miels respectives à l'exception d'une récente étude de Popova *et al.*, (2014) dans laquelle la composition chimique de la propolis a été prise comme critère pour comparer les colonies d'abeilles tolérantes et non tolérantes à l'acarien *V. destructor*. Aussi, de nombreux travaux ont porté sur les propriétés antibactériennes du miel et de la propolis. Cependant, en Algérie, des recherches limitées sur l'activité antimicrobienne du miel (Ouchemoukh *et al*, 2010; Ahmed *et al*, 2011; 2012) et de la propolis (Lahouel *et al.*, 2010; Rebiai *et al.*, 2011; Segueni *et al.*, 2011; Benhanifia *et al.*, 2013; Boufadi *et al.*, 2014) ont été réalisées.

De ce fait, cette thèse a été entreprise sur les abeilles domestiques locales, *Apis mellifera intermissa* afin d'évaluer:

A/ l'impact des acaricides utilisés dans la lutte contre *Varroa destructor* sur la santé des colonies d'abeilles:

(1) Par l'étude de la composition et l'activité antimicrobienne des miels et de la propolis des colonies d'abeilles traitées par le fluvalinate et l'acide oxalique en comparaison avec des colonies n'ayant reçu aucun traitement acaricide.

(2) Par l'étude de l'activité spécifique de la Glutathion S-Transférase et l'histopathologie de l'intestin moyen des abeilles suite à l'application topique de l'acide oxalique sur les ouvrières émergentes.

B/ L'activité antimicrobienne du miel et de la propolis à l'encontre des bactéries pathogènes transmises par les aliments.

MATERIEL
ET
METHODES



I. MATERIEL ET METHODES

1. Présentation de l'abeille, organisation sociale et technique d'élevage

1.1. Présentation de l'abeille

L'abeille algérienne appartenant à la lignée Africaine A est représentée par *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen, 1906) et *Apis mellifera sahariensis* (Baldensperger, 1924). La race *intermissa* est la plus répandue et son aire de répartition s'étend sur toute l'Afrique du Nord, du Maroc à la Tunisie (Cornuet *et al.*, 1988; Grissa *et al.*, 1990; Hepburn & Radloff, 1996, Barour *et al.*, 2011; Loucif-Ayad *et al.*, 2014). Sa position systématique est la suivante:

Embranchement:	Arthropodes
Sous embranchement :	Mandibulates
Classe :	Insectes
Sous-classe :	Ptérygotes
Ordre :	Hyménoptères
Sous-ordre :	Apocrites
Section :	Aculéates
Famille :	Apidés
Genre :	<i>Apis</i>
Espèce :	<i>Apis mellifera</i>
Sous-espèce :	<i>Apis mellifera intermissa</i> (Buttel-Reepen, 1906)

L'abeille domestique *A.mellifera* est un invertébré de la famille des Apidés, qui possède six pattes et deux paires d'ailes. Elle n'a pas de squelette interne mais dispose d'une enveloppe externe faite de chitine (exosquelette). Son corps comprend trois parties bien distinctes: la tête, le thorax et l'abdomen. Elle possède deux paires d'ailes membraneuses couplées par des crochets, des pièces buccales de type broyeur- lécheur, un cerveau bien développé et une parthénogenèse (Fig.1).

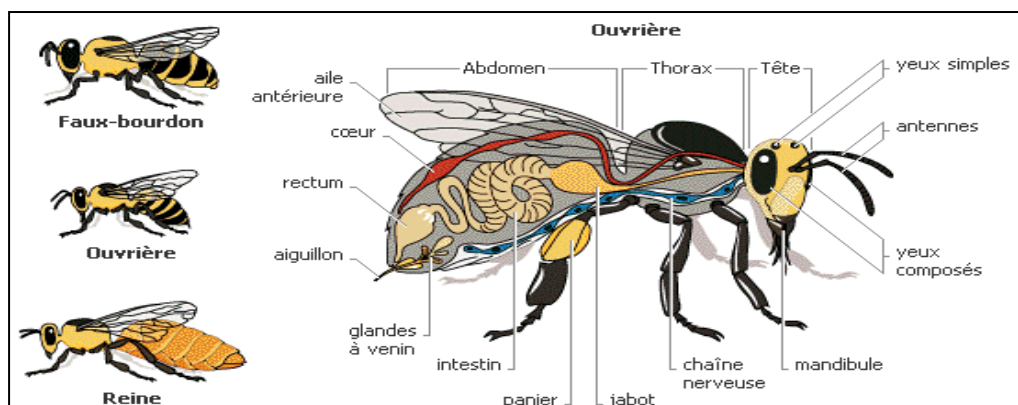


Figure 1. Morphologie de l'abeille (Hennebelle, 2010).

1.2. Organisation sociale

La colonie d'abeille est constituée d'une reine, des ouvrières et des faux bourdons (Fig.1). Fort différents sur le plan morphologique comme dans leur espérance de vie, les membres de chaque caste assurent une tâche particulière. Au sein de la ruche, aucun individu ne peut vivre seul (Clément, 2009). En fonction de la taille et du stade de développement de la colonie, l'effectif de la population peut varier de 20 000 à 80 000 individus, dont une reine, 1000 à 4000 mâles, le reste étant constitué par les ouvrières (Martin, 2001; Le Conte, 2002). Les reines et les ouvrières diploïdes résultent d'œufs fertilisés. La qualité et la quantité de la nourriture donnée aux larves femelles déterminent si une ouvrière ou une reine sera produite (Laidlaw & Page, 1997; Caron, 1999; Le Conte, 2004; Biri, 2010; Wendling, 2012). Les faux bourdons haploïdes dérivent d'œufs infertilisés, par parthénogenèse arrhénotoque, pondus par les reines ou les ouvrières (Caron, 1999).

La durée de développement des reines, des faux-bourdons et des ouvrières est de 16, 24 et 21 jours respectivement (Laidlaw & page, 1997; Caron, 1999; Marchenay & Bérard, 2007). Alors que les reines vivent pendant plusieurs années, les ouvrières ont une espérance de vie de 15 à 70 jours pour les abeilles d'été et, 170 à 243 jours pour celles d'hiver (Fluri, 1994). Les mâles dépassent rarement une durée de vie de 60 jours (Page & Peng, 2001).

1.3. Technique d'élevage

Les abeilles appartenant à la sous-espèce *intermissa* sont élevées au niveau d'un rucher situé dans la commune de Dréan, wilaya d'El-Tarf, dans le Nord-Est Algérien (36°42'N, 7°50'E) dans des ruches modernes de types Langstroth (Fig.2). Ces ruches ne font pas l'objet



de transhumance et les abeilles ne présentent pas de symptômes pathologiques et ne sont pas traitées avec des pesticides.

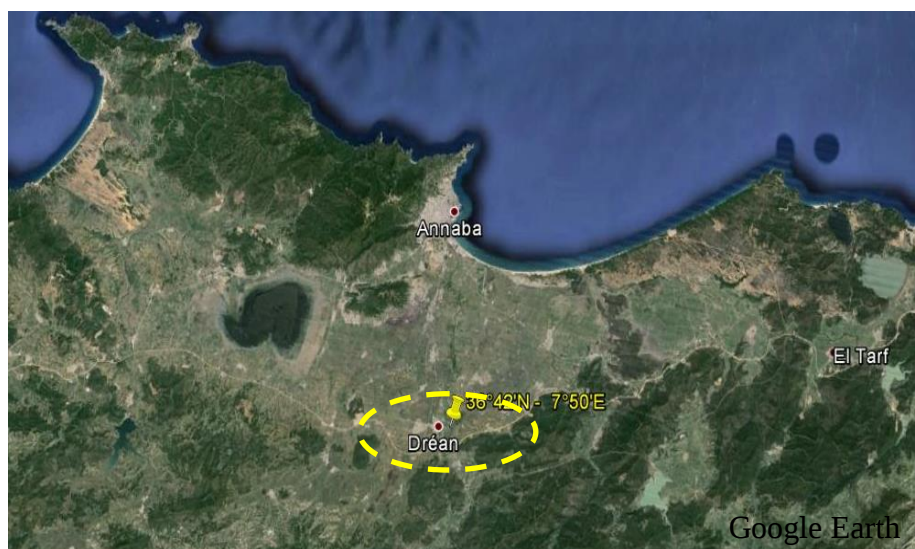


Figure 2. Position géographique du site d'échantillonnage du miel et de la propolis.

Avant les expérimentations, toutes les colonies d'abeilles ont été contrôlées afin d'estimer la densité des populations, la présence du couvain et la présence de nourriture dans chaque ruche afin de sélectionner un lot de 20 ruches homogènes. Trois groupes de ce lot comportant chacun cinq ruches chacun ont été traités avec des acaricides.

Le premier groupe a été traité avec le fluvalinate. Les deux autres groupes ont été traités avec l'acide oxalique à 3,5% (Charrière *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2011) et à 6% (Charrière, 2001). Le groupe témoin constitué de cinq autres ruches n'a subi aucun traitement. Toutes les expérimentations ont été effectuées durant la période de novembre-décembre en 2011.

2. Présentation des acaricides et traitements

Les traitements acaricides utilisés (fluvalinate et acide oxalique) sont des produits vétérinaires homologués, utilisés dans la lutte contre l'acarien ectoparasite de l'abeille *V. destructor*.



2.1. Présentation du fluvalinate

Le fluvalinate, de formule chimique $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ (fig.3) et dont le nom commercial est Apistan (Laboratoire Vita Europe), fait partie de la famille des pyréthrinoïdes. L'acaricide se présente sous forme de lanières à raison de 0,80g de fluvalinate par lanière. Deux lanières sont placées dans la ruche, entre les cadres et laissées en place six semaines (Fernandez & Coineau, 2002; Gregorc & Smoldis skerl, 2007; Lodesani *et al.*, 2008).

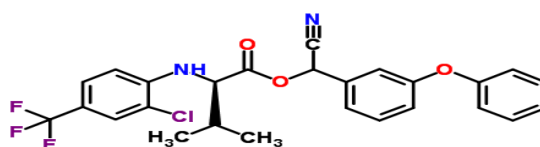


Figure 3. Structure chimique du fluvalinate (www. chemspider.com)

2.2. Présentation de l'acide oxalique

L'acide oxalique est un acide organique de formule chimique $H_2C_2O_4$ (fig.4). Il a été appliqué par dégouttement qui consiste à faire couler goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, 50 ml d'une solution d'acide oxalique (3,5g ou 6g d'acide oxalique + 100 ml eau + 50g sucre) sur les rayons et sur les abeilles du nid à couvain: 5 ml au niveau des neufs espaces situés entre les dix cadres et 2,5 ml au niveau des deux espaces formés entre le 1^{er} cadre et l'extrémité de la ruche et le 10^{ème} cadre et l'autre extrémité de la ruche (Gregorc & Poklukar, 2003; Gregorc & Smoldis Skel, 2006).

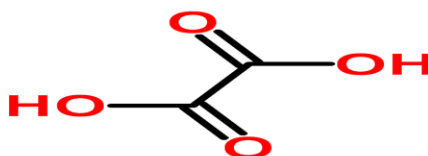


Figure 4. Structure chimique de l'acide oxalique (www. chemspider.com)



3. Prélèvement des échantillons de miel et de la propolis, conservation et extraction

3.1. Prélèvement et conservation du miel

Le miel operculé a été prélevé, directement sur les cadres des ruches sélectionnées avant et après traitement avec les acaricides à l'aide de seringues stériles. Le miel récolté est conservé dans des flacons stériles opaques à la lumière afin de préserver l'ensemble de ses propriétés antibactériennes. Les flacons sont rangés à l'abri de l'air et de l'humidité afin d'éviter les fermentations. Les échantillons du miel ont été par la suite exposés à des irradiations gamma à 25 Kilo Gray (kGy) afin de stériliser le miel. Cette stérilisation est sans conséquences sur l'activité antibactérienne du miel (Molan & Allen 1996; Tomczak, 2010; Werner & Laccourreye, 2011).

3.2. Prélèvement, conservation et extraction de la propolis

La propolis est récoltée avant et après traitement avec les acaricides grâce à une feuille en plastique déposée en haut des cadres au niveau de la ruche (Jean-Prost, 2005; Marchenay & Bérard, 2007; Donadieu, 2008) puis conservée dans des récipients opaques à la lumière. Trente grammes de propolis brute sont coupés en petits morceaux, broyés puis dilués dans 100 ml d'éthanol à 70% (Farnesi *et al.*, 2009). Ce solvant (éthanol à 70%) permet l'extraction d'un maximum de composants biologiquement actifs (Cunha *et al.* 2004; Medana *et al.*, 2008) et l'obtention d'extraits de propolis sans cire et riches en polyphénols (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

La solution est laissée à macération pendant sept jours, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette solution est par la suite filtrée (Orsi *et al.*, 2005; Gonsales *et al.*, 2006 ; Muli *et al.*, 2008) et le culot est redilué dans le même solvant renouvelé. Les filtrats sont regroupés et placés au congélateur pendant 24h puis filtrés afin d'enlever toute trace de cire. L'opération est répétée trois fois. Le filtrat final représente l'extrait éthanolique de la propolis (Miorin *et al.*, 2003). La solution subit une évaporation réalisée au bain marie à 50 °C (Kartal, 2003). Les résidus obtenus de chaque échantillon sont pesés et une solution mère à 0,1mg/ml (Kartal *et al.*, 2003; Gonsales *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006) de l'extrait sec de la propolis est préparée.



4. Présentation des souches microbiennes

4.1. Souches microbiennes testées

Sept souches microbiennes (six souches bactériennes et une souche fongique) ont été mises à notre disposition gracieusement par l'institut Pasteur d'Alger. Ce sont des souches à majorité pathogènes pour l'homme, souvent multi-résistantes aux antibiotiques, responsables de plusieurs types d'infections.

4.2. Choix des souches microbiennes

Bacillus subtilis (IPA): sont des bacilles à Gram positif, ne sont pas considérés comme pathogènes pour l'Homme mais peuvent contaminer les aliments et provoquer des intoxications (Moszer *et al.*, 2002).

Bacillus cereus (IPA): sont des bacilles Gram positif; impliqués dans les maladies microbiennes liées aux aliments (Mahler *et al.*, 1997; Lund *et al.*, 2000; Naranjo *et al.*, 2011).

Staphylococcus aureus (ATCC 25923R): sont des cocci Gram positif très fréquents chez l'Homme à l'état commensal ou pathogène. Ce sont des agents de suppurations, de septicémies, de toxi-infections, de chocs toxiques et d'infections nosocomiales (Dworkin & Falkow, 2006; Bannoehr *et al.*, 2007; Hanselman *et al.*, 2008).

Escherichia coli (ATCC 25922R): sont des bacilles Gram négatif, hôtes de l'intestin de l'homme et des animaux et très abondants dans les matières fécales. Ils sont responsables d'intoxications, d'infections spontanées des voies urinaires, de gastro-entérites et d'infections nosocomiales (Flandrois., 1997; Weese, 2008; Gyles & Fairbrother, 2010; Schultz & Geerlings, 2012).

Klebsiella pneumoniae (IPA): sont des bacilles Gram négatif, présents dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (Flandrois., 1997).

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27893R): sont des bacilles Gram négatif, responsables d'infections nosocomiales de plus en plus graves et fréquentes (Van Delckin & Iglewski, 1998; Strateva & Yordanov, 2009; Westman *et al.*, 2010).

Candida albicans (IPA 549): sont des levures qui provoquent des infections fongiques (candidoses) essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques (Delorme & Robert, 1997; Irish *et al.*, 2006).



5. Mesure des paramètres physico-chimiques du miel

5.1. Mesure de l'hygrométrie du miel

La mesure de l'hygrométrie a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre. Toutes les mesures ont été effectuées à 20°C (AOAC, 1990; Zerrouk *et al.*, 2011).

5.2. Mesure du pH

Dix grammes de chaque échantillon de miel ont été dilués dans 75 ml d'eau déminéralisée puis placés sur un agitateur. Par la suite, le pH de la solution obtenue a été mesuré avec un pH-mètre (Cortopassi-Laurine & Gelli, 1991; Bogdanov *et al.*, 2002).

5.3. Mesure de la conductivité électrique

La conductivité électrique a été déterminée par l'analyse conductimétrique d'une solution contenant 10 g de miel dans 75 ml d'eau distillée (Sancho *et al.*, 1992).

5.4. Mesure de la teneur en cendres

La teneur en cendre a été déterminée en tenant en compte la mesure de la conductivité électrique selon l'équation suivante: $X1 = (X2 - 0,143) / 1,743$ à 20°C, où X1 représente la valeur de la teneur en cendre et X2 la conductivité électrique exprimée en mS/cm (Piazza *et al.*, 1991; Bogdanov *et al.*, 1999; Zerrouk *et al.*, 2011).

6. Dosage des composés phénoliques du miel et de la propolis

6.1. Principe du dosage

Le Dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). 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 de polyphénols présents dans l'échantillon. Ainsi, la quantité de polyphénols pour chaque échantillon est déterminée par la projection de la valeur de la densité optique à 725 nm sur une courbe étalon d'un polyphénol standard (acide



gallique) réalisée dans les mêmes conditions (Fig.5). Le dosage de polyphénols totaux est effectué par la comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue 100-500 µl (Gulcin *et al.*, 2005).

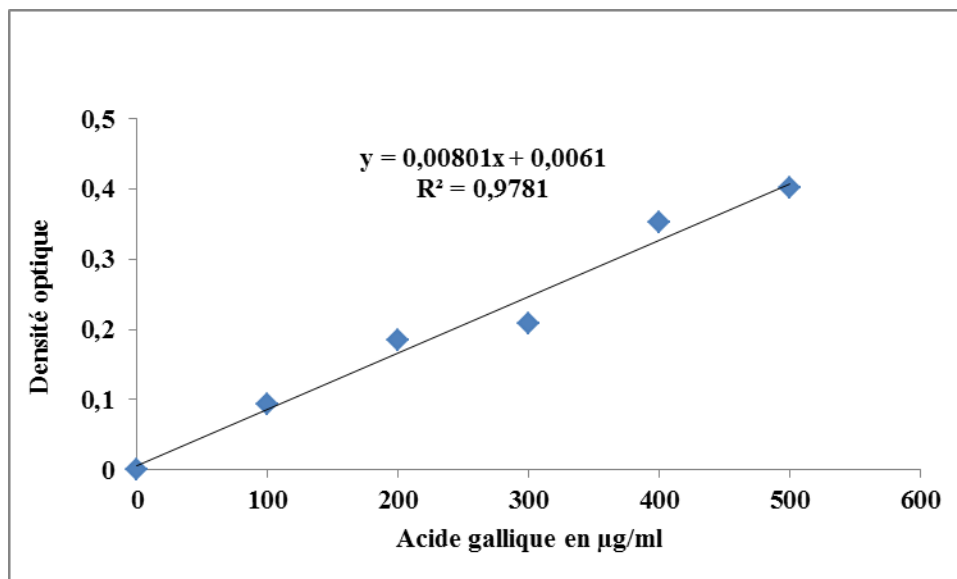


Figure 5. Courbe étalon du dosage des polyphénols (acide gallique comme standard).

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode de Woisky et Salatino (1998). Le réactif utilisé est une solution incolore de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 20%). 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 420 nm. La comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon de quercétine de concentration connue permet d'évaluer la teneur en flavonoïdes totaux (Fig.6).

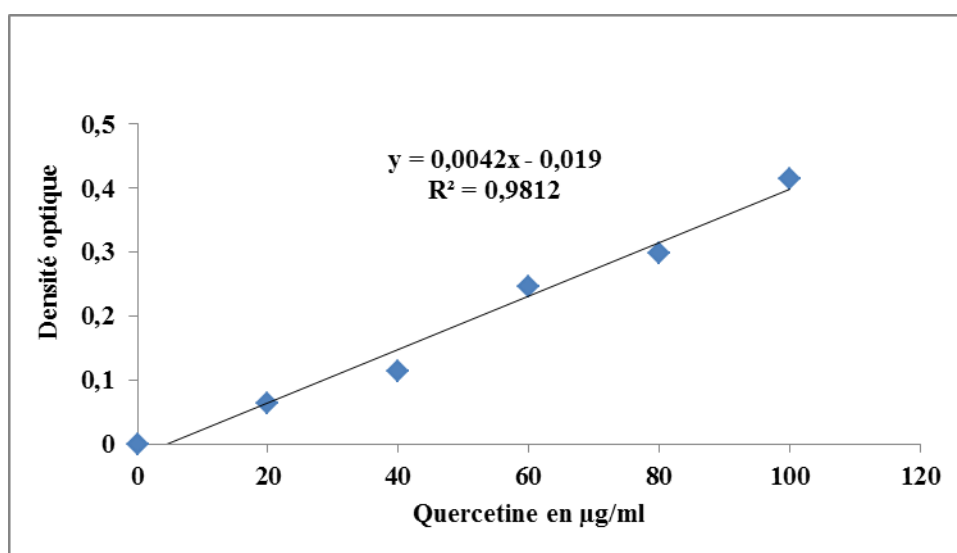


Figure 6. Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (quercétine comme standard).



6.2. Dosage des composés phénoliques du miel

6.2.1. Dosage des polyphénols totaux du miel

La méthode consiste à ajouter 0,1 ml de miel à 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,5 ml d'une solution de 75 mg/ml de Na_2CO_3 . Le mélange obtenu est incubé à température ambiante pendant environ une heure à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 725 nm. Une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par 100 grammes de miel (mg EAG/100g miel).

6.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux du miel

Les flavonoïdes totaux ont été évalués par colorimétrie en ajoutant à 0,1ml de miel, 0,5ml d' AlCl_3 (20%). Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de quercétine préparées à différentes concentrations (0-100 μl) (Zhishen *et al.*, 1999; Khalil *et al.*, 2012). Le mélange obtenu est incubé à température ambiante pendant environ une heure à l'abri de la lumière. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 420nm et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par 100 grammes de miel (mg EQ/100g miel).

6.3. Dosage des composés phénoliques de la propolis

6.3.1. Dosage des polyphénols totaux de la propolis

Les polyphénols totaux sont dosés de la manière suivante: à 0,5 ml d'extrait éthanolique de propolis sont ajoutés 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,5 ml d'une solution de 75 mg/ml de Na_2CO_3 . Le mélange obtenu est incubé à température ambiante pendant environ une heure à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 725 nm. Une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait éthanolique de propolis (mg EAG/g EEP).

6.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux de la propolis

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie à 0,5 ml d'extrait éthanolique de propolis sont ajoutés 0,5ml de AlCl_3 (20%). Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de quercétine préparées à différentes concentrations (0-100 μl) (Zhishen *et*



al.,1999). Le mélange obtenu est incubé à température ambiante pendant environ une heure à l'abri de la lumière. L'absorbance du mélange obtenue est mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à 420nm et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait éthanolique de propolis (mg EQ/g EEP).

7. Mesure de l'activité antimicrobienne du miel et de la propolis

7.1. Méthode de diffusion par disque sur gélose

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose (Bauer *et al.*, 1966; NCCLS, 2002).

La diffusion par disque se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien (dans notre cas, il s'agit du miel ou de la propolis) d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu de culture solide qui a étéensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. La diffusion par disque est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque. La diffusion du miel ou de la propolis dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration du miel ou de la propolis devient si diluée qu'elle ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, une zone d'inhibition est démarquée.

Réactivation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont réactivées à partir du milieu de conservation sur milieu de culture solide, non sélectif (Gélose Nutritive). La Gélose Nutritive est fondue au bain marie puis coulée dans des boîtes de pétri. Les boîtes sont ensuite refroidies et séchées pendant 20 minutes avant d'êtreensemencées. Chaque boîte de pétri est partagée de l'extérieur en trois parties (en forme de T) pour faciliter l'ensemencement. Une stérilisation de l'anse de platine à la chaleur est effectuée avant le prélèvement de chaque souche bactérienne et après chaque opération d'ensemencement. L'ensemencement se fait en étalant sur la surface de la gélose nutritive, la souche bactérienne sélectionnée. Les boîtes de pétri sont fermées après chaque opération puis renversées et mises en incubation dans un étuve à 37°C pendant 24 heures. Après cette période d'incubation, les boîtes sont retirées et les cultures pures et jeunes serviront à la préparation des suspensions bactériennes.



Préparation des suspensions bactériennes

Cinq à six colonies de souches bactériennes sont prélevées, grâce à une anse de platine stérile. Ces colonies sont dissociées dans un tube à essai stérile avec 10 ml d'eau physiologique stérile (une suspension en solution saline stérile (0,9% NaCl). La suspension est soigneusement homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland (illustré dans l'inoculum témoin) ou à une DO de 0,8 à 0,10 lue à 625nm (Andrew, 2009).

Ensemencement

L'ensemencement est réalisé selon la technique du NCCLS (2002). Le milieu de Mueller-Hinton est coulé dans des boîtes de pétri (4 mm d'épaisseur). Les boîtes sont refroidies et séchées à température ambiante puis sont ensemencées à partir des suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillons stériles. L'écouvillon est imbibé de la suspension bactérienne puis essoré contre la paroi interne du tube à essai. L'ensemencement se fait par des stries serrées, de haut en bas et l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose.

Préparation du miel et de la propolis

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne du miel sur la croissance des souches bactériennes et fongique, un prélèvement de 20µl d'une concentration préparée de miel de 100mg/ml est effectué (Al- Naama, 2009). Concernant la propolis, 0,1mg de l'extrait éthanolique sec de la propolis est placé dans 1ml d'éthanol (70%) (Kartal *et al.*, 2003; Gonsales *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006). Après homogénéisation, 20µl de ce mélange sont alors prélevés à l'aide d'une micropipette (Kartal *et al.*, 2003; Gonsales *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006).

Distribution des disques stériles

Des disques stériles de papier buvard de 6mm de diamètre sont saisis à l'aide d'une pince stérile et imprégnés de miel ou de propolis à tester. Les disques sont égouttés puis appliqués à la surface des boîtes précédemment ensemencées en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu. Un disque imprégné d'eau ou d'éthanol est placé au centre de la boîte et servira de témoin négatif (T-). Les boîtes de pétri ont été maintenues à 4C° (Tumin *et al.*, 2005) pendant deux heures afin que le produit testé se répande et diffuse dans le milieu (Ahmed *et al.*, 2012).



Des disques d'ampicilline et de nystatine ont été utilisés en tant que témoins positifs afin de tester l'activité antimicrobienne à l'encontre des bactéries et de *Candida albicans* respectivement.

Incubation

L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48h pour *Candida albicans*.

Lecture

Après avoir retiré les boîtes de l'étuve, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en millimètre de la zone d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur des boîtes fermées.

7.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel et de la propolis

7.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel

La concentration minimale inhibitrice (CMI) du miel à l'égard des souches microbiennes a été déterminée par macrométhode en milieu liquide selon la méthode décrite par Andrews (2001). Une série de dilutions du miel (50; 25; 12,5; 6,25 3,17 et 1,58 mg/ml) est déposée dans des tubes au niveau desquels il a été rajouté 1ml de BGT (Bouillon glucosé tamponé) et 0,1ml de l'inoculum fraîchement préparé. Une lecture à l'œil nu permet de déterminer la CMI visuelle qui correspond à la concentration dans le tube au niveau duquel il n'y a pas de croissance microbienne visible après 24h (bactéries) ou 48h (*Candida albicans*) d'incubation à 37°.

7.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la propolis

La détermination de la CMI par macrométhode en milieu liquide (Andrews, 2001) est établie à partir de l'extrait éthanolique de la propolis préparé à une concentration de 1000 µg/ml. Pour cela, une série de dilutions de l'EEP par l'éthanol (70%) est déposée dans des tubes (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 et 3,90 µg/ml) auxquels il a été rajouté 1ml de BGT et 1ml de l'inoculum fraîchement préparé. L'incubation est faite à 37C° pendant 24h pour les bactéries et 48h pour *Candida albicans*. Après incubation, la CMI visuelle est identifiée comme étant la plus petite concentration de la propolis qui inhibe la croissance de la bactérie à tester.



8. Test de toxicité: application topique de l'acide oxalique sur les abeilles ouvrières.

Les abeilles appartenant à la sous-espèce *intermissa* sont élevées dans des ruches modernes de type Langstroth au niveau d'un rucher expérimental situé au niveau de l'Université Badji-Mokhtar Annaba. Les abeilles ne présentent pas de symptômes pathologiques et ne sont pas traitées avec des pesticides. Les différents échantillons prélevés correspondent à des abeilles ouvrières adultes émergentes. Pour cela, un cadre à couvain est prélevé de la ruche et, est placé à l'obscurité dans une étuve à 34° C et une humidité relative de 60% (Hatjina *et al.*, 2013). Les abeilles émergentes sont récupérées et placées dans des cagettes expérimentales contenant chacune 20 abeilles. quatre lots d'abeilles sont constitués. Chaque lot comporte trois répétitions. Lors de l'expérience, les abeilles émergentes sont traitées individuellement avec une solution d'acide oxalique à 3,5% (Charrière *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2011), à 6% (Charrière, 2001) et à 20% (Schneider *et al.*, 2011). 5µL ont été appliqués sur le thorax et sur l'abdomen de l'ouvrière grâce à une micropipette. La concentration de 3,5% correspondant à 175µg d'acide oxalique /abeille, ce qui correspond à la dose moyenne qu'une abeille recevrait lors d'un traitement de la colonie. Les abeilles ont été nourries lors de l'expérience avec du pollen, du candi et de l'eau. Les ouvrières traitées sont récupérées après 24h, 48h et 72 h d'exposition aux différentes concentrations de l'acide oxalique afin de prélever leurs intestins moyens qui serviront au dosage de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase et également à l'étude histopathologique.

9. Dosages de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase chez les abeilles ouvrières

L'intestin moyen des abeilles a servi au dosage de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase (GST). Le dosage a été mené sur des abeilles ouvrières émergentes traitées avec différentes concentrations de l'acide oxalique à 3,5%, 6% et 20% pendant 24h, 48h et 72h.

Le dosage de l'activité de la GST a été réalisé selon la méthode de Habig *et al.* (1974) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat: le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un co-facteur: le glutathion



(GSH). L'intestin moyen a été récupéré et homogénéisé dans 1ml de tampon de phosphate¹ de sodium (0,1M; pH 6) à l'aide d'un broyeur à ultrasons. L'homogénat a été centrifugé à 14000 tours/min pendant 30 minutes et le surnageant récupéré a servi de source d'enzyme. Une fraction aliquote du surnageant de 0,2ml a été ajoutée à 1,2 ml du mélange [CDNB (1Mm) - GSH (5mM)]² dans un tampon phosphate (1mM; pH6). La lecture des absorbances a été effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200µl d'eau distillée à la place du surnageant. L'activité de l'enzyme a été déterminée d'après la formule suivante et, est exprimée en nM/min/mg de protéines dans nos résultats.

$$X = \frac{\delta \text{ DO / min}}{9,6} \times \frac{\text{Volume total de la cuve}}{\text{Prise d'essai} \times \text{mg de protéine}}$$

X: millimoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

$\delta \text{ DO}$: pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.

9,6: coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

¹- 61,5 ml (solution A) + 438,5 ml (solution B) + 21,3925 g de saccharose

-(solution A : 17,805 g Na_2HPO_4 dilués dans 500 ml eau distillée).

-(solution B : 6,39 g NaH_2PO_4 dilués dans 500 ml eau distillée).

²- 4,052 mg CDNB + 30,73 mg GSH + 0,8 ml éthanol + 20 ml tampon phosphate.

Aussi, les protéines ont été quantifiées selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu brillant de Coomassie G 250 comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard (1mg/ml). La lecture des absorbances a été réalisée à une longueur d'onde de 595 nm. Les teneurs des protéines ont été quantifiées grâce à l'équation de la droite de régression déterminée à partir de la courbe de référence (Fig.7).

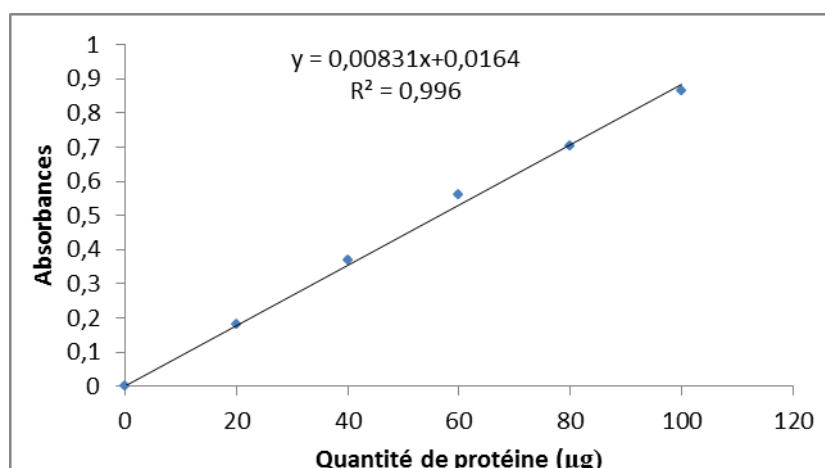


Figure 7. Dosage des protéines: droite de régression exprimant l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité d'albumine (µg).

10. Etude histopathologique de l'intestin moyen des abeilles ouvrières

L'intestin moyen a été prélevé chez les ouvrières traitées par application topique de l'acide oxalique (3,5% et 20%) après 24h, 48h et 72h de traitement et déposé dans du formol (à 10%) afin de réaliser les coupes histologiques. Le protocole histologique est réalisé selon Martoja et Martoja (1967):

Fixation: les échantillons de l'intestin moyen sont conservés dans du formol à 10% pendant 48 heures.

Pré-inclusion: les échantillons sont ensuite déshydratés dans deux bains successifs d'éthanol et trois bains de butanol, puis imprégnés dans de la paraffine; quatre bains de 24h ont été effectués.

Inclusion: l'inclusion des échantillons a été faite dans de la paraffine. Les tissus imprégnés de paraffine ont été ensuite inclus dans un bloc de paraffine.

Réalisation des coupes: les blocs de paraffine contenant les tissus sont coupés à l'aide d'un microtome à 3 µm d'épaisseur et les coupes sont déposées sur une lame de microscope. Les coupes sont ensuite étalées à l'aide d'une plaque chauffante à 30°C et séchées à l'étuve à 60°C pendant 1 heure.

Coloration: la coloration hématoxyline-éosine a été réalisée. Les tissus sont déparaffinés par des bains successifs de xylène, puis hydratés dans de l'alcool avant d'être plongés dans les colorants, rincés par des bains d'alcool, puis de xylène.



Les préparations histologiques ont été observées sous un microscope (Leica ICC, 50 HD) et photographiées à l'aide d'une caméra digitale incorporée.

11. Localisation des régions de prélèvement des échantillons de miel et de la propolis pour l'étude de l'activité antimicrobienne à l'encontre des bactéries pathogènes transmises par les aliments

Les échantillons de miel et de la propolis ont été récoltés à partir des ruchers d'*Apis mellifera intermissa* situés dans quatre régions du Nord-Est Algérien: Seraïdi (36°54'N, 7°37'E), Chetaïbi (36°59'N, 7°19' E), Berrahal (36°50'N, 7°26'E) et El-Bouni (36°49'N, 7°39'E). Seraïdi et Chetaïbi sont situés loin de la circulation routière et présentent une richesse florale mellifère très diversifiée comparativement à Berrahal et El-Bouni (Fig.8). Tous les échantillons ont été récoltés en septembre 2013.



Figure 8. Localisation des régions d'échantillonnage du miel et de la propolis.



L'activité antimicrobienne du miel et de la propolis a été testée sur quatre souches bactériennes transmises généralement par les aliments: *Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R).

12. Analyses statistiques

Les données relatives aux diamètres des zones d'inhibition, aux teneurs des composés phénoliques, aux paramètres physico-chimiques, à l'activité spécifique de la GST sont exprimées en moyennes $\pm$ standard erreur de la moyenne ($m \pm SEM$). L'analyse de la variance à un critère de classification et le test de Tukey au seuil de $p = 0,05$ ont été appliqués. Pour toutes les séries de données, l'égalité des variances a été contrôlée par les tests de Bartlett et de Brown-Forsythe avant l'application de l'analyse de la variance. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad software, La Jolla California, USA, [www. Graphpad.com](http://www.Graphpad.com)).

CHAPITRE I

**Impact de deux acaricides
(fluvalinate et acide oxalique) sur
*Apis mellifera intermissa***

RESULTATS & DISCUSSION



CHAPITRE I: Impact de deux acaricides (fluvalinate et acide oxalique) sur *Apis mellifera intermissa*.

I. RESULTATS

1. Comparaison des paramètres physico-chimiques du miel avant et après traitement aux acaricides

Les caractéristiques physico-chimiques du miel, le pH; la teneur en eau (%), la conductivité électrique (mS/cm) et la teneur en cendres (%) de chaque échantillon du miel ont été mesurés. Les résultats de l'analyse de la variance montrent qu'il n'y a aucune différence significative pour chaque paramètre mesuré ($p > 0,05$), aussi bien avant traitement (Tab.1) qu'après traitement aux acaricides (Tab.2).

Tableau 1. Comparaison des valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques du miel avant traitement aux acaricides ($m \pm SEM$; $n=15$).

Traitements	Hygrométrie (%)	pH	Conductibilité électrique (mS/cm)	Teneur en cendres (%)
Témoin	$17,55 \pm 0,55^a$	$3,50 \pm 0,11^a$	$0,42 \pm 0,05^a$	$0,16 \pm 0,03^a$
Fluvalinate	$17,15 \pm 1,15^a$	$3,70 \pm 0,03^a$	$0,34 \pm 0,10^a$	$0,11 \pm 0,06^a$
Acide oxalique (3,5%)	$17,25 \pm 0,25^a$	$3,68 \pm 0,06^a$	$0,63 \pm 0,11^a$	$0,28 \pm 0,09^a$
Acide oxalique (6%)	$17,23 \pm 0,26^a$	$3,65 \pm 0,03^a$	$0,47 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^a$

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $p > 0,05$.



Tableau 2. Comparaison des valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques du miel après traitement aux acaricides ($m \pm SEM$; $n=15$).

Traitements	Hygrométrie (%)	pH	Conductibilité électrique (mS/cm)	Teneur en cendres (%)
Témoin	$17,68 \pm 0,22^a$	$3,03 \pm 0,09^a$	$0,31 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,04^a$
Fluvalinate	$17,44 \pm 0,63^a$	$3,92 \pm 0,05^a$	$0,34 \pm 0,05^a$	$0,11 \pm 0,07^a$
Acide oxalique (3,5%)	$17,84 \pm 0,60^a$	$4,61 \pm 0,18^a$	$0,28 \pm 0,07^a$	$0,17 \pm 0,09^a$
Acide oxalique (6%)	$18,58 \pm 0,51^a$	$3,78 \pm 0,05^a$	$0,12 \pm 0,04^a$	$0,15 \pm 0,06^a$

Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $p > 0,05$.

En général, le miel est acide et son pH varie de 3,03 à 4,61. La teneur en eau varie de 17,15 à 18,58%. La conductivité électrique (mS/cm) dans les échantillons de miel varie de 0,12 à 0,63 et la teneur en cendres est généralement petite (de 0,11 à 0,28 %).

2. Comparaison des composés phénoliques du miel avant et après traitement aux acaricides

2.1. Teneurs en polyphénols totaux du miel

La teneur en polyphénols totaux des échantillons de miel a été déterminée par la méthode de folin- Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par 100g de miel. Les valeurs des teneurs des polyphénols totaux varient de 168,8 à 191,6 et de 76,21 à 179,2 mg EAG/100g de miel entre les quatre groupes expérimentaux, avant et après traitement aux acaricides respectivement. Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 9.

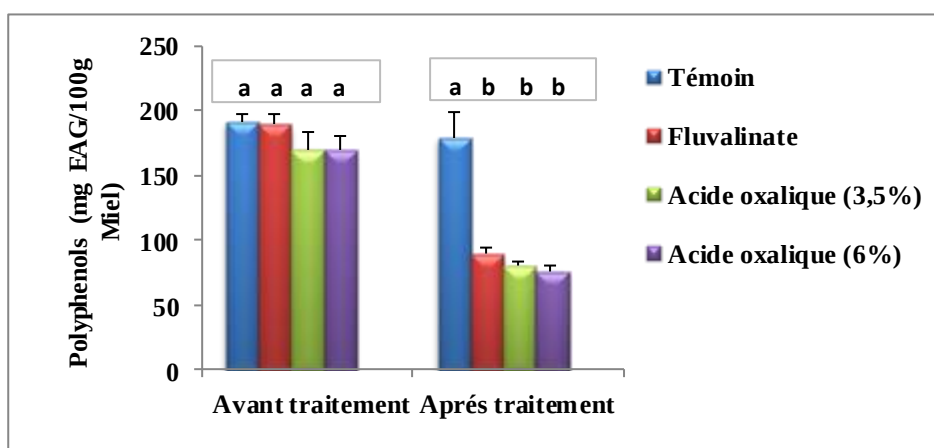


Figure 9. Teneurs en polyphénols totaux du miel avant et après traitements aux acaricides ($m \pm SEM$; $n=15$).

(Pour chaque groupe, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p < 0,05$).

Avant traitement, aucune différence significative n'est observée entre les quatre groupes expérimentaux. Cependant, après traitement, la comparaison des moyennes des teneurs en polyphénols montre des différences significatives entre les groupes témoins et traités. Les teneurs en polyphénols totaux sont significativement plus faibles ($p < 0,0001$) au niveau des échantillons de miel récoltés des ruches traitées au fluvalinate et à l'acide oxalique (3,5% et 6%) comparativement aux échantillons récoltés au niveau des ruches n'ayant pas été exposées aux acaricides.

2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux du miel

La teneur des flavonoïdes totaux des échantillons de miel a été déterminée par la méthode de Woisky et Salatino (1998). Les valeurs sont exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par 100 grammes de miel. Les teneurs en flavonoïdes varient de 93,08 à 108 et de 38 à 91,49 mg EQ/100g de miel entre les groupes expérimentaux, avant et après traitement aux acaricides respectivement. Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 10.

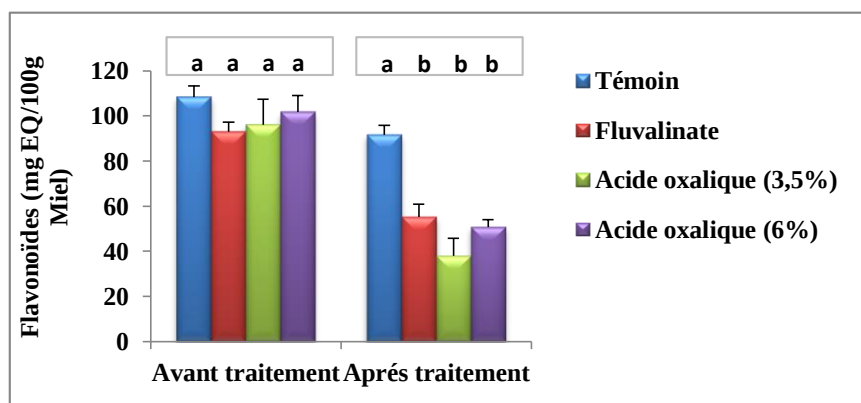


Figure 10. Teneurs en flavonoïdes totaux du miel avant et après traitements aux acaricides ($m \pm SEM$; $n=15$).

(Pour chaque groupe, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p < 0,05$).

Les résultats montrent, qu'avant traitement, aucune différence significative n'a été constatée entre les quatre groupes expérimentaux concernant les teneurs en flavonoïdes totaux du miel ($p > 0,05$). Par contre, après traitement, la comparaison des teneurs en flavonoïdes totaux montre des différences significatives entre les échantillons de miel des groupes témoins et traités ($p < 0,0001$).

3. Analyse de l'activité antimicrobienne du miel

3.1. Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents échantillons de miel testés vis-à-vis des sept souches microbiennes montre que la totalité des miels présente une activité antimicrobienne (Fig.11). Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes avant et après traitement aux acaricides sont représentées au niveau de la figure 12.

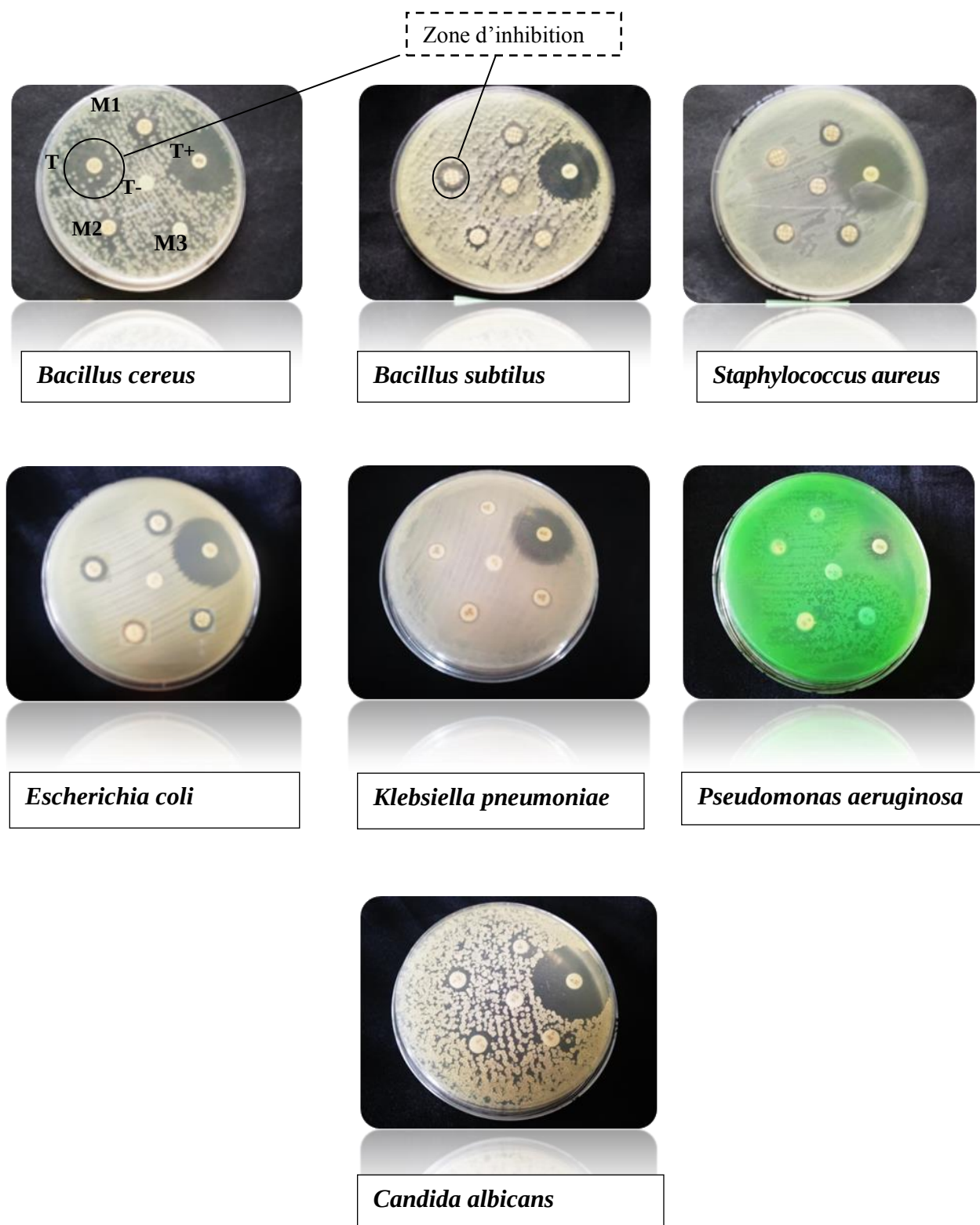


Figure 11. Présentation des résultats de l'activité antimicrobienne du miel à l'égard des sept souches microbiennes.

[T+: Témoin positif (Ampicilline, Nystatine); T-: Témoin négatif (Eau); M₁, M₂, M₃: Echantillons Miel; T: Miel Témoin]

(Photos prises par N. NEDJI au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université d'Annaba).

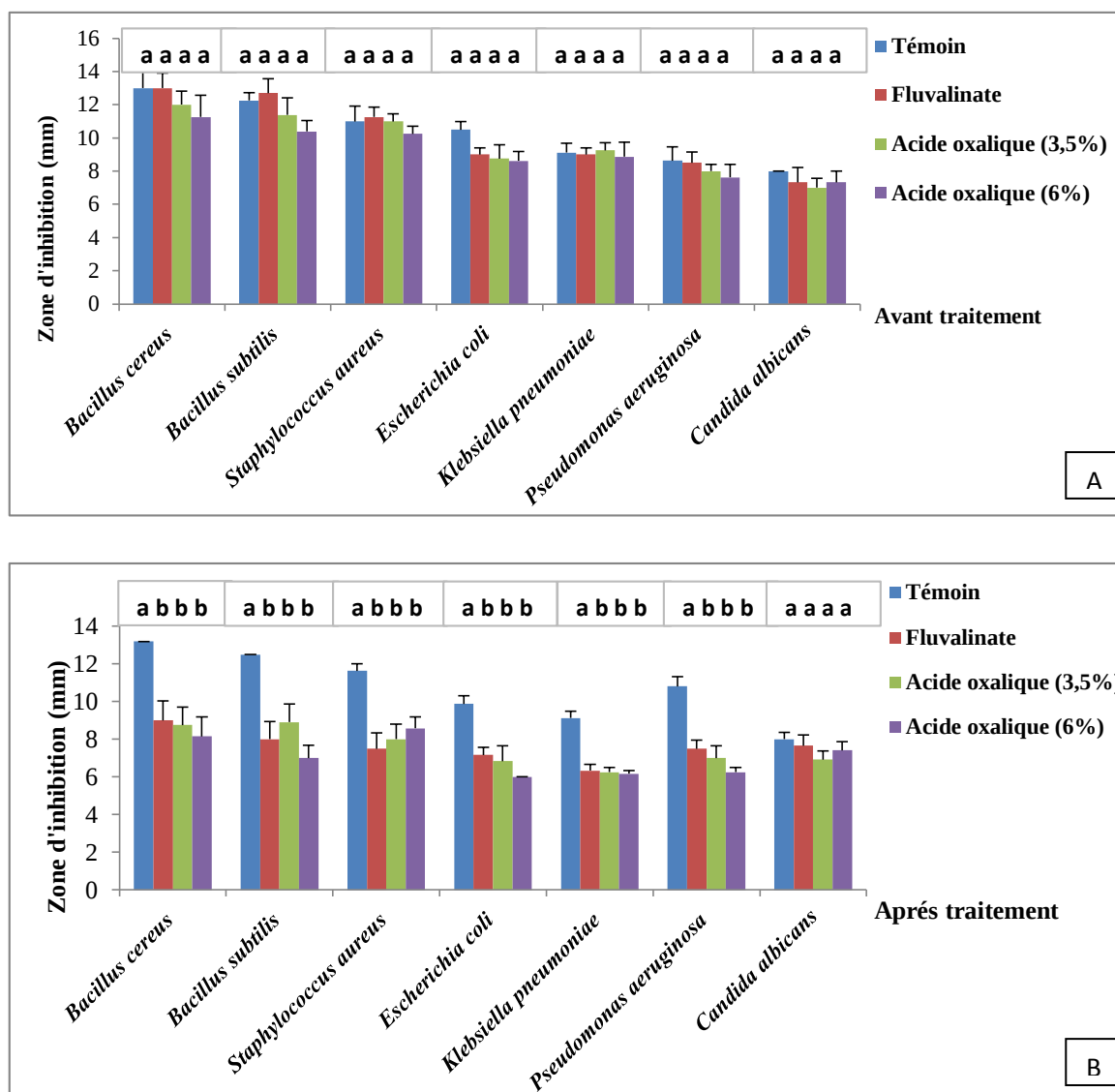


Figure 12. Diamètres des zones d'inhibition (mm) du miel avant traitement (A) et après traitement (B) aux acaricides pour chaque souche microbienne ($m \pm SEM$; $n=15$).

(Pour chaque souche, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p < 0,05$).

Les résultats montrent qu'avant traitement et pour chaque souche testée, aucune différence significative dans les diamètres des zones d'inhibition n'a été constatée aussi bien pour les souches bactériennes que pour la souche de *Candida albicans*. Après les traitements aux acaricides, les résultats montrent que les diamètres des zones d'inhibition pour chaque type de bactérie sont significativement plus faibles dans les miels collectés au niveau des colonies traitées avec le fluvalinate et l'acide oxalique comparativement aux miels des colonies témoins. *Candida albicans* semble peu sensible à l'effet du miel. Les témoins



positifs, l'ampicilline et la nystatine ont présenté des diamètres d'inhibition de 12-34mm et de 11-18mm respectivement.

3.2. Concentration minimale inhibitrice du miel

Les données relatives à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'activité antimicrobienne du miel à l'égard de chaque souche microbienne avant et après traitement aux acaricides sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3. Concentrations minimale inhibitrice du miel (mg/ml) avant et après traitement aux acaricides pour chaque souche microbienne ($m \pm SEM$; $n=15$).

Microorganismes	CMI Miel (mg/ml)							
	Avant traitement				Après traitement			
	Témoin	Fluvalinate	Acide oxalique (3,5%)	Acide oxalique (6%)	Témoin	Fluvalinate	Acide oxalique (3,5%)	Acide oxalique (6%)
<i>Bacillus cereus</i>	3,17	3,17	6,25	6,25	3,17	25	12,5	25
<i>Bacillus subtilis</i>	6,25	3,17	6,25	6,25	6,25	25	12,5	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	25	25	25
<i>Escherichia coli</i>	12,5	25	12,5	12,5	12,5	25	25	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,5	25	12,5	12,5	12,5	25	25	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5	25	12,5	12,5	6,25	25	25	25
<i>Candida albicans</i>	25	50	25	50	50	50	25	50

Le tableau représente les données concernant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'activité antimicrobienne du miel à l'égard de chaque souche microbienne avant et après traitement aux acaricides. Il en résulte que toutes les souches ont été affectées par les miels et que le degré d'inhibition de leur croissance varie en fonction de la souche microbienne considérée et le type de traitement.

Concernant les bactéries Gram positif, les résultats montrent que, avant traitement, les valeurs des CMI du miel varient de 3,17 à 6,25mg/ml. Après traitement, les valeurs des CMI augmentent pour atteindre un maximum de 25mg/ml. Les CMI obtenues à l'encontre des



bactéries Gram négatif varient de 12,5 à 25mg/ml avant traitement et de 6,25 à 50mg/ml après traitement. Les valeurs des CMI du miel à l'encontre de *Candida albicans* varient de 25 à 50mg/ml aussi bien avant traitement qu'après traitement aux acaricides.

4. Comparaison des composés phénoliques de la propolis avant et après traitement aux acaricides

4.1. Teneur en polyphénols totaux de la propolis

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques de la propolis ont été mesurées et exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par g de l'extrait éthanolique de la propolis (mg EAG/g EEP). Les teneurs en polyphénols totaux avant et après traitement sont illustrées dans la figure 13.

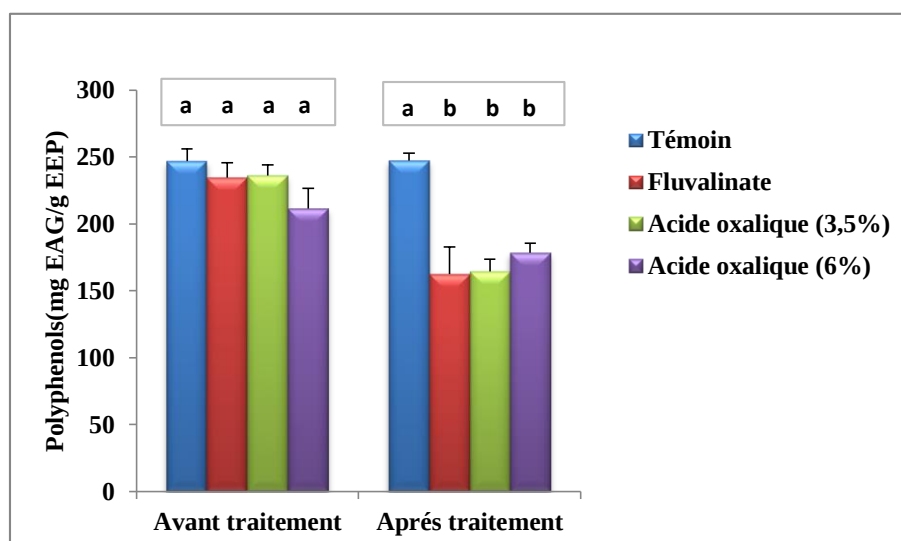


Figure 13. Teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques de la propolis avant et après traitement aux acaricides ($m \pm SEM$; $n=15$).

(Pour chaque groupe, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p<0,05$).

Avant le traitement par les acaricides, les teneurs en polyphénols totaux des EEP sont similaires entre les quatre groupes expérimentaux. Cependant, après traitement, des faibles teneurs sont observées au niveau des échantillons d'EEP des colonies traitées aux acaricides par rapports aux témoins ($p<0,0001$).

4.2. Teneurs en flavonoïdes totaux de la propolis

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques de la propolis sont exprimées en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait éthanolique de propolis



(mg EQ/g EEP). Les résultats obtenus avant et après traitement aux acaricides sont illustrés dans la figure 14.

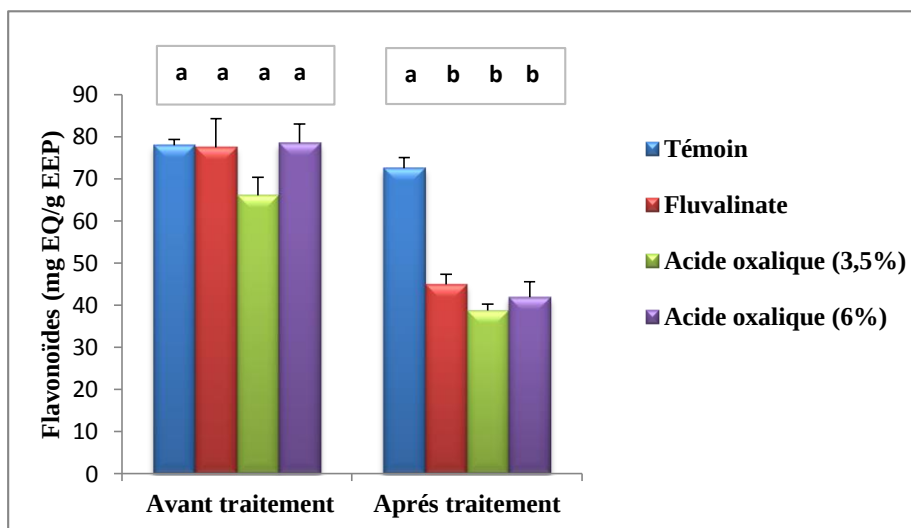


Figure 14. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques de la propolis avant et après traitements aux acaricides ($m \pm SEM$; $n=15$).

(Pour chaque groupe, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p < 0,05$).

Les résultats montrent qu'avant les traitements aux acaricides, aucune différence significative n'a été constatée entre les quatre groupes expérimentaux de l'EEP concernant les teneurs en flavonoïdes totaux. Par contre, après traitements la comparaison des moyennes montre des différences significatives dans les teneurs entre les groupes témoins et traitées ($p < 0,001$).

5. Analyse de l'activité antimicrobienne de la propolis

5.1. Diamètre des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents échantillons des EEP testés vis-à-vis des sept souches microbiennes montre que la totalité des EEP présente une activité antimicrobienne (Fig.15). Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches avant et après traitement aux acaricides sont mentionnées dans la figure 16.

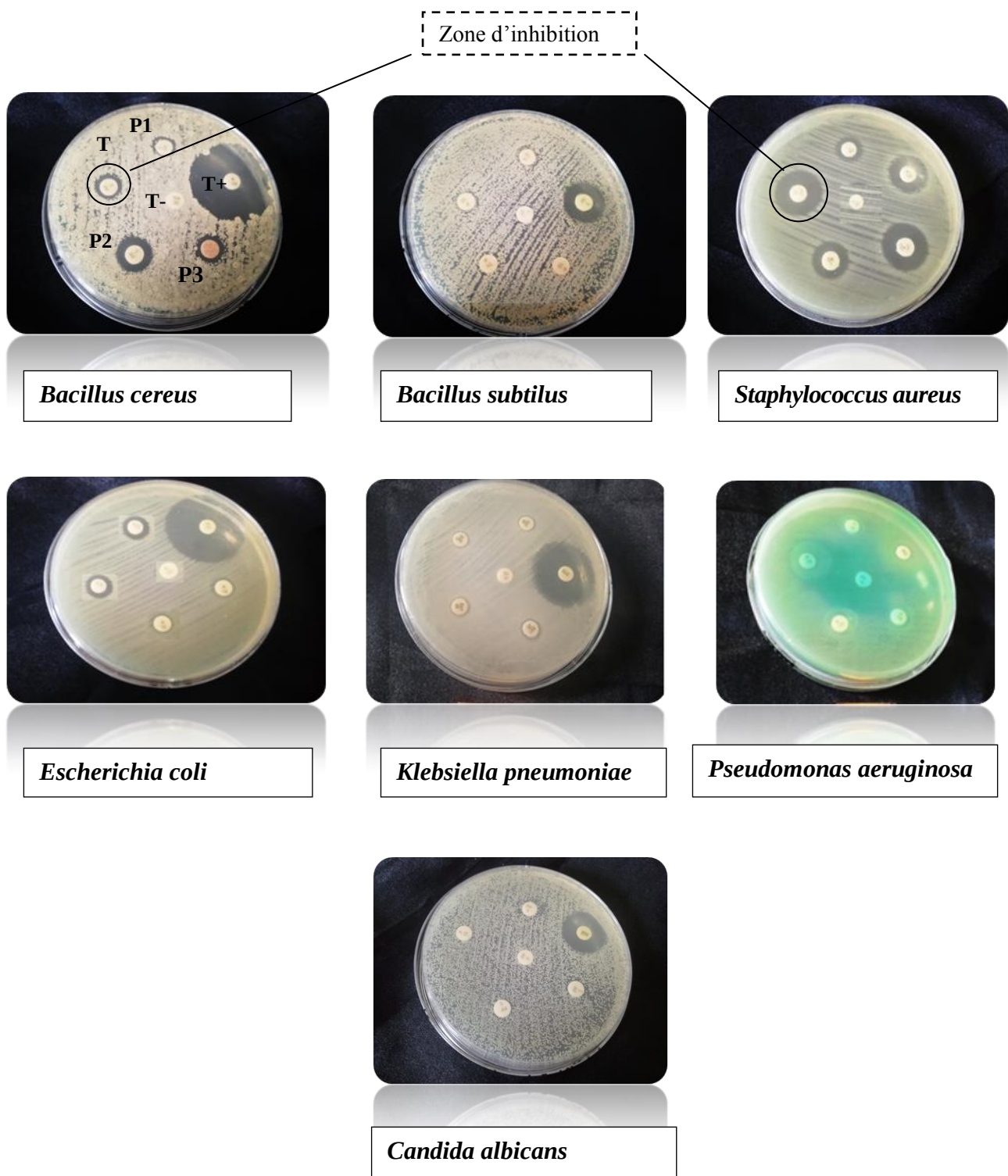


Figure 15. Présentation des résultats de l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques de la propolis à l'égard des sept souches microbiennes.

[T+: Témoin positif (Ampicilline, Nystatine); T-: Témoin négatif (Ethanol); P₁, P₂, P₃: Echantillons Propolis; T: Propolis Témoin]

(Photos prises par N. NEDJI au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Université d'Annaba)

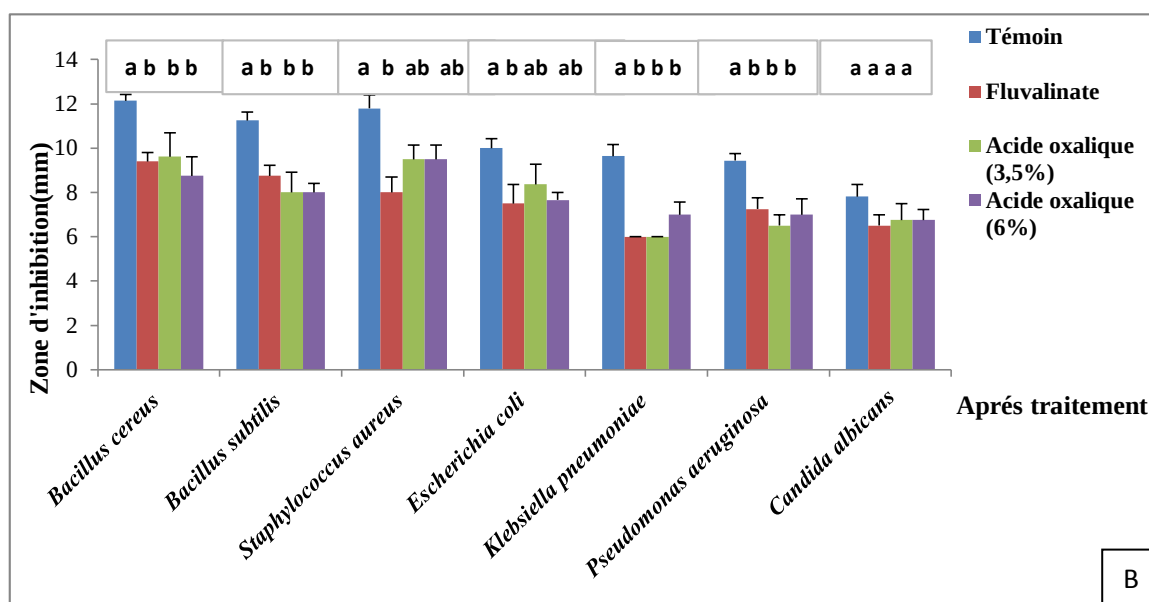
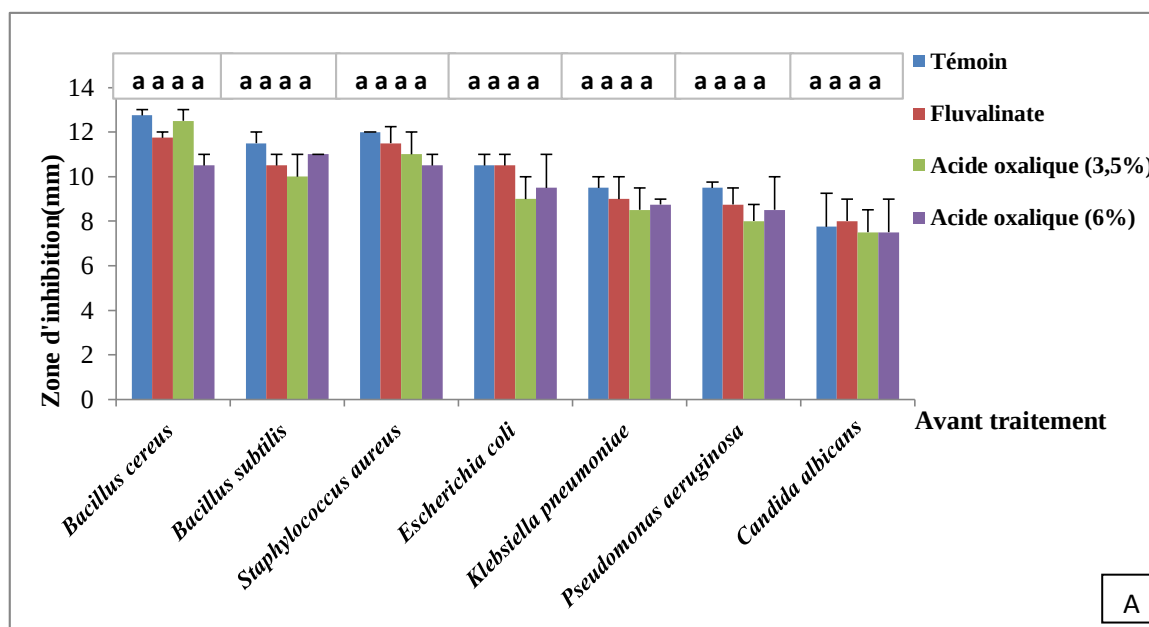


Figure 16. Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits éthanoliques de la propolis avant traitement (A) et après traitement (B) aux acaricides pour chaque souche microbienne ($m \pm SEM$; $n=15$).

(Pour chaque souche, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p < 0,05$).

Les résultats montrent un effet traitement sur les diamètres des zones d'inhibition de l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques de la propolis pour chaque souche bactérienne. Les diamètres des zones d'inhibition sont significativement plus faibles dans les



extraits éthanoliques de la propolis issus des colonies traitées avec le fluvalinate et l'acide oxalique comparativement aux extraits éthanoliques de la propolis des colonies non traitées. *Candida albicans* semble être faiblement sensible à l'effet des EEP. Les témoins positifs, l'ampicilline et la nystatine ont présenté des diamètres d'inhibition de 12-34mm et de 11-18mm respectivement.

5.2. Concentration minimale inhibitrice de la propolis

Les données relatives à la CMI des EEP à l'encontre de chaque souche testée avant et après traitement aux acaricides sont mentionnées dans le tableau 4.

Tableau 4. Concentration minimale inhibitrice des extraits éthanoliques de la propolis (µg/ml) avant et après traitement aux acaricides pour chaque souche microbienne (m ± SEM; n=15).

Microorganismes	CMI Propolis (µg/ml)							
	Avant traitement				Après traitement			
	Témoin	Fluvalinate	Acide oxalique (3,5%)	Acide oxalique (6%)	Témoin	Fluvalinate	Acide oxalique (3,5%)	Acide oxalique (6%)
<i>Bacillus cereus</i>	15,62	62,5	15,62	31,25	15,62	62,5	31,25	62,5
<i>Bacillus subtilis</i>	15,62	15,62	15,62	31,25	15,62	31,25	31,25	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,62	15,62	15,62	15,62	15,62	62,5	31,25	62,5
<i>Escherichia coli</i>	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	62,5	62,5	125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	125	62,5	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,25	31,25	31,25	62,5	31,25	62	62,5	125
<i>Candida albicans</i>	250	250	250	500	250	500	250	500

Une inhibition de la croissance de toutes les souches testées avant et après traitement aux acaricides est observée. Les valeurs des CMI varient entre 15,62- 62,5µg/ml avant traitement et entre 31,25- 125 µg/ml après traitement au fluvalinate et à l'acide oxalique pour les souches microbiennes. *Candida albicans* présente les valeurs des CMI les plus élevées (250-500 µg/ml).



6. Effet de l'acide oxalique par application topique sur l'activité spécifique de la Glutathion S-Transférase des ouvrières *d'A.mellifera intermissa*

L'acide oxalique, à différentes concentrations (3,5%, 6% et 20%), a été administré par application topique chez les ouvrières *d'A.mellifera intermissa* nouvellement émergées. L'effet de cet acaricide a été évalué après différents temps d'exposition (24h, 48h et 72h) sur l'activité spécifique de la GST des ouvrières. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 17.

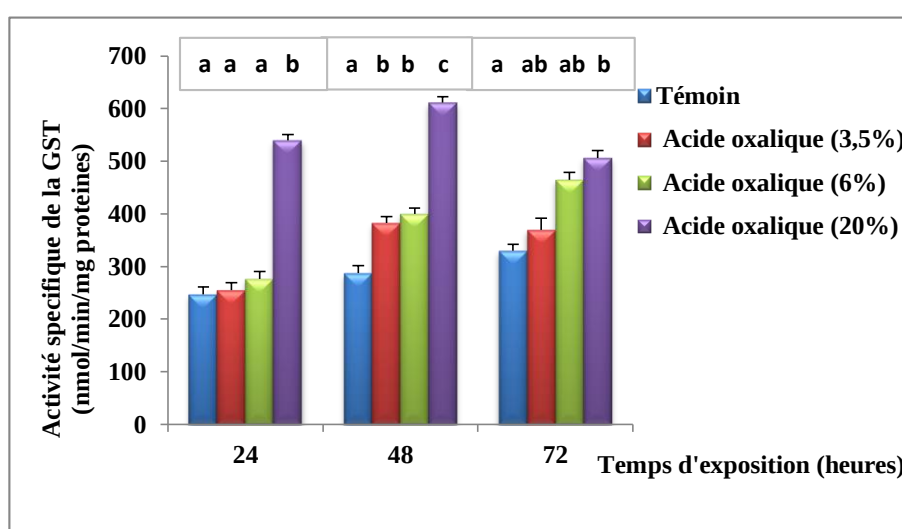


Figure 17: Activité spécifique de la glutathion S-transférases (nmol/min/mg de protéines) de l'intestin moyen des ouvrières nouvellement émergées après application topique de l'acide oxalique.

(Pour chaque temps, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements $p < 0,05$).

Les résultats obtenus montrent que l'activité spécifique de la GST est induite de manière significative chez les ouvrières nouvellement émergées et ayant reçu, par application topique, différentes concentrations d'acide oxalique après 24h ($p < 0,01$); 48h ($p < 0,0001$) et 72h ($p < 0,01$) de traitement. A faible concentration, l'activité spécifique de la GST n'a été induite que 48h après l'application de l'acide oxalique alors que l'application de l'acide oxalique à 20% a entraîné une augmentation de l'activité de la GST 24h après traitement. Après 72h, l'augmentation de l'activité spécifique de la GST est plus prononcée en présence de la forte concentration de l'acaricide.



7. Effet de l'acide oxalique sur l'histopathologie de l'intestin moyen des ouvrières d'*A.mellifera intermissa*

Des coupes histologiques de l'intestin moyen des ouvrières nouvellement émergées et ayant été traitées par application topique, à faible (3,5%) et à forte (20%) concentrations de l'acide oxalique après 24h, 48h et 72h de traitement sont illustrées dans les figures 18 et 19.

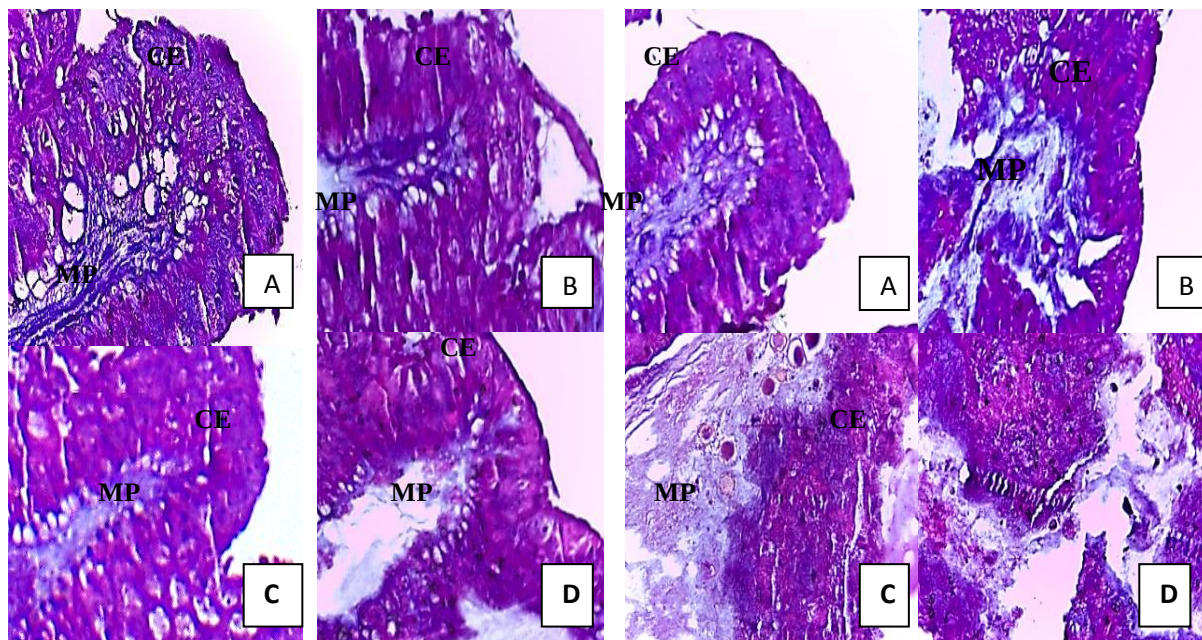


Figure 18. Images microscopiques de l'épithélium intestinal des abeilles traitées par l'acide oxalique (3,5%), abeille témoin (A), 24 h (B) 48 h (C) et 72 h (D) après traitement. (coloration par l'hématoxyline et éosine) Gr× 40.

MP: Membrane Périrrophique
CE: Cellules Epitheliales.

Figure 19. Images microscopiques de l'épithélium intestinal des abeilles traitées par l'acide oxalique (20%), abeille témoin (A), 24 h (B) 48 h (C) et 72 h (D) après traitement. (coloration par l'hématoxyline et éosine) Gr× 40.

MP: Membrane Périrrophique
CE: Cellules Epitheliales.

L'épithélium intestinal des abeilles traitées par application topique de l'acide oxalique à 3,5%, ne semble pas présenter des altérations tissulaires 24h (Fig.18 B) et 48h (Fig.18 C) après le traitement. Après 72h, une large zone dénudée est observée (Fig.18 D) reflétant des dégénérescences cellulaires provoquées par cet acaricide. L'application topique de l'acide oxalique à 20%, entraîne des altérations tissulaires après 24h (Fig.19 B), qui s'accroissent 48h



après le traitement où une large zone dénudée est marquée (Fig. 19C). Après 72h, de sévères détériorations cellulaires caractérisent l'épithélium intestinal des abeilles traitées (Fig. 19D) comparativement aux témoins (Fig. 19A).

I. DISCUSSION

Plusieurs études ont porté sur l'efficacité des acaricides dans la lutte anti-varroa mais comparativement, peu de travaux ont traité l'impact de ces acaricides sur l'abeille. De même, de nombreuses recherches ont porté sur l'analyse des composants du miel et de la propolis et de leurs propriétés biologiques mais sans établir de relation entre la qualité de ces produits de la ruche et l'état de santé des colonies d'abeilles. Dans cette étude, nous avons quantifié les composants et les activités antimicrobiennes du miel et de la propolis issus de colonies d'abeilles ayant été traitées avec du fluvalinate et de l'acide oxalique et nous les avons comparés avec ceux des colonies non traitées au niveau d'un même rucher.

L'activité antibactérienne de miel est attribuée à plusieurs propriétés, essentiellement à son effet osmotique, son acidité (Molan, 1992; Cooper *et al.*, 2002; Assie, 2004, Kwakman & Zaat, 2012), à la production du peroxyde d'hydrogène (Halliwell & Cross, 1994; Saissy *et al.*, 1995; Assie, 2004; Demara & Angert, 2004; Watt *et al.*, 2004; Orru *et al.*, 2010; Kacaniova *et al.*, 2011) ainsi qu'à la présence de composés phénoliques (White & Subers, 1963; Abd-Elaal *et al.*, 2007; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010). Aussi, cette activité dépend de la defensine-1 (Jonard *et al.*, 2006; Kwakman *et al.*, 2010) et de la présence des facteurs phytochimiques (Molan & Russel, 1988; Snow & Manley-Harris, 2004; Yao *et al.*, 2004; Halawani, 2006; Mavric *et al.*, 2008; Kwakman & Zaat, 2012; Sulaiman *et al.*, 2012).

Comme les paramètres physico-chimiques du miel affectent la qualité du miel et donc ses propriétés biologiques, plusieurs paramètres à savoir l'hygrométrie, le pH, la conductivité électrique et la teneur en cendres ont alors été mesurés. Les valeurs obtenues ont montré que les propriétés des miels provenant des colonies traitées aux acaricides sont similaires à celles des miels des colonies témoins écartant ainsi toute interférence avec l'activité antimicrobienne des différents miels testés.

Quant aux composés phénoliques, les miels des abeilles ayant subi des traitements acaricides ont montré des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux relativement basses ainsi que des diamètres des zones d'inhibition plus faibles à l'égard des souches microbiennes comparativement aux miels des colonies témoins. De même, les valeurs des CMI des miels



vis-à-vis des souches testées sont plus faibles quand les miels sont récoltés au niveau des colonies n'ayant pas été traitées aux acaricides.

Comme les polyphénols influencent l'aspect et les propriétés fonctionnelles du miel (Khalil *et al.*, 2011; Cimpoiu *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2012), les variations dans l'activité antimicrobienne observées dans nos échantillons de miel sont probablement en relation avec les variations des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux puisque les valeurs des paramètres physico-chimiques des miels ne sont pas significativement différentes entre les deux lots. Différentes études ont montré que les miels possèdent les propriétés antimicrobiennes qui varient selon leur source botanique (Allen *et al.*, 1991; Taormina *et al.*, 2001; Mundo *et al.*, 2004; Baltrusaitye *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2010). Aussi, la présence et les concentrations des composés phénoliques dans les miels peuvent varier selon la source florale et les conditions géographiques et climatiques (Gheldof & Engeseth, 2002; Socha *et al.*, 2009; Tsiapara *et al.*, 2009). Il est à préciser que, dans cette étude, tous les prélèvements des miels ont été effectués au niveau des colonies d'abeilles d'un même rucher et pendant la même période.

L'effet antimicrobien de la propolis est dû à ses composants qui sont la plupart du temps de nature phénolique, principalement les flavonoïdes, les phénols simples et les acides phénoliques qui constituent des agents antimicrobiens actifs (Bankova *et al.*, 1996; Boukraâ & Sulaiman, 2009; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Farooqui & Farooqui 2010; Lahouel *et al.*, 2010; Ramanauskienė & Inkėnienė, 2011; Ishida *et al.*, 2011).

Concernant la propolis, les plus grandes zones d'inhibition de la croissance microbienne ont été obtenues avec les extraits éthanoliques de la propolis témoins qui ont montré également les valeurs les plus élevées des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux. De même, les valeurs des CMI de la propolis à l'égard des souches testées sont plus faibles quand la propolis est récoltée au niveau des colonies n'ayant pas été traitées aux acaricides.

De nombreuses études ont montré l'effet inhibiteur de la propolis sur les souches à l'encontre des bactéries Gram+ et Gram- (Grange & Davey, 1990; Rojas Hernandez *et al.*, 1993); des bactéries anaérobies (Kedzia, 1986, Santos *et al.*, 2002; Boyanova *et al.*, 2006) et des souches fongiques (Cizmaric & Trupl, 1976; Pepeljnak *et al.*, 1982; Ota *et al.*, 2001; Ozcan *et al.*, 2004). Ces effets dépendent de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé (Ugur & Arslan, 2004). Comme l'extraction de la propolis a été faite dans



de l'éthanol, l'inhibition possible par l'éthanol a également été examinée en utilisant l'éthanol (70%) comme témoin. Aucune inhibition de croissance n'a été observée contre les micro-organismes examinés confirmant ainsi l'effet antimicrobien de la propolis exclusivement.

Aussi, la composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique (Bankova *et al.*, 2000; Negri *et al.*, 2000; Popova *et al.*, 2002), l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002; Bankova *et al.*, 2008; Kumazawa *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2011; Isla *et al.*, 2012a; 2012b; Solórzano *et al.*, 2012; Danert *et al.*, 2014). Dans cette étude, tous les échantillons de propolis ont été prélevés, durant la même période, au sein d'un même rucher et au niveau des colonies d'abeilles locales d'*A. mellifera intermissa*.

Les faibles teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux ainsi que les basses activités antimicrobiennes du miel et de la propolis récoltés au niveau des colonies d'abeilles traitées par le fluvalinate et l'acide oxalique seraient dûes à l'état de santé des abeilles suite à leur exposition aux acaricides.

Le fluvalinate et l'acide oxalique affectent les aptitudes (fitness) et les performances des abeilles (Stoner *et al.*, 1985; Lodesani & Costa, 2005; Moosbeckhofer, 2001; Schneider *et al.*, 2012) et entraînent des modifications du comportement (Schneider *et al.*, 2012). Ils affectent les facultés d'apprentissage et de mémorisation chez les ouvrières (Taylor *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013). De ce fait, tous ces changements rendraient les abeilles plus faibles et moins vitales ce qui pourrait affecter l'état de santé général des colonies d'abeilles (Schneider *et al.*, 2012).

Ces répercussions sur l'état de santé de l'abeille peuvent être illustrées par le fait que les abeilles des colonies traitées aux acaricides recueillent moins de résine et de nectar que les abeilles des colonies non traitées, ou encore sont moins compétitives par rapport aux abeilles témoins puisque les teneurs en composés phénoliques de leurs miels et propolis sont moins élevées.

Dans cette étude, sachant que de nombreux travaux antérieurs ont montré que, suite à l'utilisation intensive et durant plusieurs années du fluvalinate, il ya eu développement de résistance par le varroa envers cet acaricide (Lodesani *et al.*, 1995; Colin *et al.*, 1997; Baxter *et al.*, 1998; Trouiller, 1998; Wang *et al.*, 2002; Gracia-Salinas *et al.*, 2006) et également contamination des produits de la ruche par les résidus du fluvalinate (Lodesani *et al.*, 1992; Wallner, 1999; Bogdanov, 2006; Lodesani *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2009; Mullin *et al.*,



2010) sans oublier ses effets secondaires néfastes sur les abeilles. En effet, le fluvalinate constitue un facteur de stress néfaste à la santé de la colonie d'abeilles (Haarmann *et al.*, 2002). Il affaiblit le système immunitaire de l'abeille (Locke *et al.*, 2012) ce qui les rend plus vulnérables aux infections virales, en l'occurrence à l'infection par les virus des ailes déformées (Locke *et al.*, 2012). Le fluvalinate agit aussi en synergie avec différents acaricides administrés dans les colonies d'abeilles (Johnson *et al.*, 2009). Le fluvalinate réduit la production des spermatozoïdes chez les faux bourdons (Rinderer *et al.*, 1999; Fell & Tignor, 2001; Frazier *et al.*, 2008) et provoque chez les reines, non seulement une réduction du poids du corps, des ovaires ainsi que du nombre moyen de spermatozoïdes contenus dans la spermathèque (Haarmann *et al.*, 2002) mais aussi une mortalité (Sokol, 1996; Currie, 1999).

De ce fait, nous avons orienté nos recherches surtout sur les effets de l'acide oxalique, en tant que produit naturel, sur la physiologie de l'abeille. L'acide oxalique, bien qu'il soit naturellement présent dans le miel et non polluant; qu'il constitue une bonne alternative comme traitement acaricide à l'égard de *V. destructor*, et qu'aucun phénomène de résistance de cet ectoparasite à cette substance n'ait été décrit à ce jour (Le Conte *et al.*, 2010), il n'est cependant pas sans effets néfastes sur les abeilles.

Le traitement des abeilles par application topique avec l'acide oxalique a entraîné une augmentation de l'activité spécifique de la GST chez les ouvrières nouvellement émergées d'*A. mellifera intermissa*. L'induction de la GST est plus prononcée quand la concentration de l'acide oxalique appliquée est élevée (20%). Cependant, les faibles concentrations de cet acaricide risquent d'être plus toxiques pour les abeilles du fait qu'elles ne permettent pas de déclencher rapidement leur système de détoxification. Cette induction de la GST est expliquée par le stress toxique auquel sont exposées les abeilles en contact de l'acide oxalique.

L'évolution de l'activité spécifique de la GST observée dans nos résultats est en accord avec les résultats cités dans littérature. En effet, il a été constaté que les abeilles nouvellement émergées ont de basses activités spécifiques des enzymes de détoxification (Smirle, 1993; Loucif *et al.*, 2008). Cette basse activité de la GST pourrait rendre les abeilles plus vulnérables aux substances toxiques (brodsgaard *et al.*, 1999) et pose un risque considérable à la colonie puisque la mort des abeilles nouvellement émergées prive la colonie des rôles effectués par les ouvrières le long de leur vie (Smirle & Winston, 1987).

L'induction de la GST a été rapportée suite à l'exposition des abeilles aux insecticides organophosphorés (Hayaoka & Dauterman, 1982; Clark, 1989) et organochlorés (Hayaoka &



Gauterman, 1982; Lagadic *et al.*, 1993; Papadopoulos *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2000; Kostaropoulos *et al.*, 2001), mais également après exposition aux pyréthrinoïdes (Yu *et al.*, 1984; Punzo, 1993; Loucif-Ayad *et al.*, 2008; Badiou *et al.*, 2012). Ces pesticides agissent individuellement ou en synergie et créent un environnement toxique aux abeilles (Johnson *et al.*, 2010).

L'histopathologie est une technique qui permet de diagnostiquer des symptômes au niveau des cellules et des tissus suite à une exposition à des molécules toxiques (Kammenga *et al.*, 2000; Fontanetti *et al.*, 2010). L'application topique de l'acide oxalique sur les ouvrières a entraîné des lésions cellulaires au niveau de l'épithélium intestinal. Ces lésions sont d'autant plus sévères que la concentration de l'acaricide est élevée.

Des lésions ont également été détectées par plusieurs auteurs suite à un traitement avec de l'acide oxalique. En effet, l'application topique de l'acide oxalique à forte concentration (20%) a conduit à une augmentation des concentrations de cet acaricide dans l'hémolymph, l'intestin moyen, les tubes de Malpighi et le rectum (Nozal *et al.*, 2003) des abeilles. Aussi, Martin-Hernandez *et al.* (2007) a montré que l'application topique de cet acaricide a conduit à des lésions 24h après traitement avec augmentation des dommages cellulaires occasionnés 72h après traitement. Des travaux ont détecté des nécroses cellulaires dans l'intestin moyen (Pulkkanen *et al.*, 2000; Gregorc & Smodis Skerl, 2007) suite à un traitement à l'acide oxalique. Même à faible concentration (3%), l'acide oxalique a provoqué une nécrose cellulaire de l'intestin moyen 24h après un traitement oral et également topique (Gregorc & Smodis Skerl, 2007).

Des travaux antérieurs ont montré que les acides organiques entraînaient des altérations des structures anatomiques et physiologiques des abeilles favorisant la pénétration des agents pathogènes et créant un environnement favorable au développement fongique (Howis *et al.*, 2010).

L'acide oxalique traverse la cuticule et pourrait contribuer à l'effet toxique (Nozal *et al.*, 2003). Une partie de l'acide oxalique est aussi ingérée par les abeilles (Martin-Hernandez *et al.*, 2007), notamment lors du comportement de nettoyage, qui est par ailleurs fortement induit chez les abeilles traitées, du à la présence des résidus de cet acaricide sur la surface du corps des abeilles (Schneider *et al.*, 2012). Ainsi, suite à l'ingestion de l'acide oxalique, on assiste à une résorption insuffisante des nutriments à travers l'épithélium de l'intestin entraînant un affaiblissement des abeilles (Martin-Hernandez *et al.*, 2007). L'acide oxalique



provoque des lésions cellulaires non seulement au niveau des organes digestifs (Pulkkanen *et al.*, 2000; Gregorc & Smodis Skerl, 2007; Martin-Hernandez *et al.*, 2007) et excréteurs (Martin-Hernandez *et al.*, 2007) mais également au niveau des glandes salivaires (Silva-Zacarin *et al.*, 2006). Aussi, il pourrait avoir un effet négatif sur le cycle de Krebs (Strachecka *et al.*, 2012). L'acide oxalique cause une réduction du couvain (Higes *et al.*, 1999), une mort larvaire (Gregorc *et al.*, 2004; Hatjina & Haristos, 2004) et des pertes de reines (Higes *et al.*, 1999; Wagnitz & Ellis, 2010). Il entraîne une diminution de l'activité des ouvrières (Bacandritsos *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2012) et de leur longévité ce qui affecte l'état général de la colonie d'abeilles (Schneider *et al.*, 2012) conduisant à un affaiblissement des abeilles qui résistent moins bien aux virus, bactéries et parasites (Wermelinger *et al.*, 2013).

CHAPITRE II

**Activité antimicrobienne du miel et
de la propolis à
l'égard des bactéries pathogènes
transmises par les aliments**

RESULTATS & DISCUSSION



CHAPITRE II

Activité antimicrobienne du miel et de la propolis à l'égard des bactéries pathogènes transmises par les aliments

I. RESULTATS

Les échantillons de miel et de la propolis, récoltés à partir des ruchers localisés au niveau des différentes régions phytogéographiques: Seraïdi, Chetaïbi, Berrahal et El-Bouni ont été analysés et leurs activités antimicrobiennes ont été testées sur quatre souches bactériennes transmises par les aliments: *Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R).

1. Comparaison des paramètres physico-chimiques du miel des différentes régions phytogéographiques

Les résultats relatifs aux paramètres physico-chimiques du miel, tels que l'humidité, le pH, la conductivité électrique et la teneur en cendres sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5. Comparaison des valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques du miel en fonction des régions ($m \pm SEM$; $n=10$).

Régions	Hygrométrie (%)	pH	Conductibilité électrique (mS/cm)	Teneur en cendres (%)
Seraïdi	$17,88 \pm 0,22^a$	$3,77 \pm 0,05^a$	$0,36 \pm 0,06^a$	$0,12 \pm 0,03^a$
Chetaïbi	$17,94 \pm 0,63^a$	$3,83 \pm 0,05^a$	$0,29 \pm 0,05^a$	$0,08 \pm 0,03^a$
Berrahal	$18,24 \pm 0,60^a$	$3,89 \pm 0,18^a$	$0,38 \pm 0,11^a$	$0,14 \pm 0,06^a$
El-Bouni	$18,38 \pm 0,51^a$	$4,60 \pm 0,08^a$	$0,41 \pm 0,02^a$	$0,15 \pm 0,01^a$

(Pour chaque paramètre, les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de $p > 0,05$).



Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre les paramètres physico-chimiques des échantillons de miel selon les régions. Dans la présente étude, les valeurs de l'hygrométrie des échantillons de miel oscillent entre 17,88% et 18,38%, à pH acide (3,77- 4,6). La conductivité électrique varie de 0,29 à 0,41 mS/cm et la teneur en cendres est généralement petite (0,08 à 0,15 %).

2. Comparaison des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux du miel et de la propolis des différentes régions phytogéographiques

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des échantillons de miel et des extraits éthanoliques de la propolis provenant des différents ruchers ont été mesurées et synthétisées dans le tableau 6.

Tableau 6. Comparaison des valeurs moyennes des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux du miel et de la propolis en fonctions des régions ($m \pm SEM$; $n=10$).

Régions	Miel		Propolis	
	Polyphénols (mg EAG/100g de miel)	Flavonoïdes (mg EQ/100g de miel)	Polyphénols (mg EAG /g EEP)	Flavonoïdes (mg EQ /g EEP)
Seraïdi	189,2 $\pm$ 16,01 ^a	95,94 $\pm$ 5,97 ^a	257,40 $\pm$ 3,01 ^a	91,44 $\pm$ 4,42 ^a
Chetaïbi	131,3 $\pm$ 13,64 ^b	69,99 $\pm$ 7,36 ^b	233,73 $\pm$ 7,03 ^{ab}	79,06 $\pm$ 1,91 ^b
Berrahal	99,03 $\pm$ 3,97 ^{bc}	64,47 $\pm$ 1,39 ^{bc}	215,4 $\pm$ 11,09 ^b	65,12 $\pm$ 2,42 ^c
El-Bouni	92,14 $\pm$ 5,23 ^c	44,56 $\pm$ 3,88 ^c	100,9 $\pm$ 2,72 ^c	58,99 $\pm$ 2,49 ^c

(Pour chaque paramètre, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les régions $p < 0,05$).

Les miels récoltés dans les régions de Seraïdi et de Chetaïbi présentent des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux plus élevées comparativement à celles des régions de Berrahal et d'El-Bouni ($p < 0,001$). De même, les extraits éthanoliques de la propolis de la région de Seraïdi sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes totaux, comparativement à celles des autres régions ($p < 0,0001$) où les plus faibles teneurs ont été enregistrées, notamment au niveau de la région d'El-Bouni.



3. Analyse de l'activité antimicrobienne du miel et de la propolis des différentes régions phytogéographiques à l'égard des bactéries pathogènes transmises par les aliments.

L'évaluation des activités antimicrobiennes des miels et des extraits éthanoliques de la propolis, provenant de différentes régions, à l'égard des bactéries pathogènes transmises par les aliments a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose. Les résultats obtenus sont mentionnés dans les figures 20 et 21.

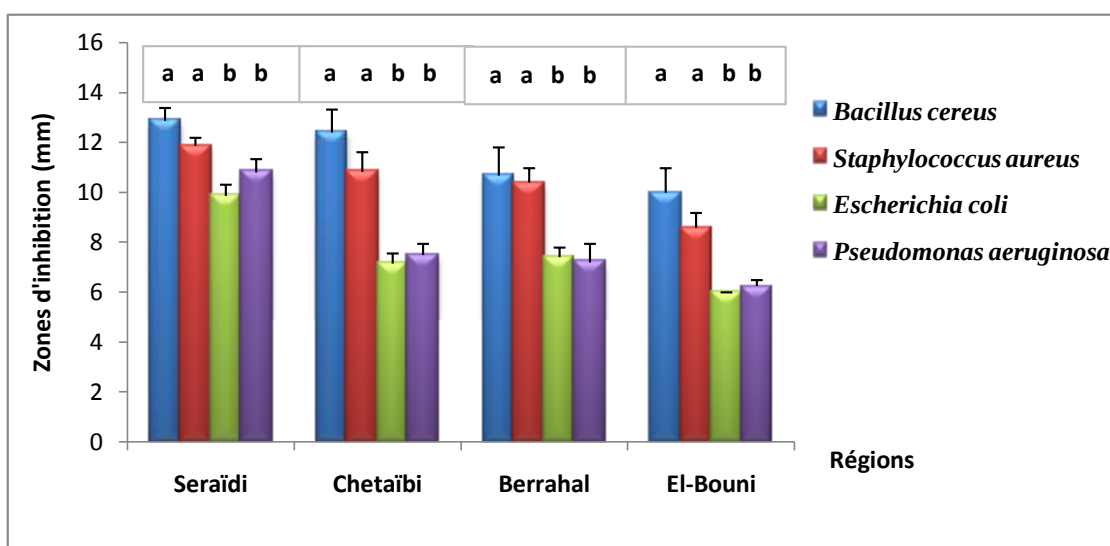


Figure 20. Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne par le miel au niveau de chaque région phytogéographique.

(Pour chaque région, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les bactéries $p < 0,05$).

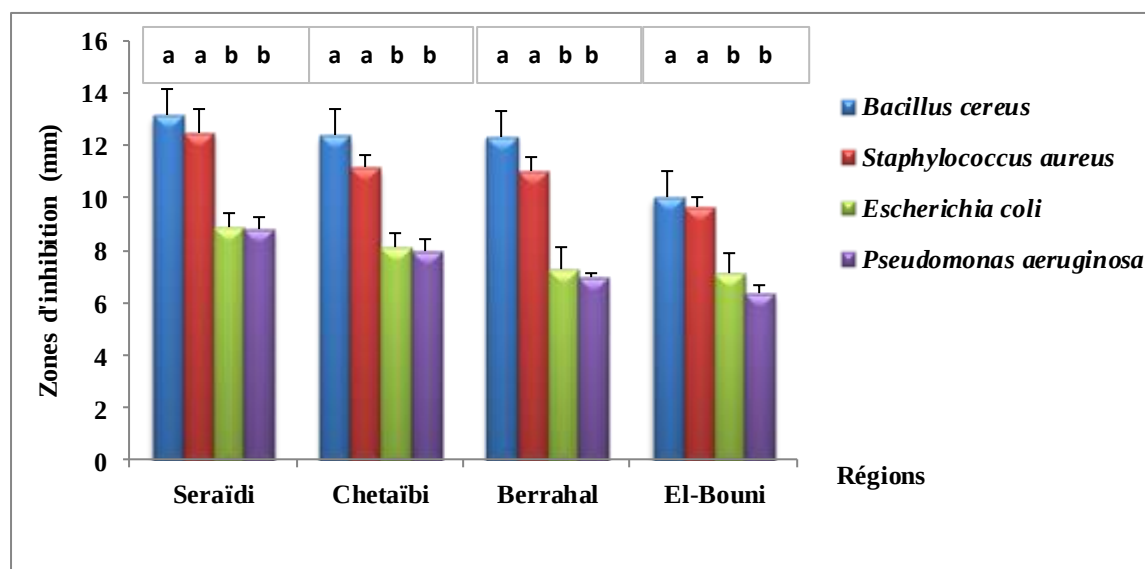


Figure 21. Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la croissance bactérienne par l'extrait éthanolique de la propolis au niveau de chaque région phytogéographique.

(Pour chaque région, les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les bactéries $p < 0,05$).

Les résultats montrent que les deux produits de la ruche, à savoir le miel et la propolis, inhibent la croissance de l'ensemble des bactéries testées et leurs activités antimicrobiennes varient selon le type de bactérie et selon les régions phytogéographiques. Le miel et la propolis présentent une activité antimicrobienne plus élevée à l'encontre des bactéries Gram⁺ (*Bacillus cereus* (IPA) et *Staphylococcus aureus*) comparativement aux bactéries Gram⁻ (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les miels et les extraits éthanoliques de la propolis récoltés dans les régions de Seraïdi et de Chetaïbi présentent des activités antimicrobiennes plus élevées ($p < 0,001$) comparativement à celles des régions de Berrahal et d'El-Bouni.

II. DISCUSSION

Les infections bactériennes sont la cause la plus fréquente d'intoxications alimentaires. Plusieurs bactéries pathogènes sont transmises fréquemment par les aliments. Avec le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Levy & Marshall, 2004), il ya un fort consensus, partagé aussi bien par les consommateurs que par les autorités sanitaires, à propos de la volonté d'utiliser des produits naturels (Erkmen, 2008). Le miel est de plus en plus apprécié pour son activité antibactérienne (Tan *et al.*, 2009). La puissante



activité *in vitro* du miel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel sur des plaies (Simon *et al.*, 2009) ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricides et bactériostatiques du miel (Ndaisaba *et al.*, 1993; Al-Somail *et al.*, 1994; Wahdan, 1998; Al-Waili, 2004; Chinakwe, 2006; Abd-Elaal *et al.*, 2007; Molan *et al.*, 2000; Subrahmanyam *et al.*, 2001; Taormina *et al.*, 2001; Mandal *et al.*, 2010; DebMandal & Mandal, 2011; Kačániová *et al.*, 2011; Alvarez-Suarez *et al.*, 2013). Aussi, la propolis compte parmi les produits naturels les plus convoités en raison de ses propriétés inhibitrices et thérapeutiques (Kim & Chung, 2011; Silva *et al.*, 2012). La propolis a attiré beaucoup d'attention ces dernières années comme ingrédient utile appliqué dans la médecine et les produits alimentaires.

Dans cette étude, les paramètres physico-chimiques des échantillons de miel prélevés au niveau de Seraïdi, Chetaïbi, Berrahal et El-Bouni ont été étudiés et les résultats ont montré que ces paramètres ne présentaient pas de différences en fonction des régions.

L'hygrométrie du miel est un facteur important contribuant à sa stabilité contre la fermentation pendant le stockage; elle peut être affectée par le climat, la saison et la teneur en eau du nectar (Nanda *et al.*, 2003; De Rodriguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007; Kucuk *et al.*, 2007; Al *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2010). Les échantillons analysés ont montré des valeurs d'humidité s'étendant de 17,15 à 18,58% ce qui est en accord avec les résultats rapportés par divers auteurs, notamment pour le miel marocain par Chakir *et al.*, 2011 (14,64% - 18,59%) et le miel algérien variant de 14 à 21% (Chefrour *et al.*, 2007; Ouchemoukh *et al.*, 2007; Benaziza-Bouchema et Schweitzer, 2010; Makhloufi *et al.*, 2010; Bendeddouche et Dahmani, 2011) et également pour le miel tunisien dont l'humidité varie de 16 à 21,8% (Jilani *et al.*, 2008).

Le pH acide du miel renforce son activité antibactérienne car les bactéries ne peuvent se multiplier dans un milieu acide (Bogdanov & Blumer, 2001; Assie, 2004; Tomczak, 2010; Al-Waili *et al.*, 2011). Tous les échantillons de miels examinés étaient acides avec des valeurs de pH qui varient de 3,50 à 4,61. Ces valeurs sont semblables à celles précédemment rapportées par certains auteurs, notamment pour les miels provenant de l'Inde, du Brésil, de l'Espagne et de la Turquie, avec des valeurs de pH allant de 3,49 à 4,70 (Azeredo *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2010). Les valeurs du pH des miels algériens varient entre 3,49-4,43 (Ouchemoukh *et al.*, 2007); 3,29-4,37 (Chefrour *et al.*, 2009) et 3,70 et 4,00 (Khalil *et al.*, 2012).



La conductivité électrique est un paramètre qui montre une grande variabilité liée à l'origine florale (Terrab & Heredia, 2004). Les valeurs de la conductivité électrique sont également dans les limites variant entre 0,11 et 0,63 mS/cm. La conductivité électrique des miels algériens est de 0,10 à 0,8 mS/cm (Benaziza-Bouchema & Schweitzer, 2010; Makhoulfi *et al.*, 2010; Bendeddouche & Dahmani, 2011; Khalil *et al.*, 2012).

La détermination des teneurs en cendres offre la possibilité de connaître la teneur en matière minérale globale du miel (Silva *et al.*, 2009). Ce paramètre dépend des caractéristiques du sol, du climat et de la région d'origine du miel (White, 1978; Terrab *et al.*, 2004; Vanhanen *et al.*, 2011). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les miels algériens (0,09-0,54 %) par Ouchmoukh *et al.* (2007) ainsi que pour d'autres miels de différentes origines (Al-Khalifa *et al.*, 1999; Sahinler & Gul, 2004; Sudhanshu *et al.*, 2010; Alqarni *et al.*, 2012).

Nos résultats ont révélé une variabilité dans les teneurs des composés phénoliques en fonction des régions. En effet, les miels et la propolis des régions de Seraïdi et de Chetaïbi présentent les plus fortes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux comparativement à celles des régions de Berrahal et El-Bouni.

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux varient en fonctions des régions et des pays. Dans cette étude, les teneurs en polyphénols totaux des miels varient de 92,14-189,20 mg EAG/100g de miel. D'autres travaux en Algérie ont montré que les teneurs étaient de 63,93– 95,36 mg EAG /100g de miel (Ahmed *et al.*, 2013). Les teneurs des miels de la Roumanie, de Burkina Faso, du Paraguay et de la Chine présentaient respectivement les valeurs de 23-125 (Bobis *et al.*, 2011); 32,59-114,75 (Meda *et al.*, 2005); 125,17-176,50 (Vit *et al.*, 2009) et de 9,41-102,1 mg EAG/100g de miel (Dong *et al.*, 2013). En outre, les teneurs en flavonoïdes totaux obtenues dans nos échantillons varient de 44,56-95,94 mg EQ/100g de miel. Des travaux antérieurs ont montré que les teneurs en flavonoïdes des échantillons de miels d'Algérie étaient de 27,07-71,8 mg EQ/100g de miel (Khalil *et al.*, 2012). Les teneurs des miels de la Roumanie, du Venezuela et de l'Italie étaient respectivement de 38,96-65,98 (Bobis *et al.*, 2011); 2,6-31 (Rodríguez-Malaver *et al.*, 2009) et de 41,88-211,68 mg EQ/100g du miel (Pichichero *et al.*, 2009). Concernant la propolis, les teneurs en polyphénols obtenues dans la présente étude sont de l'ordre de 100,90- 257,40mg EAG/g de propolis. Les données dans la littérature ont montré que les teneurs des polyphénols de la propolis algérienne étaient de 55-279 mg EAG/g de propolis (Boufadi *et al.*, 2014); celles du Portugal variaient



entre 151 et 329 mg EAG/ g de propolis (Leandro *et al.*, 2008). Quant aux teneurs en flavonoïdes de la propolis analysée dans cette étude, les valeurs sont de 58,99- 91,44mg EQ/g de propolis. Les valeurs allant de 10 à 69mg EQ/g de propolis ont été précédemment obtenues par Boufadi *et al.* (2014) pour des échantillons algériens et les valeurs de 12-78 (Mohammadzadeh *et al.*, 2007) et de 8-188 mg EQ/g de propolis (Ahn *et al.*, 2004) pour la propolis en provenance de l'Iran et de la Chine respectivement.

Dans cette étude, les échantillons de miel et de la propolis ont montré une activité antibactérienne contre toutes les bactéries examinées avec une activité antimicrobienne plus prononcée à l'égard des bactéries Gram+. Aussi, l'activité antimicrobienne du miel et de la propolis varie selon leurs origines. Les échantillons de miel et de propolis de Seraïdi et de Chetaïbi présentent une activité antimicrobienne élevée par rapport à celle de Berrahal et d'EL-Bouni. Les propriétés physico-chimiques du miel ne semblent pas être impliquées dans la variation de l'activité antimicrobienne du miel puisque ces paramètres ne sont pas variables en fonction des régions étudiées. Par contre, cette activité antimicrobienne est positivement corrélée avec des valeurs élevées des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des deux produits de la ruche. La diversité florale mellifère riche des deux régions (Seraïdi et Chetaïbi) semble jouer un rôle important dans les teneurs des composés phénoliques, influençant ainsi l'activité antimicrobienne de ces deux produits de la ruche. Il a été démontré que les composés phénoliques influencent les propriétés pharmacologiques et biologiques du miel (Khalil *et al.*, 2011; Cimpoiu *et al.*, 2012) et de la propolis (Gülçin *et al.*, 2010). En effet, grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols, il est possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (Daglia, 2012). D'autres propriétés telle que la capacité antioxydante des polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Les polyphénols sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés, d'arômes alimentaires et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (Moure *et al.*, 2001).

Concernant l'activité antibactérienne, nos résultats sont accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont montré que les bactéries Gram positif sont plus sensibles à l'effet de la propolis (Tegos *et al.*, 2002; Donadieu, 2008; Trusheva *et al.*, 2010) et également à l'effet du



miel comparativement aux bactéries Gram négatif (Rahmanian *et al.*, 1970; Wooton *et al.*, 1978; Yatsunami & Chigo, 1984; Jeddar *et al.*, 1985; Bogdanov *et al.*, 1987; Miorin *et al.*, 2003; Agbagwa & Frank-Peterside, 2010; Alvarez Suárez *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Srisayam & Chantawannakul, 2010).

La faible sensibilité des bactéries Gram négatif à l'égard de l'extrait éthanolique de la propolis serait due à leur membrane externe qui empêcherait le passage de la propolis (Tegos *et al.*, 2002) ou encore, au fait que la propolis contient beaucoup de constituants dérivés des plantes qui sont sécrétés à l'origine pour protéger les plantes contre les bactéries pathogènes Gram positif la plupart du temps (Tegos *et al.*, 2002). Selon Kim & Chung, 2011, l'action antimicrobienne de la propolis peut être attribuée aux effets bioénergétique de la membrane. Les acides phénoliques et les composants flavonoïdes de la propolis désaccouplent la transduction d'énergie de la membrane cytoplasmique qui mène à l'inhibition de la viabilité bactérienne.

Les produits naturels, tels que le miel et la propolis, sont des agents antimicrobiens prometteurs avec des applications potentielles dans les industries alimentaires pouvant empêcher la prolifération des bactéries pathogènes apportées par les aliments.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette thèse s'articule autour de deux volets relatifs aux abeilles et aux produits de la ruche.

Le premier volet concerne l'impact des acaricides utilisés dans la lutte contre l'infestation des abeilles par l'acarien ectoparasite *Varroa destructor*, sur la santé des abeilles locales *Apis mellifera intermissa*.

Pour cela, des échantillons de miel et de propolis ont été recueillis au niveau des colonies d'abeilles traitées par les acaricides, synthétique (le fluvalinate) et naturel (l'acide oxalique) et des colonies non traitées au sein d'un même rucher.

Le miel et la propolis provenant des colonies d'abeilles ayant été traitées par le fluvalinate et l'acide oxalique montrent des teneurs en composés phénoliques et des activités antimicrobiennes significativement réduites comparativement à celles des colonies d'abeilles non traitées implantées au niveau d'un même rucher.

Le fluvalinate et l'acide oxalique entraînent des effets négatifs sur la santé des abeilles. Les miels et les extraits éthanoliques de la propolis des colonies d'abeilles traitées au fluvalinate et à l'acide oxalique sont de moindre qualité. Les abeilles exposées aux acaricides semblent être moins compétitives et recueilleraient moins de résine et de nectar ce qui explique les faibles teneurs en composés phénoliques dans leurs produits comparativement aux deux produits de la ruche des colonies non traitées.

L'acide oxalique, bien qu'étant un acaricide naturel, est toxique pour les abeilles. Cette toxicité est révélée, par des marqueurs enzymatique et histologique, suite à son application topique sur les ouvrières émergentes d'*A.mellifera intermissa*.

D'une part, l'augmentation de l'activité spécifique de la Glutathion S-Transférase (GST) est indicatrice de la mise en place d'un processus de détoxication suite à un stress toxique causé par l'acide oxalique. Cette augmentation de la GST est obtenue 24h après l'application de la forte concentration de l'acide oxalique (20%) alors que les concentrations préconisées dans le traitement anti-varroa (3,5% et 6%) n'ont déclenché que tardivement le processus de la détoxication. Ce retard dans la mise en route de la détoxication augmenterait le risque de mettre en péril la vie des abeilles.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



D'autre part, l'acide oxalique, même à faible concentration (3,5%), a provoqué des altérations tissulaires au niveau de l'intestin moyen d'*A.mellifera intermissa*. Ces dégénérescences cellulaires sont encore plus prononcées quand la concentration de l'acide oxalique est élevée (20%).

Le second volet concerne l'étude de l'effet du miel et de la propolis, en tant que produits naturels, sur l'inhibition de la croissance microbienne des bactéries à l'origine des intoxications alimentaires. Les échantillons de miel et la propolis récoltés dans différentes régions dans le nord-est Algérien (Seraïdi, Chetaïbi, El-Bouni et Berrahal) inhibent la croissance des quatre souches de bactéries (*Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) transmises par les aliments. L'activité bactériostatique de ces deux produits de la ruche est plus importante sur les bactéries Gram+ comparativement aux bactéries Gram-. Les activités antibactériennes des miels et des extraits éthanoliques de la propolis sont également plus importantes au niveau des échantillons riches en composés phénoliques. L'activité antibactérienne à l'encontre des souches testées varie en fonction des régions phytogéographiques.

Les résultats de cette étude ouvrent la voie à la compréhension de la qualité de la propolis et du miel et leur implication dans la santé individuelle et collective des abeilles et également de l'homme.

Le prolongement de ces travaux de thèse pourrait se faire en tentant de déterminer la composition chimique des composés phénoliques du miel et de la propolis (analyse qualitative) et d'établir la relation entre la santé des colonies d'abeilles suite à l'emploi des acaricides et les compositions chimiques de leurs miels et de leurs propolis respectives.

Aussi, il serait aussi possible d'envisager une meilleure valorisation industrielle des produits de la ruche, notamment en Algérie, visant l'utilisation de ressources naturelles, telle que la propolis dans le domaine de l'agro-alimentaire, de la pharmacutique et de la cosmétique.

RESUMES



RESUME

L'impact de deux acaricides, synthétique (fluvalinate) et naturel (acide oxalique), utilisés dans la lutte contre l'acarien ectoparasite de l'abeille: *Varroa destructor*, a été évalué sur les abeilles locales *Apis mellifera intermissa*. Des échantillons de miel et de propolis ont été prélevés au niveau d'un rucher situé dans le Nord-est Algérien (36°42'N7°50'E) à partir de colonies d'abeilles traitées par le fluvalinate et par l'acide oxalique et de colonies non traitées ayant servi de témoins.

Les paramètres physico-chimiques du miel (hygrométrie; pH; conductivité électrique et teneur en cendres) ont été mesurés et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux du miel et de la propolis ont été dosées. L'activité antimicrobienne de ces deux produits de la ruche à l'égard de six souches bactériennes, Gram positif [(*Bacillus subtilis* (IPA); *Bacillus cereus* (IPA); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923R)] et Gram négatif [(*Escherichia coli* (ATCC 25922R); *Klebsiella pneumoniae* (IPA); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27893R)] et d'une souche fongique *Candida albicans* (IPA 549) a été évaluée.

Les résultats obtenus ont montré que les activités antimicrobiennes ainsi que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux du miel et de la propolis sont faibles au niveau des échantillons recueillis dans les colonies d'abeilles traitées par les acaricides comparativement à celles des échantillons des colonies non traitées. L'absence de différences significatives entre les paramètres physico-chimiques des miels des deux types de colonies d'abeilles confirme leur non implication dans la variabilité de l'activité antimicrobienne obtenue entre les échantillons des miels analysés et que cette variabilité serait plutôt en relation avec la variabilité de leurs composés phénoliques. Le fluvalinate et l'acide oxalique ont un impact négatif sur la santé des abeilles, se répercutant sur la qualité et l'activité antimicrobienne de leurs produits. Les abeilles des colonies traitées aux acaricides recueilleraient moins de nectar et de résine que les abeilles des colonies non traitées puisque les teneurs en composés phénoliques de leurs miels et de leurs propolis sont moins élevées.

Aussi, l'application topique de l'acide oxalique, à différentes concentrations (3,5%, 6% et 20%), sur les ouvrières d'*A. mellifera intermissa* nouvellement émergées a révélé des effets toxiques de l'acide oxalique. Cette toxicité est exprimée par l'induction de l'activité spécifique de la Glutathion S-Transférase (GST), soit uniquement 24h après son administration à forte concentration (20%) et, 48h après pour les faibles concentrations. La



mise en place tardive du processus de détoxication aux concentrations préconisées dans le traitement anti-varroa (3,5% et 6%) risque d'être plus néfastes pour les abeilles d'autant plus que des altérations tissulaires de l'épithélium intestinal ont été observées suite à l'application topique de l'acide oxalique à 3,5% et à 20%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du miel et de la propolis à l'égard de quatre bactéries impliquées dans les intoxications alimentaires [*Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R)] a été réalisée. Des échantillons de propolis et de miel ont été prélevés dans différentes régions de l'Est Algérien: Seraïdi (36°54'N, 7°37'E); Chetaïbi (36°59'N, 7°19' E); El Bouni (36°49'N, 7° 39'E) et Berrahal (36°50'N, 7°26'E). Les résultats ont montré que la propolis et le miel échantillonnés au niveau des régions de Seraïdi et de Chetaïbi, caractérisées par une richesse floristique mellifère diversifiée, présentent des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux ainsi que des activités bactériostatiques plus élevées à l'égard des souches testées, comparativement à celles des régions d'El Bouni et de Berrahal. Les activités antibactériennes des miels et des extraits éthanoliques de la propolis sont plus importantes quand les teneurs en composés phénoliques sont élevées. Aussi, l'activité bactériostatique des deux produits de la ruche est plus importante à l'encontre des bactéries Gram+ comparativement à celle des bactéries Gram-. L'activité antibactérienne à l'égard des souches testées varie en fonction des régions phytogéographiques.

Mots clés: *Apis mellifera intermissa*, Acaricides, Miel, Propolis, Composés phénoliques, Activité antimicrobienne, Activité de la Glutathion S-Transférase, Histopathologie de l'intestin moyen.



ABSTRACT

The impact of two acaricides, the synthetic one (fluvalinate) and the natural one (oxalic acid) used against the mite of the honeybee *Varroa destructor* was evaluated on the local honeybees *Apis mellifera intermissa*. Samples of honey and propolis were collected at an apiary located in the north-eastern Algeria (36°50'E, 42°N7°) from honeybee colonies treated with fluvalinate, oxalic acid and untreated colonies used as controls.

The physico-chemical parameters of honey (humidity, pH, electrical conductivity and ash content) were measured and the total polyphenol and flavonoid contents of honey and propolis were measured. The antimicrobial activity of these two hive's products against six strains of bacteria, positive Gram [(*Bacillus subtilis* (IPA), *Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923R)] and negative Gram [(*Escherichia coli* (ATCC 25922R), *Klebsiella pneumoniae* (IPA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27893R)] and a fungal strain *Candida albicans* (API 549) was evaluated.

The results obtained showed that the antibacterial activities and the total flavonoid and polyphenol contents of honey and propolis are reduced in samples collected from honeybee colonies treated with acaricides compared to the controls. The lack of significant differences between the physicochemical parameters of the two types of honeybee colonies confirms their no-involvement in the variability of the antimicrobial activity obtained between the honey samples analyzed and that this variability is rather related to the variability of their phenolic compounds. Fluvalinate and oxalic acid have a negative impact on bee health, affecting the quality of their products.

Bee colonies treated with acaricides would collect less nectar and resin than untreated ones since the levels of the phenolic compounds from their honey and propolis are lower.

Also, topical application of oxalic acid at various concentrations (3.5%, 6% and 20%), on the newly emerged workers of *A. mellifera intermissa* showed toxic effects of oxalic acid. The toxicity is expressed by the induction of Glutathione S-transferase (GST) activity 24 hours after its administration at high concentration (20%) and, after 48 hours at low concentrations. This fact could be harmful for honeybees associated to the cells midgut alteration observed after topical application of oxalic acid at 3.5% and 20%.



The evaluation of the antimicrobial activity of honey and propolis against four bacteria involved in food poisoning [*Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R)] was performed. Samples of propolis and honey were collected from different regions of eastern Algeria: Seraïdi (36° 54'N, 7° 37'E) Chetaïbi (36° 59'N, 7° 19 'E); El Bouni (36° 49'N, 7° 39'E) and Berrahal (36° 50'N, 7° 26'E). The results showed that propolis and honey sampled in the regions of Seraïdi and Chetaïbi, characterized by a rich floral diversity, have higher total polyphenol and flavonoid contents and also higher bacteriostatic activity against the tested strains as compared to those in the regions of El- Bouni and Berrahal. The antibacterial activities of honey and propolis are more important when the levels of phenolic compounds are high. Also, the bacteriostatic activity of the two products of the hive are higher against Gram + bacteria compared to that of Gram-bacteria. The antibacterial activity against strains tested varies according to the phytogeographical regions.

Keywords: *Apis mellifera intermissa*, Acaricides, Honey, Propolis, phenolic compounds, antimicrobial activity, Glutathion S-transferase activity, midgut.



ملخص

تم تقييم تأثير مبيدان، اصطناعي (fluvalinate) و طبيعي (حمض الاكساليك) المستخدمان في مكافحة طفيلي نحل العسل (*Varroa destructor*) على النحل المحلي (*Apis mellifera intermissa*) تم جمع عينات من العسل و العكبر المتواجد في الشمال الشرقي للجزائر (36°50'E, 42°N7') من خلال خلايا نحل معالجة بمادة (fluvalinate) و حمض الاكساليك و خلايا غير معالجة مستعملة كشاهد.

تم قياس الخصائص الفيزيوكيميائية (teneur en cendres et conductivité électrique ; hygrométrie; pH) وتم معايرة البوليفينول والفلافونويد للعسل والعكبر واختبار الفعالية المضادة للمكروبات لكلا المنتجين ضد ستة سلالات من البكتيريا غرام (+) *Bacillus subtilis* (IPA); *Bacillus cereus* (IPA); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923R) و غرام (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922R); *Klebsiella pneumoniae* (IPA);

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27893R) وسلالة فطوية (*Candida albicans* (IPA 549)).

النتائج التي تم الحصول عليها تشير الى ان الفعالية المضادة للمكروبات والمحتوى الإجمالي من البوليفينول والفلافونويد للعسل والعكبر منخفضة بالنسبة لخلايا النحل المعالجة بالمبيدات مقارنة مع العينات الغير معالجة وعدم وجود اختلافات بين الخصائص الفيزيوكيميائية لعسل هذان النوعين من خلايا النحل يؤكد عدم تدخلهم في تنوع الفعالية المضادة للمكروبات التي تم الحصول عليها بين عينات العسل التي تم تحليلها وان هذا الاختلاف له علاقة مع تغيرات المكونات الفينولية.

فيما يخص حمض الاكساليك و (fluvalinate) لهما تاثير سلبي على صحة النحل، مما يؤثر على نوعية العسل والعكبر ونشاط الفعالية المضادة للمكروبات، ان النحل المعالج بهذه المبيدات يجمع اقل من الرحيق والعكبر بالمقارنة مع النحل الغير معالج.

ايضا، التطبيق الموضوعي لحمض الاكساليك لمختلف التراكيز (3.5%، 6%، 20%) على عاملات النحل

(*Apis mellifera intermissa*) اظهر اثار سامة على النحل و ذلك من خلال ارتفاع مباشرة نشاط انزيم (GST) بعد 24 ساعة فقط من استعمال التركيز العالي (20%) ، و بعد 48 ساعة بتركيز اقل (3.5%، 6%). الازالة المتأخرة من السموم الناتجة من المعالجة بالحمض الاكساليك بتركيز (3.5%، 6%) قد تعرض حياة النحل للخطر حيث لوحظ تغيرات في طلائع المعوي بعد الاستعمال الموضوعي لحمض الاكساليك بتركيز (3.5%، 20%).

تم تقييم الفعالية المضادة للمكروبات للعسل والعكبر ضد أربعة أنواع من البكتيريا المتسببة في التسمم الغذائي

[*Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R)]

تم جمع عينات من العسل والعكبر من مناطق مختلفة من شرق الجزائر، سيرايدي (36°54'N, 7°37'E)، شطايب (36°59'N, 7°19'E)، البوني (36°49'N, 7°39'E)، برحال (36°50'N, 7°26'E).



RESUME

ان النتائج المحصل عليها تبين ان عينات العكبر والعسل الماخوذة من منطقة سرايدي وشطايبي التي تتميز بالتنوع النباتي تحتوي على مركبات بوليفينول والفلافونويد بنسبة عالية وفعالية مضادة للبكتيريا عالية مقارنة بالعينات الماخوذة من منطقتي البوني وبرحال.

تكون الفعالية المضادة للبكتيريا للعسل والعكبر أكثر أهمية عندما تكون المركبات الفينولية بنسبة عالية وتكون أكثر فعالية على البكتيريا (غرام +) مقارنة للبكتيريا (غرام -). تختلف الفعالية المضادة للبكتيريا باختلاف المناطق النباتية.

كلمات البحث: نحل شمال أفريقيا، مبيدات، والعسل، العكبر، المركبات الفينولية، والنشاط المضادة للميكروبات، نشاط انزيم GST)المعي.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



References bibliographiques

- Abd El Wahab T.E., Zakaria M. E., Nour M.E. (2006). Influence of the infestation by varroa mite *Varroa destructor* on some Antennal sense organs of the worker and drone honey bees *Apis mellifera* L. *J. of Applied Sciences Res.*, **2(2)**: 80-85.
- Abdallah A.T. (2004). On the efficiency of some histological techniques as biomarker for heavy metal pollution. *Science, Technology and Education of Microscopy*, 287-296.
- Abd-Elaal A.M., El-Hadidy M.R., El-Mashad N.B., El-Sabaie A.H. (2007). Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Annals of Burns and Fire Disaster*, **20(2)**: 91-94.
- Abdel-Fattah N.S., Nada O.H. (2007). Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **37(2)**: 691-710.
- Achou M., Soltani N. (1997). Impact of *Varroa jacobsoni* Oud. on the morphometry and biochemical composition of hemolymph in honeybees *Apis mellifera intermissa* L. *Parasitica*, **53**: 127-134.
- Agbagwa O. E. and Frank-Peterside N. (2010) Effect of raw commercial honey from Nigeria on selected pathogenic bacteria. *Africa J. Microbials Res*, **4**: 1801- 1803.
- Ahmed M., Aissat S., Djebli N., Boulkaboul A., Abdelmalek M., Khiati B. (2011). The Influence of starch of ginger on the antibacterial activity of honey of different types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int.J.Microbiol.Res.*, **2(3)**: 258-262.
- Ahmed M., Djebli N., Aissat S., Meslem A.M., Bacha S. (2012). The Influence of botanical origin and physicochemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. *J. Plant Pathol. Microb.*, **3**: 5-9.
- Ahmed M., Djebli N., Aissat S., Zerrouki K., Bourabeh A. (2013). In Vitro synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. *J. Plant Pathol. Microb.*, **4**: 152-157.
- Ahn M.R., Kumazawa S., Hamasaka T., Bang K.S., Nakayama T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 7286-7292.



- Ahn M.R., Kunimasa K., Kumazawa S. (2009). Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**(5): 643-651.
- Al M.L., Daniel D., Moise A., Bobis O., Laslo L., Bogdanov S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, **112**:863–867.
- Aliano N.P., Ellis M.D. (2008). Bee-to-bee contact drives oxalic acid distribution in honey bee colonies. *Apidologie*, **39**: 481–487.
- Al-Khalifa A.S., Al-Arifly I.A. (1999). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry*, **67**: 21-25.
- Allen K. L., Molan P. C., Reid G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **43**: 817–822.
- Al-Mamary M., Al-Meerri A., AL-Habori M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr. Res.*, **22**: 1041-1047.
- Al-Namma R.T. (2009). Evaluation *in vitro* inhibitory effect of honey on some microbial isolate. *Journal of Bacteriology Research*, **1**(6): 64-67.
- Alquarni Abdulazize S., Owayss Ayman A., Mahmoud Awad A., Hannan Mohammed A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia Journal of Saudi Chemical Society. In Press.
- Al-Somail N., Coley K.E., Molan P.C., Hancock B.M. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. *J.Royal Society Med.*, **87**: 9-12.
- Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Díaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S., Battino M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem. Toxicol.*, **48**(8-9): 2490-2499.
- Alvarez-Suarez J.M., Giampieri F., Battino M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr. Med. Chem.*, **20**(5): 621-638.
- Al-Waili N.S. (2004). An alternative treatment for *Pityriasis versicolor*, *Tinea cruris*, *Tinea corporis* and *Tinea faciei* with topical application of honey, olive oil and beeswax mixture: an open pilot study. *Complement Ther. Med.*, **12**(1):45-47.



- Al-Waili N.S. (2005). Mixture of honey, beeswax and olive oil inhibits growth of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Arch. Med. Res.*, **36(1)**:10-13.
- Al-Waili N.S., Salom K., Al-Ghambi A.A. (2011). Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *The scientific World Journal*, **11**:766-787.
- Amdam G., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A., Omholt S.W. (2004). Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A factor in colony loss during overwintering. *J. Econ. Entomol.*, **97**: 741-747.
- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol.*, **24(3)**:165-189.
- 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 honeybee and hive (*Apis mellifera*). *Insect. Soc.*, **58**: 431-444.
- Andrews J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**: 5-16, Supplement S1.
- Andrew J.M. (2009). standardized disc susceptibility testing method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **64**: 454-489.
- Ansorge S., Reinhold D., Lendeckel U. (2003). Propolis and some of its constituents downregulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch C.*, **58 (7-8)**:580-589.
- AOAC (1990). Food composition, additives and natural contaminants. In: Official Methods of Analysis. Helrich, K. (ed). Association of Official Analytical Chemists International 2, 15th Edition, Arlington, VA, USA.
- Ariana A., Ebadi R., Tahmasebi G. (2002). Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **27**: 319–327.
- Assie B., Descottes B. (2004). *Le miel comme agent cicatrisant*. 115 p. Thèse d'exercice : Médecine. Toulouse : Toulouse III.
- Attia W.Y., Gabrys M.S., El-Shaikh K.A., Othman G.A. (2008). The anti-tumor effect of bee honey in Ehrlich ascite tumor model of mice is coincided with stimulation of the immune cells Egypt. *J. Immunol.*, **15(2)**:169-83.



- Azeredo L.D.C., Azeredo M., De Souza S.R., Dutra V.M.L.(2003). Protein content and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**: 249-254.
- Babczynska A., Wilczek G., Migula P. (2006). Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.*, **370**: 352–359.
- Bacandritsos N., Papanastasiou I., Saitanis C., Nanetti A., Roinioti E. (2007). Efficacy of repeated trickle applications of oxalic acid in syrup for varroosis control in *Apis mellifera*: Influence of meteorological conditions and presence of brood. *Veterinary Parasitology*, **148**:174-178.
- Badiou-Bénéteau A., Carvalho S.M., Brunet J.-L., Carvalho G.A., Buleté A., Giroud B., Belzunces L.P. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and environmental safety*, **82**: 22-31.
- Balayiannis G., Balayiannis P. (2008). Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **55**: 462–470.
- Baldensperger, P.J. (1924). Sur l'apiculture en Orient. Proceeding of the sixth International Congress of Apiculture, Marseille, France, pp 59-64.
- Baltrusaityte V., Venskutonis P.R., Ceksteryte V. (2007). Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S.aureus* and *S.epidermidis*. *Food Technol.Biotechnol.*, **45(2)**: 201-208.
- Bankova V.S., Marcucci M.C., Simova S., Nikolova N., Kujumgiev A. (1996). Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitsch.Naturfors*, **51**: 277-280.
- Bankova V.S., De Castro S.L., Marcucci M.C. (2000). Propolis: recent advances and plant origin. *Apidologie*, **31**: 3-15.
- Bankova V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharm*, **100**:114-117.
- Bankova V., Trusheva B., Popova M. (2008). New developments in propolis chemical diversity studies (2000). In: Orsolic N, Basic I (eds.) Scientific evidence of the use of propolis in ethnomedicine. Transworld Research Network. Trivandrum, India.
- Bannoehr J., Ben Zakour N.L., Waller A.S., Guardabassi L., Thoday K.L., van den Broek A.H.M. (2007). Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* Group:



- insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol.*, **189**:8685-8692.
- Barata C., Navarro J., Varo I., Riva M., Arun S., Porte C. (2005). Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B140**: 81-90.
- Barour C., Tahar A., Baylac M. (2011). Forewing shape variation in Algerian honeybee populations of *Apis mellifera intermessa* (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apidae): A landmark based geometric morphometrics analysis. *African Entomology*, **19(1)**: 11-22.
- Bauer A.W., Kirby M.D.K., Sherris J.C., Truck M. (1966). Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**: 493-496.
- Baxter J., Eischen F., Pettis J., Wilson W.T., Shimanuki H. (1998). Detection of fluvalinate-resistant varroa mites in U.S. honey bees. *Am. Bee J.*, **138**: 291.
- Belostotskiĭ N.I., Kas'ianenko V.I., Dubtsova E/A., lazebnik L.B. (2009). Influence of honey, royal jelly and propolis on accelerating acetate healing of experimental gastric ulcers in rats. *Eksp KlinGastroenterol.*, **6**:46-50.
- Benaziza-Bouchema D., Schweitzer P. (2010). Caracterisation des principaux miels des regions du Nord de l'Algerie. *Cah. Agric.*, **19(6)**: 432-438.
- Bendeddouche B., Dahmani K. (2011). Physical properties of honey products in Algeria. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, **2(12)**:237-244.
- Benhanifia M., Mohamed W.M., Bellik Y., Benbarek H. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western Algeria. *International Journal of Food Science & Technology*, **48**: 2521-2527.
- Bernal J., Garrido-Bailon E., del Nozal M.J., Gonzalez-Porto A.V., Martin-Hernandez R., Diego J.C., Jimenez J.J., Bernal J.L., Higes M. (2010). Overview of pesticide residues instored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, **103**: 1964-1971.
- Berry J. (2009). Pesticides, bees and wax: an unhealthy mix Bee. *Culture*, **137**: 33-35.
- Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R., Thomas C.D., Settele J., Kunin W.E. (2006).



- Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, **313**: 251-353.
- Biri M. (2010). Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. 7e éd. Paris : De Vecchi. 302 p.
- Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M.P., Albertini M.C., Piatti E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.*, **97**: 217-222.
- Bobis O., Mărghită L. A., Dezmirean D., Chirilă F., Moritz R.F.A. (2011). Preliminary studies regarding antioxidant and antimicrobial capacity for different types of Romanian honeys. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, **68(1-2)**: 91-97.
- Bogdanov S (1987). Suppression du service d'analyses du miel de la section des abeilles. *Journal Suisse d'apiculture*, **84 (9)**: 325-326.
- Bogdanov S., Kilchenmann V., Fluri P., Bühler U., Lavanchy P. (1999). Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste. *Am. Bee J.*, **139**: 61-63.
- Bogdanov S., Blumer P. (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'apiculture*, **98 (3)**: 107-114.
- Bogdanov S. (2002). Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products, 1-7.
- Bogdanov S., Charrière J.D., Imdorf A., Kilchenmann V., Fluri P. (2002). Determination of residues in honey after repeated field trials with formic and oxalic acid. *Apidologie*, **33(4)**: 399-409.
- Bogdanov S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, **38 (1)**: 1-18.
- Boot W.J., Calis J.N.M., Beetsma J. (1995). Does time spent on adult bees affect reproductive success of Varroa mites? *Entomol. Exp. Appl.*, **75**: 1-7.
- Boufadi Y.M., Soubhye J., Riazi A., Rousseau A., Vanhaeverbeek, M., Nève J., Boudjeltia K.Z., Van Antwerpen P. (2014). Characterization and antioxidant properties of six algerian propolis extracts: Ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**: 2327-2345.
- Boukraa L., Sulaiman S.A. (2009). Honey use in burn management: Potentials and limitations. *Forschende Komplementarmedizin*, **17 (2)**: 74-80.
- Bowen-Walker P.L., Gunn A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate and lipid levels. *Entomol. Exp. Appl.*, **101**: 207-217.

Références bibliographiques



- Boyanova L., Kolarov R., Gergova G., Mitov I. (2006). In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, **12**:173-177.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **7**: 248-254.
- Brodtschneider R., Moosbeckofer R., Crailsheim K. (2010). Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *Journal of Apicultural Research*, **49(1)**: 23-30.
- Brosgaard C.J., Jensen S.E., Hansen C.W., Hansen H. (1999). Spring treatment with oxalic acid in honeybee colonies as *Varroa* control. *DIAS Report Horticulture*, **6 (2)**: 1-16.
- Bubalo D., Pechhacker H., Licek E., Kezic N., Sulimanovic D. (2005). The effect of *Varroa destructor* infestation on flight activity and mating efficiency of drones (*Apis mellifera* L.). *Vet. Med. Austria*, **92**: 11–15.
- Burdock G. A. (1998), Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* **36**: 347-363.
- Buttel-Reepen HV. (1906). Apistica Beitrage zur Systematik, Biologie, sowie zur geschichtlichen und geographischen Verbreitung der Honigbiene (*Apis mellifera* L.), ihrer Varietaten und der übrigen *Apis*-Arten. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, **3**: 121-196.
- Calderone N. W. (2010). Evaluation of Mite-Away-IITM for fall control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern USA. *Exp. Appl. Acar.*, **50**: 123- 132.
- Caron D. M. (1999). Honey bee biology and beekeeping. *Wicwas Press*, LLC. Cheshire, CT. 355p.
- Carrasco-Letelier, L., Mendoza Y., Branchiccela M.B. (2012). Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay. *Chemosphere*.
- Cavalcante D., de Oliveira P., Góis S., Soares A., Cardoso J., Padilha F., de Albuquerque R. (2011). Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, **77(3)**:278-284
- Celli, G., Maccagnani, B. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, **56**:137-139.

Références bibliographiques



- Chakir A, Romane A, Marcazzan GL, Ferrazzi P. (2011). Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. *Arab J.Chem.* doi:10.1016/j.arabjc. 1.10.013.
- Challem J. (1995). Medical Journal Document Value of Bee Propolis, Honey and Royal Changing landscape and implications for therapy. *Drugs.* **72**:1-16.
- Charrière J.D. (2001). Optimisation of the oxalic acid trickling method and bee tolerability of different winter treatments: trials in Liebefeld during the last 3 years, Meeting of the European Group for Integrated Varroa Control, York, <http://www.apis.admin.ch/host/varroa/york.htm>.
- Charrière J.D., ImdorF A. (2002). Oxalic acid treatment by trickling against *Varroa destructor*: recommendations for use in central Europe and under temperate climate conditions. *Bee World*, **83**: 51-60.
- Charière J.O., Imdorf A., Kuhn .R. (2004). Bienenvertraglichkeit von Varroabehandlungen im Winter, Schweiz. *Bienen-Ztg.*, **4**:19-23.
- Chauzat M. P., Carpentier P., Madec F., Bougeard S., Cougoule N., Drajnudel P., Clément M.C., Aubert M., Faucon J.P. (2010). The role of infectious agents in parasites in the health of honey bee colonies in France. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, **49**: 31-39.
- Chauzat M.P., Martel A-C., Cougoule N., Porta P., Lachaize J., Zeggane S., Aubert M., Carpentier P., Faucon J.P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30**:103-111.
- Chefrour A., Battesti M.J., Ait K., Tahar A. (2007). Melissopalynologic and physicochemical analysis of some North-east Algerian honeys. *Eur. J. Sci. Res.*, **18**: 389-401.
- Chefrour A., Draiaia R., Tahar A., Ait Kaki Y., Bennadja S., Battesti M. (2009). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.*, **9**: 1276-1293.
- Chen C.N., Hsiao C.J., Lee S.S., Guh J.H., Chiang P.C., Huang C.C. Huang W.J. (2011). Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis *Nat. Prod. Res.*, **101**: 204-209.

Références bibliographiques



- Chikaraishi Y., Izuta H., Shimazawa M., Mishima M., Hara H. (2010). Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54(4)**:566-575.
- Chinakwe E.C. (2006). Antibacterial effect of honey formulation on bacteria isolated from wounds. *Nigerian J. Microbiol.*, **20(3)**: 1263-1267.
- Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lwt-Food Science and Technology*, **39**: 756-761.
- Cimpoi C., Hosu A., Miclaus V., Puscas A. (2012). Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **100**: 149-154.
- Cizmarik J., Trupl J. (1976). Effect of propolis on bacteria. *Pharimazie*, **31(9)**: 656-657.
- Clark A.G., Shamaan N.A. (1985). Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **22**: 249–261.
- Clark A. G. (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **92**: 419-446.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Feyereisen R., Oakeshott J.G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, **15** : 615–636.
- Clément H. (2002). Guide des miels. Paris, Rustica, 64 p.
- Clément H. (2009). L'abeille sentinelle de l'environnement. Paris, Alternatives, 144 p.
- Colin M.E., Vandame R., Jourdan P., Pasquale S. (1997). Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie*, **28**: 375-384.
- Collins A.M, PETTIS J.S. (2001). Effect of *Varroa* infestation on semen quality. *Am. Bee J.*, **141**:590-593.
- Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G. (2002). The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.*, **93**:857-63.
- Cooper R. (2007). Honey in wound care: antibacterial properties. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.*, **2(2)**:Doc51.

Références bibliographiques



- Cornuet J.M., Daoudi A., Mosshine E.H., Fresnaye J. (1988). Étude biométrique de populations d'abeilles Marocaines. *Apidologie*, **19**: 355-366.
- Cortopassi-Laurino M., Gelli D.S. (1991). Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidologie*, **22**: 61-73.
- Cunha I.B.S., Sawaya ACHF., Caetano F.M., Shimizu M.T., Marcucci M.C., Drezza F.T., Povia G.S., Carvalho P.O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J BrazChem Soc.*, **15(6)**:964-970.
- Currie R.W. (1999). Fluvalinate queen tabs for use against *Varroa jacobsoni* Oud.: efficacy and impact on honeybee, *Apis mellifera* L., queen and colony performance. *Am. Bee J.*, **139(11)**: 871- 876.
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23(2)**: 174-181.
- Dahle B. (2010). The role of *Varroa destructor* for honey bee colonies losses in Norway. *Journal of Apicultural Research*, **49 (1)**: 124-125.
- Dainat B., Evans J.D., Chen Y. P., Gauthier L., Neumann P. (2012). Dead or Alive: Deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78** : 981-987.
- Danert F.C., Zampini C., Ordoñez R., Maldonado L., Bedascarrasbure E., Isla M.I. (2014). Nutritional and functional properties of aqueous and hydroalcoholic extracts from argentinean propolis. *Natural Product Communications*, **9**: 167-170.
- Danka R.G., Rinderer T.E. (1986). Africanized bees and pollination, *Am. Bee J.*, **126**: 680-682.
- Davies T. G. E., Field L. M., Usherwood P. N. R., Williamson M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *Internat. Union Biochem. Molec. Biol. Life*, **59**: 151-162.
- De jong D., De jong P.H., Goncalves L.S. (1982). Weight loss and other damage to developing worker honey bees from infestation with *Varroa Jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, **21**: 161-167.
- De Jong, D., De Jong P.H. (1983). Longevity of Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). *J. Econ. Entomol.*, **76**: 766-768.



- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, **40**: 263-284.
- Deb Mandal M., Mandal S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J.Trop. Biomed.*, **1(2)**:154-160.
- Delorme J., Robert A. (1997). Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique. *Mont-Royal Québec*, p. 184.
- Demera J. H., Angert E.R. (2004). Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie*, **35**: 411-417.
- De Rodriguez G.O., De Ferrer B.S., Ferrer A and Rodriguez B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**: 599-502.
- Devillers J., Pham-Delègue M.H. (2002). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. *Editeurs Taylors & Francis*, Philadelphia, USA, 332p.
- Devillers J. *et al.* (2005). Utilisation de l'Abeille domestique (*Apis mellifera*) pour caractériser le niveau de contamination de l'environnement par les xénobiotiques industriels à caractère hydrophobe. Programme PNETOX 2001, 1-89.
- Dimov V., Ivanovska N., Bankova V., Popov S. (1992). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Vaccine*, **10**: 817-823.
- Dobrowolski J.W., Vohora S.B., Sharma K., Shah, S.A., Naqvi S.A.H., Dandiya P.C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J.Ethnopharmacol.*, **35**:77-82.
- Domerego R., Imbert G., Blanchard C. (2009). *Les remèdes de la ruche* Editions Alpens, Monaco, 95p.
- Donadieu Y. (2008). *La Propolis* Editions Dangles, Paris, 90p.
- Dong R., Zheng Y.N., Xu B.J. (2013). Phenolic profiles and antioxidant capacities of Chinese unifloral honeys from different botanical and geographical sources. *Food Bioprocess. Tech.*, **6(3)**: 762-770.
- Duay P., De Jong D., Engels W. (2003). Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, **34**: 61-65.
- Dworkin MM and Falkow S. (2006). Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. *Springer*, New York, NY, p. 1248.

Références bibliographiques



- Eguaras M., Palacio M.A., Faverin C., Basualdo M., Del Hoyo M.L., Velis G., Bedascarrasbure E. (2003). Efficacy of formic acid in gel for varroa control in *Apis mellifera* L.: Importance of the dispenser position inside the hive. *Veter. Parasitol.*, **111**: 241-245.
- El-Bassiony T.A., Saad N.M., El-Zamkan M.A. (2012). Study on the antimicrobial activity of Ethanol Extract of Propolis against Enterotoxigenic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in lab prepared Ice-cream. *Vet. World*, **5(3)**: 155-159.
- Elliott J.E., Bishop C.A., Morrissey C.A. (2011). Wildlife Ecotoxicology, forensic Approaches. Springer. 463 pp.
- Elzen P.J., Baxter J.R., Spivak M., Wilson W.T. (2000). Control of *Varroa jacobsoni* Oud. Resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie*, **31**: 437-441.
- Erkmen O. (2008). Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J. Med. Food*, **7**: 587-592.
- Farnesi A.P., Aquino-Ferreira R., De Jong D., Bastos J.K., Soares A.E.E. (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics Molecular Research*, **8**: 635-640.
- Farooqui T., Farooqui A. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: A critical review. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **6**: 188-199.
- Fell R.D., Tignor K. (2001). Miticide effects on the reproductive physiology of queens and drones. *Am. Bee J.*, **141(12)**: 888-889.
- Fernandez N., Coineau Y. (2002). Varroa, tueurs d'abeilles. Bien le connaître, pour mieux le combattre. Edition Atlantica, Biarritz, France, p 237.
- Finola M.S., Lasagno M.C., Marioli J.M. (2007). Microbiological and chemical characterisation of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, **100**: 1649–1653.
- Flandrois J.P. (1997). Bactériologie médicale, p.301.
- Floris I., Satta A., Cabras P., Garau V.L., Angioni A. (2004). Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *J. Econ. Entomol.*, **97(2)**: 187-191.
- Fluri P. (1994). Réflexions des chercheurs en apiculture sur la régulation de la durée de vie des ouvrières. *Journal suisse d'Apiculture*, **91**: 19-27.



- Fontanetti C.S., Christofolletti C.A., Pinheiro T.G., Souza T.S., Pedro-Escher J. (2010). Microscopy as a tool in toxicological evaluations, In: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. Méndez-Vilas, A. & Diaz, J, pp.(1001-1007), Badajoz: Formatex Research Center, ISBN 9788461461905.
- Fournier D., Bride J.M., Poirie M., Berge J.B., Plapp Jr.F.W. (1992). Insect glutathione S-transferases: biochemical characteristics of the major forms from housefly susceptible and resistant to insecticides. *Journal of Biological Chemistry*, **167**: 1840-1845.
- Frazier M., Mullin C., Frazier J. , Ashcraft S. (2008). What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal*, **148(6)**: 521-523.
- Frost E.H., Shutler D., Hillier N.K. (2013). Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *J. Exp. Biol.*, **216**: 2931-2938.
- Gabrys J., Konecki J., Krol W., Scheller S., Shani J. (1986). Free amino acids in bee hive product (propolis) as identified and quantified gas-liquid chromatography. *Pharmacol. Res. Commun.*, **18(6)**: 513-518.
- Gallai N., Salles J.M., Settele J., Vaissiere B.E. (2008). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econom.*, **68**: 810- 821.
- Gallai N., Salles J.-M., Settele J., Vaissiere B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.*, **68**: 810-821.
- Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Büchler R., Berg S., Ritter W., Mühlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G., Rosenkranz P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, **41**: 332-352.
- Gheldof N., Engeseth N.J. (2002). Antioxydant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.* **50(10)**: 3050-3055.
- Ghini S., Fernández M., Picó Y., Marín R., Fini F., Mañes J., Girotti S. (2004). Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**: 479-488.
- Ghisalberti E. L. (1979). Propolis: A review. *Bee World*, **60**: 59-84.

Références bibliographiques



- Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharmac. Bio. Anal.*, **41**:1220-34.
- Gonsales G.Z., Orsi R.O., Fernandes J.A., Prodigues P., Funari S.R. (2006). Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.*, **12**(2): 276-284.
- Gonzalez B.G., Martinez-Aguilar G., Hulten K.G. (2005). Severe staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics*, **115**:642-648.
- Gracia-Salinas M.J., Ferrer-Dufol M., Latorre-Castro E., Moneromanera C., Castillo-Hernandez J.A., Lucientes-Curd J. (2006). Detection of fluvalinate resistance in *Varroa destructor* in Spanish apiaries. *J. Apic. Res.*, **45**:101-105.
- Grange J.M., Davey R.W. (1990). Antibacterial properties of propolis. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **83**:159-60.
- Gregorc A., Planinc I. (2001). Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie* **32**: 333-340.
- Gregorc A., Planinc I. (2002). The control of *Varroa destructor* using oxalic acid. *Vet. J.*, **163**: 306-310.
- Gregorc A., Poklucar J. (2003). Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies. *Veto Parasitol.*, **111**: 351-360.
- Gregorc A., Pogacnik A., Bowen I.D. (2004). Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie*, **35**: 453-460.
- Gregorc A., Smodis Skerl M.I. (2006). Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatments. *Apidologie*, **38**: 296-305.
- Gregorc A., Smodis Skerl M.I. (2007). Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatments. *Apidologie*, **38**: 296-305.
- Grissa K., Cornuet J.M., Msadda K., Fresney J. (1990). Etude biométrique des populations d'abeilles tunisiennes. *Apidologie*, **21**: 303-310.
- Grixti J.C., Wong L.T., Cameron S.A., Favret C. (2009). Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biol. Conserv.*, **142**:75-84.
- Gülcin H., Alici A., Cesur M. (2005). Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**: 281-285.



- Gülçin I., Bursal E., Sehitoglu M.H., Bilsel M., Gören A.C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and chemical toxicology*, **48**: 2227-2238.
- Guzmán-Novoa E., Eccles L., Calvete Y., McGowan J., Kelly P. G., Correa-Benítez A. (2010). *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, **41**: 443-450.
- Gyles C.L., Fairbrother J.M. (2010). Pathogenesis of bacterial infections in animals: *Escherichia coli*. *Wiley-Blackwell*, **4**: 267-307.
- Haarmann T., Spivak M., Weaver D., Weaver B., Glenn T. (2002). Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entomol.*, **95**(1): 28-35.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jacobi W.B. (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.*, **249**: 7130-7139.
- Halawani E.M. (2006). A study on Salmonella typhimurium causing food poisoning in Al-Taif city and antibacterial effect of *Nigella sativa*, Honey and Camels urine. Ph.D Thesis. Taif University, Saudi Arabia.
- Halliwell B., Cross C.E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect*, **102**(10): 5-12.
- Hanselman B.A., Kruth S., Weese S.J. (2008). Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.*, **126**: 277-281.
- Hatjina F., Haristos L. (2004). Project Report to the Prefecture of Chalkidiki on the situation of Varroa and Nosema infestation levels of honey bee colonies situated in the Paliouri area. Project funded by Hellenic Ministry of Agricultural Development and Food for 2004- 2005. *Hellenic Institute of Apiculture*, p. 8.
- Hatjina F., Papaefthimou C., Charistos L., Dogaroglu T., Bouga M., Emmanouil C., Arnold G. (2013). Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie*, DOI:10.1007/s13592-013-0199-4.

Références bibliographiques



- Haubruge E., Nguyen B.K., Widart J., Thomé J.P., Fickers P., Depauw E. (2006). Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae): faits et causes probables. *Notes fauniques de Gembloux*, **59(1)**: 3-21.
- Hayaoka T., Gauterman W. C. (1982). Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various housefly strains and its effect on toxicity. *Pestic.Biochem. Physiol.*, **17**: 113-119.
- Hegazi A.G., Abd El-Hady F.K. (2009). Influence of honey on the suppression of human low density lipoprotein (LDL) peroxidation (in vitro) Evid Based. *BMC.Complement Altern Med.*, **6**:113-121.
- Hennebelle (2010). L'abeille In Doc apiculture.
http://dhennebelle.perso.sfr.fr/docapi.htm#_Toc22802410
- Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, **336**:348–350.
- Hepburn H.R., Radloff S.E. (1996). Morphometric and pheromonal analyses of *Apis mellifera* L. along a transect from the Sahara to the Pyrenees. *Apidologie*, **32 (1)**: 53-58.
- Higes M., Meana A., Suárez M., Llorente J. (1999). Negative long-term effects on bee colonies treated with oxalic acid against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, **30**:289-292.
- Howis M., Chorbiński P., Nowakowski P. (2010). Influence of exposure to formic acid on the physiological status of the apian (*Apis mellifera* L.) midgut. In Proceedings of the XLVIII Conference, *Scientific Apiculture Conference*, Puławy, Poland, 5–7, Poland, p. 21.
- 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. *J. Ethnopharmacol.*, **14**: 276-283.
- Hyne R.V., Maher W.A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **54**: 366–374.
- Iftikhar F., Arshad M., Rasheed F., Amraiz D., Anwar P. gulfraz M. (2010). Effects of acacia honey on wound healing in various rat models. *Phytother. Res.*, **24(4)**:583-6.
- Imdorf A., Charrière J.D., Bachofen B. (1997). De l'utilisation de l'acide oxalique comme varroacide. *Apiacta*, **32**: 89-91.

Références bibliographiques



- Imdorf A., Charrière J.D., Rosenkranz P. (1999). *Varroa* Control with Formic Acid. In: Fries I. (eds), Fair CT97-3686, “Coordination in Europe of integrated control of *Varroa* mites in honey bee colonies”, Ghent, Belgium, 24-31.
- Irish J., Carter D.A., Shokohi T., Blair S. E. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, 44 (3): 289-291.
- Ishida V.F.C.L., Negri G., Salatino A.,Bandeira, M.F.C.L. (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, **125 (3)**: 966-972.
- Isla M.I., Dantur Y., Zampini I.C., Salas A., Danert C., Arias M., Ordoñez R.M., Maldonado L., Bedascarrabure E., Nieva Moreno M.I. (2012a). Effect of seasonality on antimicrobial activity of San Juan (Argentina) propolis. Development of topical functionalized formulation. *Natural Product Communications*, **7**: 1315-1318.
- Isla M.I., Nieva Moreno M.I., Zampini I.C., Solórzano E., Danert F., Vera N., Sayago J.E., Bedascarrabure E., Maldonado L., Ordoñez R.M. (2012b). Argentine propolis: Its flavonoid and chalcone content and its relation with the functional properties. In: Farooqui T, Farooqui A (eds.) Beneficial effects of propolis on human health and chronic diseases, **8**: 161-169.
- Islam M., Islam M.N., Moniruzzaman M., Mottalib M., Sulaiman S.A., Gan S.H., Khalil M. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshihoneys stored for more than one year. *BMC Complement Altern. Med.*, **12(1)**:177.
- Jacobsen R. (2009). *Fruitless Fall : The Collapse of the Honeybee and the Coming jacobsoni* Oud. parasitism on temporal caste structure in honey bees. *Environ. Health Perspect.*, **102(10)**: 5-12.
- James R.R., Xu J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.*, **109**: 175-182.
- Jean-Proste P., Le Conte Y. (2005). Apiculture: Connaître l’abeille, conduit le rucher. *Edition Lavoisier*, Cachan, France.
- Jeddar A., Kharsany A., Ramsaroop U.G., Bhamjee A., Haffejee I.E., Moosa A. (1985). The antibacterial action of honey: an in vitro study. *S. Afr. Med. J.*, **67**:257-258.
- Jilani Imtinen B., Schweitzer H.J., khouja P., Zouaghi M. L., Ghrabi Z. (2008). Physicochemical properties and pollen spectra of honeys produced in Tunisia(Southwest of Kef). *Apiacta*, **43**: 38-48.

Références bibliographiques



- Johnson R.M., Wen Z., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2006). Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *J. Econ.Entomol.*, **99**: 1046-1050.
- Johnson R.M., Pollock H.S., Berenbaum M.R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.*, **102**: 474-479.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity. *Apidologie*, **41**: 312–332.
- Jonard L., Banh L., Pressac M., Just J., Bahuau M. (2006). Les défensines en physiopathologie humaines. *Revue générale et analyse prospective, IBS*, **21(6)**: 342-347.
- Jussi-Pekka R. (2001). The search for biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds, thèse de doctorat, University of Helsinki.
- Kacaniova M., Fatrcova-Sramkova K., Nozkova J., Melich M., Kadasi-Horakova M., Knazovicka V., Felsociova S., Kunova S., Mariassyova M. (2011). Antiradical activity of natural honeys and antifungal effect against *Penicillium genera*. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **46 (1)**: 92-96.
- Kalogeropoulou N., Konteles S.J., Troullidou E., Mourtzinou I., Karathanos V.T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, **116**: 452-461.
- Kammenga J.E., Dallinger R., Donker M.H., Köhler H.R., Simonsen V., Triebkorn R., Weeks J.M. (2000). Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risks assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **164**: 93-147.
- Kanbar G., Engels W. (2003). Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites, *Parasitol. Res.*, **90**: 349-354.
- Kartal M., Yıldız S., Kaya S., Kurucu S., Topcu G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, **86**: 69-73.
- Kedzia A. (1986). Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anaerobic bacteria. *Herba polonica*, **32 (1)**: 53-58.
- Kevan P.G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 373-393.



- Khalil M.I., N. Alam N., Moniruzzaman M., Sulaiman S.A., Gan S.H. (2011). Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *J. Food Sci.*, **76**: 921-928.
- Khalil M.I., Moniruzzaman M., Boukraâ L., Benhanifia M., Islam A., Islam N., Sulaiman S.A., Gan S.H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, **17**: 11199-11215.
- Kim Y.H., Chung H.J. (2011). The effect of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New biotechnology*, **28**:713-718.
- Kim M.J. *et al.* (2011). Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean *J. Microbiol.*, **49(1)**:161-164.
- Koç A.N., Silici S., Kasap F., Hörmet-Oz H.T., Mavus-Buldu H., Ercal B.D. (2011). Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *J. Med. Food.*, **14(1-2)**:128-134.
- Koru O., Toksoy F., Acikel C.H., Tunca Y.M., Baysallar M., Uskudar guclu A., Akca E., Ozkok tuylu A., Sorkun K., Tanyuksel M., Salih B. (2007). In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, **13**: 140-145.
- Kostaropoulos I., Papadopoulos A.I., Metaxakis A., Boukouvala E., Papadopoulou-Mourkidou E. (2001). Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroid in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**: 313-319.
- Kovak H., Crailsheim K. (1988). Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation. *J. Apic. Res.*, **27**: 230-238.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
- Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu S., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.*, **100**: 526-534.
- Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.*, **64**:235-240.

Références bibliographiques



- Kumazawa S., Nakamura J., Murase M., Miyagawa M., Ahn M.R., Fukumoto S. (2008). Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, **95**: 781-786.
- Kwakman P.H., Van den Akker J.P., Guclu A., Aslami H., Binnekade J.M., de Boer L. (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis*, **46**: 1677-1682.
- Kwakman P., Velde Te A., De Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C., Zaat S. (2010). How honey kills bacteria? *FASEB. J.*, **24**: 2576-2582.
- Kwakman P., Zaat S. (2012). Antibacterial components of honey. In *IUBMB Life*, **64**(1): 48-55.
- Lagadic L., Cuany A., Berge J. B., Echaubard M. (1993). Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide-resistant and lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **23**: 467-474.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F. (1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, *Editions Tec & Doc*, Paris, France, 320p.
- Lahouel M., Boutabet K., Kessa W., Alyane M. (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverse doxorubicin-induced acute renal oxidative stress. *African journal of pharmacy and pharmacology*, **4** (10): 224-232.
- Laidlaw H. H., Page R.E. (1997). Queen rearing and bee breeding. Wiewas Press, Cheshire, CT: 224-78.
- Leandro M., Luis G., Pereira D.J.A., Estevinho L. (2008). Antioxidant properties, total phenol and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*, **46**: 3482 – 3485.
- Le Conte Y. (2002). Mieux connaître l'abeille. In *Le traité rustica de l'apiculture*. Paris, Rustica, p.12-51.
- Le Conte Y. (2004). Mieux connaître l'abeille. La vie sociale de la colonie. In : Bruneau E., Barbançon J.-M., Bonnaffé P., Clément H., Domerego R., Fert G., Le Conte Y., Ratia G., Reeb C., Vaissière B. *Le traité Rustica de l'apiculture*. Rustica éditions, Paris, 12-83.

Références bibliographiques



- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, **41**: 353-363.
- Leita L., Muhlbachova G., Cesco R., Barbattini R., Mondini C. (2004). Investigation of the use of honeybees and honeybee products to assess heavy metals contamination. *Environ. Monitor Assess*, **43**: 1-9.
- Levy S.B. (2002). From tragedy the antibiotic era is born. In: Levy SB, ed. *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*, 2nd ed. Cambridge, MA, 1-14.
- Levy S.B., Marshall B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.*, **10**:S122–9.
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., Winston M.L. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J. Econ. Entomol.*, **93**(2): 189-198
- Locke B., Forsgren E., Fries I., de Miranda J.R. (2012). Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa* destructor-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied Environmental Microbiology*, **78**(1):227-35.
- Lodesani M., Pellacani A., Bergomi S., Carpana E., Rabitti T., Lasagni P. (1992). Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie*, **23**:257-272.
- Lodesani M., Colombo M., Spreafico M. (1995). Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, **26**: 67-72.
- Lodesani M., Costa C. (2005). Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues, *Bee World*, **86**:102-109.
- Lodesani M., Costa C., Serra G., Colombo R., Sabatini A.G. (2008). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, **39**:324-333.
- Lognon D. (2009). La propolis, richesse naturelle de la ruche. In Suite101.fr. [En ligne].http://phytotherapie.suite101.fr/article.cfm/la_propolis_richesse_naturelle_de_la_ruche.



- Lotti C., Fernandez M.C., Piccinelli A.L., Cuesta-Rubio O., Hernandez I.M., Rastrelli L. (2010). Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**:2209-2213.
- Loucif-Ayad W., Aribi N., Soltani N. (2008). Evaluation of secondary effects of some acaricides on *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase activities. *European Journal of Scientific Research*, **21(4)**: 642-649.
- Loucif-Ayad W., Achou M., Legout H., Alburaki M., Garnery L. (2014). Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, DOI: 10.1007/s13592-014-0331-0.
- Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, **38**: 254-261.
- Maggi M. D., Ruffinengo S. R., Damiani N., Sardella, N. H., Eguaras M. J. (2009). First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. Appl. Acar.*, **47**: 317-320.
- Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bar W., Krahenbuhl S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine*, **336**: 1142-1148.
- Makhloufi C., Kerkvliet D., Ricciardelli D'albore G., Choukri A., Samar R. (2010). Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. *Apidologie*, **41**: 509-521.
- Mandal S., DebMandal M., Pal N.K., Saha K. (2010). Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **3(12)**: 961-964.
- Mao W., Schuler M. A., Berenbaum M. R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **108**: 12657-12662.
- Marcangeli J.A., García M.C, Cano G., Distefano L., Martín M.L., Quiroga A., Raschia F., Vega C. (2003). Eficacia del Oxavar® para el control del ácaro *Varroa destructor* (Varroidae) encolmenas de *Apis mellifera* (Apidae). *Revista de la Sociedad deEntomología Argentina*, **62**:75-79.
- Marchenay P., Bérard L. (2007). *L'homme, l'abeille et le miel* Edition De Borée 223p.

Références bibliographiques



- Marinelli E., Formato G., Vari G., De Pace F.M. (2006). Varroa control using cellulose strips soaked in oxalic acid water solution. *Apiacta*, **41**:54-59.
- Martel A.C., Zeggane S., Aurieres C., Drajnudel P., Faucon J.P., Aubert M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol® 50. *Apidologie*, **38**:534-544.
- Martin-Hernandez R., Higes M., Pérez J. L., Nozal M. J., Gómez L., Meana A. (2007). Short term negative effect of oxalic acid in *Apis mellifera iberiensis*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **5**(4): 474-480.
- Martin C., Provost E., Roux M., Bruchou C., Crauser O., Clément J.J., Leconte Y. (2001). Resistance of the honey bee, *Apis mellifera* to the acarian parasite *Varroa destructor* behavioural and electroantennographic data. *Physiological Entomology*, **26**: 362-370.
- Martin S.J. (2001). The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.*, **38**:1082-1093.
- Martin S. J., Ball B. V., Carreck N. L. (2010). Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide treated *Varroa destructor* infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies.- *Journal of Apicultural Research*, **49** (1): 72-79.
- Martin S. J., Highfield A. C., Brettell L., Villalobos E. M., Budge G. E., Powell M., Nikaido S., Schroeder D. C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite.- *Science*, **336** (6086): 1304-1306.
- Martoja R., Martoja M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Ed. Masson et Cie*, 300-301.
- Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res.*, **52**(4):483-9.
- Maxwell D.M. (1992). The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**: 306-312.
- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasho honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, **91**:571-577.
- Medana C., Carbone F., Aigotti R., Appendino G., Baiocchi C. (2008). Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLCMS/MS. *Phytochem Anal*, **19**(1):32–39.

Références bibliographiques



- Miorin P. L., Levy Junior N. C., Custodio A. R., Bteritz W. A., Marcucci M. C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiology*, **95**: 913- 920.
- Mohammadzadeh S., Sharriatpanahi M., Manoochehr H., Amanzadeh Y., Ebrahimi S.E.S., Ostad S.N. (2007). Antioxydant power of Iranian propolis extract. *Food. Chem.*, **103**: 729-733.
- Molan P.C., Russell K.M. (1988). Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, **27(1)**:62-67.
- Molan P.C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. the nature of the antibacterial activity. *Bee World*, **73**: 5-28.
- Molan P.C., Allen K.L. (1996). The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48(11)**:1206-1209.
- Molan P.C., White R.J., Cooper R., Dunford C. (2000). The use of honey in wound management. *Nurse Standard*, **15(11)**: 63-68.
- Molan P.C. (2009). Debridement of wounds with honey. *J. Wound Technol.*, **5**: 12-7.
- Monzote F.L., Alarcón O., Setzer W. N. (2011). Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis* *Nat. Prod. Commun.*, **6(7)**:973-976.
- Moosbeckhofer R. (2001). Varroabekämpfung mit Oxalsäure im Träufelverfahren, *Bienenvater* **12**: 7-12.
- Moritz F., De Miranda J., Fries I., Le Conte Y., Neumann P., Paxton R.J. (2010). Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie*, **41**: 227-242.
- Moszer I., Jones L.M., Moreira S., Fabry C., Danchin A. (2002). SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Res.*, **30**: 62-65.
- Motoyama N., Dauterman W.C. (1980). Glutathione S-transferases: their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.*, **2**:49-69.
- Moure A., Cruz J. M., Franco D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M. J., Carlos Parajo J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, **72(2)**: 145-171.
- Muli E. M., Maingi J. M., Macharia J. (2008). Antimicrobial Properties of Propolis and Honey from the Kenyan Stingless bee, *Dactylurina Schimidti*. *Apiacta*, **43**: 49 - 61.

Références bibliographiques



- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashkraft S., Simonds R., vanEngeldorp D., Pettis J.S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0009754.
- Mundo M. A., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int. J. Food Microbiol.*, **97(1)**:1-8.
- Nakajima Y., Tsuruma K., Shimazawa M., Mishima S., Hara H. (2009). Comparison of bee products based on assays of antioxydant capacities. *BMC Complementary Altern. Med.*, **26**:9-14.
- Nanda V., Sarkar B. C., Sharma H. K., Bawa A. S. (2003). Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*, **16**: 613-619.
- Nanetti A., Büchler R., Charriere J.-D., Fries I., Helland S., Imdorf A., Korpela S., Kristiansen P. (2003). Oxalic acid treatments for varroa control, *Apiacta*, **38**:81-87.
- Narahashi T. (1992). Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **13**:236-241.
- Naranjo M., Denayer S., Botteldoorn N., et al. (2011). Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**: 4379-4381.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th edn. Approved Standard M7-A5. Wayne, PA: NCCLS.
- Nazzi F., Milani N., Della Vedova G. (2004). A semiochemical from larval food influences the entrance of *Varroa destructor* into brood cells. *Apidologie*, **35**: 403-410.
- Nazzi F., Brown S. P., Annoscia D., Del Piccolo F., Di Prisco G., Varricchio P., Della Vedova G., Cattonaro F., Caprio E., Pennacchio F. (2012). Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. - *PLoS Pathogens*, **8 (6)**: e1002735.
- Ndaisaba G., Bazira L., Habonimana E., Moteganya D.. (1993). Clinical and Bacteriological results in wounds treated with honey. *J. Orthopedic Surgery*, **7(2)**: 202-204.
- Negri G., Marcucci M.C., Salatino A., Salatino M.L.F. (2000). Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil, *Apidologie*, **29**:305-314.



- Nguyen B.K., Saegerman C., Pirard C., Mignon J., Widart J., Thirionet B. (2009). Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *J.Econ. Entomol.*, **102**:616-623.
- Nielson A.S., Brodsgaard C.J., Hansen H. (2000). Effects on detoxification enzymes in different life stages of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) treated with a synthetic pyrethroid (flumethrin). *ATLA*, **28**: 437-443.
- Noireterre P. (2011). Biologie et Pathogénie de *Varroa destructor*. *Bulletin des GTV*. **62**: 101-106.
- Nozal M.J., Bernal J.L., Gomez L.A., Higes M., Meana A. (2003). Determination of oxalic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, **3**: 181-188.
- Oldroyd B.P. (2007). What's killing American honey bee? *PLoS Biol.*, **5**: 1195-1199.
- Orantes-Bermejo F.J., Gómez-Pajuelo A., Megías-Megías M. Torres Fernández-Piñar C. (2010). Pesticide residues in beeswax and bee bread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, **49**: 243-250.
- Orrù G., Del Nero S., Tuveri E., Ciusa M., Pilia M., Erriu M. (2010). Evaluation of antimicrobial-antibiofilm activity of a hydrogen peroxide decontaminating system used in dental unit water lines. *Open Dent. J.*, **4**: 140-146.
- Orsatti C.L., Sforcin J.M. (2011). Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice. *Nat. Prod. Res.*, **1**:1-8.
- Orsi R. O., Sforcin J. M. , Rall V. L. M. , Funari S. R. C., Barbosa L., Fernandes J.R. A. (2005). Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J. Venomous Anim. Toxins including Trop. Dis.*, **11**: 109-116.
- Orsi R.O., Fernandes A., Bankova V., Sforcin J.M. (2011). The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in-vitro against *Salmonella* Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Nat. Prod. Res.*, **1**:1-8.
- Oršolić N., Knezević A., Sver L., Terzić S., Hackenberger B.K., Basić I. (2003). Influence of honey bee products on transplantable murine tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, **14**(4):216-226.
- Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu M.T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, **44**: 375-8.

Références bibliographiques



- Ouchemoukh S., Louaileche H., Schweizer P. (2007). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honey. *Food Control*, **18**: 52-58.
- Ouchemoukh S., Schweizer P., Bachir Bey M., Djoudad-Kadji H., Louaileche H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.*, **121**: 561-568.
- Ozcan M., Unver A., Ceylan D.A., Yetisir R. (2004). Inhibitory effect of pollen and propolis extracts *Nahrung*, **48(3)**:188-194.
- Page R.E., Peng C.V. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, **36**: 695-711.
- Papadopoulos A. I., Stamkou E. I., Kostaropoulos I., Papadopoulou Mourkidou E. (1999). Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* larvae. *Pestic.Biochem. Physiol.*, **63**: 26–33.
- Papadopoulos A. I., Boukouvala E., Kakaliouras G., Kostaropoulos I., Papadopoulou-Mourkidou E.. (2000). Effect of organophosphate and pyrethroid insecticides on the expression of GSTs from *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic.Biochem. Physiol.*, **68**: 26-33.
- Papadopoulos A. I., Polemitou I., Laifi P., Yiangou A., Tananaki C. (2004). Glutathione Stransferase in the developmental stages of the insect *Apis mellifera macedonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C., **139**: 87-92.
- Park Y. K., Matias de Alencer S., Fonseca de Moura F., Ikegaki M. (1999). Biological activities of propolis. *Revista OESP-Alimentação*: 27.
- Park Y.K, Alencar S.M., Aguiar C.L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2502-2506.
- Paxton R.J., Klee J., Korpela S., Fries I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, **38**: 558- 565.
- Pepeljnjak S., Jalsen Jak I., Maysinger D. (1982). Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. *Phamazie*, **37 (12)**: 864-865.
- Pepeljnjak S., Jalsenjak I., Maysinger D. (1985). Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, **40(2)**: 122-123.
- Perri de carvalho P.S., Tagliavini D.G., Tagliavini R.L. (1991). Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em



- feridas infectadas – Estudo clínico e histológico em ratos. *Rev. Ciênc. Bioméd.*, **12**:39-50.
- Perugini M., Manera M., Grotta L., Abete M.C., Tarasco R., Amorena M. (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biol. Trace Elem. Res.*, **140**: 170-176.
- Pessolato A.G., Martins D.D., Ambrósio C.E., Mançanares C.A., de Carvalho A.F. (2011). Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns*, **37**(7):1192-1201.
- Piazza M.G., Accorti M., Persano Oddo L. (1991). Electrical conductivity, Ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura*, **7**:51-63.
- Pichichero E., Canuti L., Canini A. (2009). Characterization of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *J. Sci. Food Agric.*, **89**: 609-16.
- Ponikvar M., Snajder J., Sedej B. (2005). Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂. *Apidologie*, **36**:403-409.
- Popova M., Bankova V., Naydensky C.H. (2002). Comparative study of the biological activity of propolis from different geographic origin: a statistical approach. *Macedonian Pharm. Bull.*, **50**:9-14.
- Popova M., Reyes, Le Conte Y., Bankova V. (2014). Propolis chemical composition and honeybee resistance against Varroa destructor. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, DOI: 10.1080/14786419.2014.881366.
- Porrini C., Sabatini A.G., Girotti S., Ghini S., Medrzycki P., Grillenzoni F., Bortolotti L., Gattavecchia E., Celli G. (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta.*, **38**: 63-70.
- Potts S.G., Roberts S.P.M., Dean R., Marris G., Brown M.A., Jones R., Neumann P., Settele J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, **49**: 15-22.
- Prandin L., N. Dainese B. Girardi O. Damolin R. Piro, Mutinelli F.(2001). A scientific note on long-term stability of a homemade oxalic acid water sugar solution for controlling varroosis. *Apidologie*, **32**:451-452.

Références bibliographiques



- Prisco G., Pennacchio F., Caprio E., Boncristiani h. F. JR, Evans J. D., Chen Y. (2011). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Genetic Virology*, **92 (1)**: 151-155.
- Pulkkanen K.J., Laukkanen M.O., Naarala J., Yla- Herttuala S. (2000). False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis*, **5**: 33-329.
- Punzo F. (1993). Detoxification enzymes and the effects of temperature on the toxicity of pyrethroids to the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **105**: 155-158.
- Quarles W. (1996). EPA exempts least-toxic pesticides. *IPM Practitioner*, **9**: 16-17.
- Quintero-mora M.L., Londoño-orozco A., Hernández-Hernández F., Manzanogayosso P., López-martínez R., Sotozárate C.I., Carrillo-Miranda L., Penierescarrillo G., Garcia-Tovar C.G., CruzsanchezT.A. (2008). Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. *Rev.Iberoam. Micol.*, **25**: 22-26.
- Rademacher E., Harz M. (2006). Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review. *Apidologie*, **37**: 98-120.
- Rader R., Howlett B.G., Cunningham S.A., Westcott D.A., Newstrom-Lloyd L.E., Walker M.K., Teulon D.A.J., Edwards W. (2009). Alternative Pollinator Taxa are Equally Efficient but not as Effective as the Honeybee in a Mass-flowering Crop, *Journal of Applied Ecology*, **46**: 1080-1087.
- Rahman M.M., Richardson A., Sofian-Azirun M.F. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **4(16)**: 1872-1878.
- Rahmanian M., Khouhestani A., Ghavifekr H., Tersarkissan N., Ionoso G. *et al.* (1970). High Ascorbic acid content in some Iranian honeys: Chemical and biological assays. *J. Nutr. Metab.*, **12**: 131-135.
- Ramanauskienė K., Inkėniene AM. (2011). Propolis oil extract: quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.*? Jun 30.
- Ratnieks F.L.W., Carreck N.L. (2010). Clarity on honey bee collapse? *Science*, **327**: 152-153.
- Ray D. E., Fry J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Ther.*, **111**: 174-193.

Références bibliographiques



- Rebiai A., Lanez T., Belfar M.L. (2011). *In vitro* evaluation of antioxidant capacity of Algerian propolis by spectrometrical and electrochemical assays. *International Journal of Pharmacology*, **7**: 113-118.
- Recrosio P. (2010). Le miel et ses bienfaits médicaux. *In Suite101.fr. Res.*, **15**:23-28.
- Rinderer T.E., De Guzman L.I., Lancaster V.A., Delatte G.T., J.A., Stelzer J.A. (1999). *Varroa* in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bees. *Am. Bee J.*, **139**: 134-139.
- Rodríguez-Malaver A.J., Rasmussen C., Gutiérrez M.G, Gil F., Nieves B. Vit P. (2009). Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Natural Product communications*, **4(9)**:1221-1226.
- Rojas Hernandez N. M.,Candelario M.,Olivares E. (1993):Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. *Revista Biología (Habana)*, **7 (1)**: 69-75.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*.*J. Invertebr. Pathol.*, **103** : 96-119.
- Sabatini A.G. (2005). L'Abeille bio-indicateur, l'abeille sentinelle de l'environnement. *Abeille & Compagnie*, **108**: 12-16.
- Sahinler N, Gul A. (2004). Highland and biochemical analysis of sunflower honey i. 4. *National Animal Science Congress*, Isparta, Turkey.
- Saifutdinova Z., Shangaraeva G. (1997). Honeybee populations as ecotoxicological indicators. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **8**: 379- 596.
- Saissy J.M., Guignard B., Pats B., Guiavarch M., Rouvier B. (1995). Pulmonary edema after hydrogen peroxide irrigation of a war wound. *Intens. Care Med.*, **21**: 287-288.
- Sancho M.T., Muniategui S., Huidobro J.F. Simal J. (1992). Evaluating soluble and insoluble Ash, alkalinity of soluble and insoluble ash and total alkalinity of Ash in honey using electrical conductivity measurements at 20°C. *Apidologie*, **23**: 291-297.
- Santos F.A., Bastos E.M.A., Uzeda B., Carvalho M.A.R., Farias E.S.A., Braga F.C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J.Ethnopharmacol.*, **80**: 1-7.

Références bibliographiques



- Satta A., Floris I., Eguaras M., Cabras P., Garau V. L., Melis M. (2005). Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean Area. *J. Econ. Entomol.*, **98** (2):267-273.
- Saxena S., Gautam S., Sharma A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, **118**:391-397.
- Schäfer M. O., Ritter W., Pettis J. S., Neumann P. (2010). Winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*): The role of infestations with *Aethina tumida* and *Varroa destructor*. *Journal of Economic Entomology*, **103**: 10-15.
- Schneider P., Drescher W. (1987). The influence of *Varroa jacobsoni* Oud. on weight, development and hypopharyngeal glands, and longevity of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **18**: 101-109.
- Schneider S., Eisenhardt, D., Rademacher E. (2011). Sublethal Effects of Oxalic Acid on *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Changes in Behavior and Longevity. *Apidologie* **43**:218–225.
- Schneider C.W., Tautz J., Grunewald B., Fuchs S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7:e30023 DOI 10.1371/journal.pone.0030023.
- Schreck R., Rieber P., Baeuerle P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-Kb transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, **10**(8): 2247-58
- Schultsz C., Geerlings S. (2012). Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: Changing landscape and implications for therapy. *Drugs*, **72**:1-16.
- Segueni N., Alabdul Magid A., Decarme M., Rhouati S., Lahouel M., Antonicelli F. (2011). Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Medica*, **12**: 212-218.
- Sforcin J. M., Bankova V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.*, **133**: 253-260.
- Shen M., Yang X., Cox-Foster D., Cui L. (2005). The role of *varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, **342**: 141-149.



- Sherby S. M., Eldefrawi A. T., Deshpande S. S., Albuquerque E. X., Eldefrawi M. E. (1986). Effects of pyrethroids on nicotinic acetylcholine receptor binding and function. *Pest Biochem. Phys.*, **26**: 107-115.
- Shimizu K., Ashida H., Matsuura Y., Kanazawa K. (2004) Antioxydative bioavailability of artemisin C in Brazilian propolis *Arch. Biochem. Biophys.*, **424(2)**:181-188.
- Shimizu T., Matsuura Y., Kanazawa K. (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*, Article ID 976196, 9 p.
- Silva J.C., Rodrigues S., Feás X., Estevinho L.M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol.*, **50**: 1790-1795.
- Silva L. R., Videira R., Monteiro A. P., Valentao P., Andrade P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, **93**: 73-77.
- Silva-Zacarin E.C.M., Gregorc A., Silva de Moraes R.L.M. (2006). In situ localization of heat shockproteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honey bee larvae, *Apidologie*, **37**: 1-9.
- Simões L.M.C., Gregório, L.E., Silva filho A.A., Souza, M.L., Azzolini A.E.C.S., Bastos, J.K., Lucisano-Valim Y.M. (2004). Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J. Ethnopharmacol.*, **94**:59-65.
- Simon A., Traynor K., Santos K., Blaser G., Bode U., Molan P. (2009). Medical honey for wound care--still the 'latest resort'? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **6(2)**:165-73.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, **299**: 152-178.
- Smirle M. J., Winston M. L. (1987). Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, **80**: 5-8.
- Smirle M.J. (1993). The influence of colony population and brood rearing intensity on the activity of detoxifying enzymes in worker honey-bees. *Physiol. Entomol.*, **18**: 420-424.

Références bibliographiques



- Smirnov A.M. (1978). Research results obtained in USSR concerning etiology, pathogenesis, epizootiology, diagnosis and control of varroa disease. *Apiacta*, **13**:149-162.
- Snow M., Manley-Harris M. (2004). On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand Manuka honey. *Food Chem.*, **84**: 145-147.
- Socha R., Juszczak L., Pietrzyk S. Fortuna T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chem.*, **113**:568-74.
- Soderlund D.M., Bloomquist, J.R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, **34**: 77-96.
- Sokol R. (1996). Effects of long-term persistence of Fluwarol (fluvalinate) on honey bee colonies. *Med. Weter.*, **52**(11): 718-720.
- Solórzano E., Vera N., Cuello S., Ordoñez R., Zampini C., Maldonado L., Bedascarrasbure E., Isla M.I. (2012). Chalcones in bioactive Argentine propolis collected in arid environments. *Natural Product Communications*, **7**: 879-882.
- Song Y.S., Park E., Hur G.M., Ryu Y.S., Kim Y.M., Jin C. (2002). Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *J Ethnopharmacol.*, **80**: 155-161.
- Sosa S., Bornancin A., Tubaro A., Loggia R.D. (2007). Topical antiinflammatory activity of an innovative aqueous formulation of actichelated propolis vs two commercial propolis formulations. *Phytother. Res.*, **21**:823-826.
- Spürgin A. (2008). Guide de l'abeille. Paris, Delachaux et Niestlé, 126 p.
- Srisayam M., Chantawannakul P. (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of honeys produced by *Apis Mellifera* in Thailand. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*, **2** (2): 77-83.
- Stanghellini M.S., Raybold P. (2004). Evaluation of selected biopesticides for the late fall control of varroa mites in a northern temperate climate. *Am. Bee J.*, **144**: 475-486.
- Stokstad E. (2007). The case of the empty hives. *Science.*, **316**: 970-972.
- Stone D., Jepson P., Laskowski R. (2002). Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, **132**: 105-112.
- Stoner A., Wilson W.T., Harvey J. (1985). Honey bee exposure to beeswax foundation impregnated with fenvalerate or carbaryl. *Am. Bee J.*, **125**: 513-516.



- Strachecka A., Paleolog J., Olszewski K., Borsuk G. (2012). Influence of Amitraz and Oxalic Acid on the Cuticle Proteolytic System of *Apis mellifera* L. Workers. *Insects*, **3(3)**: 821-832.
- Strateva T., Yordanov D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.*, **58**: 1133-1148.
- Straub P. (2007). Faune et Flore. L'abeille sentinelle écologique. in *Science. Direct. Com.*
- Subrahmanyam M., Archan H., Pauer S.G. (2001). Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Annals of Burns and FireDisaster*, **14(1)**: 124-128.
- Sudhanshu S., Satyendra G., Arun S. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food. Chem.*, **118**: 391-397.
- Sulaiman A., Milton W., Al'Abri k. (2012). Antibacterial potential of honey from different origins: a comparison with manuka honey. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **1(5)**: 1328-1338.
- Szymas B., Langowska A., Kazimierczak-Baryczko M. (2012). Histological structure of the midgut of honey bees (*Apis mellifera* L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics. *Journal of Apicultural Science*, **56(1)**, DOI: 10.2478/v10289-012-0001-2.
- Tan H.T., R.A. Rahman, S.H., Gan A.S., Halim S.A., Hassan S., Sulaiman A., Kirnpal-Kaur B. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complement.Altern.Med.*, **9**: 34.
- Taormina P. J., Niemira B. A., Beuchat L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, **69**: 217-25.
- Taylor K. S., Waller G. D., Crowder L. A. (1987). Impairment of a classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. *Apidologie*, **18**: 243-252.
- Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chem.*, **46**: 3133-3141.

Références bibliographiques



- Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E. (2004). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7185-7191.
- Terrab A., Recamales A.F., Hernanz D., Heredia F.J. (2004). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chem.*, **88**: 537-542.
- Tomczak C. (2010). Utilisation du miel dans le traitement des plaies., Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.
- Topolska G., Gajda A., Pohorecka K., Bober A., Kasprzak S., Skubida M., Semkiw P. (2010). Winter colony losses in Poland. *Journal of Apicultural Research.*, **49**: 126-128.
- Trouiller J. (1998). Monitoring of *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in Europe. *Apidologie*, **29**: 537-546.
- Trucheva B., Todorov I., Ninova M., Najdenski H., Daneshmand A., Bankova V. (2010). Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis *Chemistry Central journal*, **4**:8.
- Tsiapara A., Jaakkola M., Chinou I., Graikou K., Tina Tolonen V.V.a.P.M. (2009). Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chem.*, **116**: 702-708.
- Tumin N., Halim N.A., Shahjahan M., Noor I.N.J., Sattar M.A., Khan A.H., Mohsin S.S. (2005). Antibacterial activity of local Malaysian honey, *Malays. J. Pharmaceut. Sci.*, **3**: 1-10.
- Tylkowski B., Trusheva B., Bankova V., Giamberini M., Peev G., Nikolova A. (2010). Corrigendum to extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, **348**: 124-130.
- Ugur A., Arslan T. (2004). An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med Food*, **7**: 90-4.
- Umthong S., Phuwapraisirisan P., Puthong S., Chanchao C. (2011). In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**:37-33.

Références bibliographiques



- Uthurry C.A., Hevia D., Gomez-Cordoves C. (2011). Role of honey polyphenols in health. *Journal of Api. Product and ApiMedical Science*, **3(4)**: 141-159.
- Valcic S., Montenegro G., Mujica A. M., Avila G., Franzblan S., Singh, M., Maiese W.M., Timmerman B. N. (1999). Phytochemical, Morphological and Biological investigation of propolis from Central Chile. *Z.Naturforsch.*, **54**: 406-416.
- Van Delden C., Iglewski B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, **4**: 551-560.
- Van den Berg A.J., Van den Worm E., Van Ufford H.C., Halkes S.B., Hoekstra M.J., Beukelman C.J. (2008). An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *J. Wound Care*, **17(4)**:172-174.
- vanEngelsdorp D., Saegerman E. J., Mullin C., Haubruge C., Nguyen E., Frazier B. K., Frazier M., Coxfoister J., Chen D., Underwood Y. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE*, **4**: 64-81.
- 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. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**: 80- 95.
- Vanhanen Leo P., Emmertz Andrea, Savage Geoffrey P. (2011). Mineral analysis of monofloral New Zealand honey. *Food Chemistry*, **128 (1)**: 236-240.
- Vera N., Solorzano E., Ordoñez R., Maldonado L., Bedascarrasbure E., Isla M. (2011). Chemical composition of Argentinean propolis collected in extreme regions and its relation with antimicrobial and antioxidant activities. *Nat. Prod. Commun.*, **6**:823-827.
- Wagnitz J., Ellis M.D. (2010). The effect of oxalic acid of honey bee queens. *Science of Bee Culture*, **138 (12)**: 8-11.
- Wahdan H. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. In *Infection*, **26(1)**: 26- 31.
- Walker P., Crane E. (1987). Constituents of propolis. *Apidologie*, **18(4)**: 327-334.
- Wallner K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, **30**: 235- 248.
- Wallowork-Barber A. K., Ferenbaugh R. W., Gladney E. S. (1982). The use of honey bees as monitors of environmental pollution. *American Bee Journal*, **122 (11)**: 770- 772.
- Wang X.H., Andrae L., Engeseth N.J. (2002). Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *J. Agric. Food. Chem.*, **50**: 6923-6928.

Références bibliographiques



- Wang X. W., Xu S. M., Peng L., Wang Z., Wang C. L., Zhang C. B., Wang X. B. (2012). Exploring Scientists' Working Timetable: Do Scientists Often Work Overtime. *Journal of Informetrics*, **6(4)**: 655-660.
- Watt B.E., Proudfoot A.T., Vale J.A. (2004). Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol.*, **23**: 51-57.
- Weese J.S. (2008). A review of multidrug resistant surgical site infections. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, **21**:1-7.
- Weinberg K.P., Madel G. (1985). The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud on the protein concentration and the hemolymph volume of the brood of workers and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, **16**: 421- 436.
- Wendling S. (2012). *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000), un acarien ectoparasite de l'abeille domestique *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Revue bibliographique et contribution à l'étude de sa reproduction. Thèse de doctorat vétérinaire, *Faculté de Médecine, Créteil*, 190 p.
- Wermelinger A. (2013). Zeitgemässe und zielgerichtete Imkermethoden. FreeTheBees, Lutte alternative contre le varroa.
- Werner A., Laccourreye O. (2011). Honey in otorhinolaryngology: When, why and how? *European Annals of Otorhinolaryngology and Head Neck Disease*, **128**: 133-137.
- Westman E.L., Matewish J.M., Lam J.S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: In:Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell.(Gyles C.L., PrescottJ.F., Songer .G, et al., Ed), *4th Edition*:443- 448.
- White J. W. Subers M. H. (1963). Studies on honey Inhibine: A chemical assay. *Journal of Apicultural Research*, **2(2)**: 93-100.
- White Jr. J.W. (1978). Honey. In: Chichester CO, Mrak EM and Stewart GF (Eds.). *Advances in Food Research*, Academic Press, New York, pp: 298.
- Whitehorn P.R., O'Connor S., Wackers F.L., Goulson D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces Bumble Bee colony growth and queen production. *Science*, **336**: 351-352.
- Woisky R.G., Salatino A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, **37**: 99-105.
- Wootton M., Edwards R.A., Rowse A. (1978). Antibacterial properties of some Australian honeys. *Food Technol.*, 175-178.

Références bibliographiques



- Wu-yuan C.D., Green L., Birch W. X. (1990). In vitro screening of Chinese medicinal toothpastes: Their effects on growth and plaque formation on mutans streptococci. *Caries Res.*, **24**: 198-202.
- 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.
- Yao L., Datta N., Tomas-Barberan F.A., Ferreres F., Martos I., Singanusong R. (2003). Flavonoid, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, **81(2)**: 159-168.
- Yao L., Jiang Y., Singanusong R., Datta N., Raymont K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chem.*, **86**: 169-177.
- Yatsunami K., Echigo T. (1984). Antibacterial action of honey and royal jelly. *Honeybee Sci.*, **5**: 125-130.
- Yu S. J., Robinson F. A., Nation J. L. (1984). Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pest Biochem. Physiol.*, **22**:360-368.
- Zerrouk S.H., Fallico B.G., Arena E.N., Ballistreri G.F., Boughediri L.A. (2011). Quality evaluation of some honey from the central region of Algeria.Jordan., *Journal of Biological Sciences*, **4(4)**: 243-248.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoidcontents in mulberry and their scavenging effects on superoxideradicals. *Food Chem.*, **64**:555-559.

ANNEXES

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications Internationales (2):

1. **Neila NEDJI & Wahida LOUCIF-AYAD**, 2014. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(6): 433-437. (www.elsevier.com/locate/apjtd)
2. **Neila NEDJI & Wahida LOUCIF-AYAD**, 2014. Antimicrobial Effects of Algerian Honey on Pathogenic Food-Related Bacteria. *Advance Journal of Food Science and Technology* 6(11): 1194-1200.

Communications Internationales (5):

1. **NEDJI N. & AYAD-LOUCIF W.**, **2011**. Diversité phytogéographique et activité antimicrobienne du miel. *Congrès Euro-méditerranéen, Biodiversité Animale et Ecologie de la Santé*. Annaba, 15-18 octobre 2011.
2. **AYAD-LOUCIF W. & NEDJI N. & SOLTANI N.**, **2011**. Antimicrobial activity of propolis produced by *Apis mellifera intermissa* from different phytogeographic regions of Algeria. *Les Journées Internationales de Biotechnologie de l'Association Tunisienne de Biotechnologie*. Tunisie, 19-22 décembre 2011.
3. **AYAD-LOUCIF W. & NEDJI N. & SOLTANI N.**, **2013**. Propolis and health. *17th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region*. Istanbul, 28 septembre-1er octobre 2013.
4. **AYAD- LOUCIF W.; NEDJI N. & SOLTANI N.**, **2013**. Evaluation of the potential of Algerian Propolis. *Les Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2013)*, Tunisie, 21 - 24 décembre 2013.
5. **NEDJI N. & AYAD-LOUCIF W.** **2014**. Study of the antibacterial activity of ethanolic extract of Algerian propolis against food-borne pathogens. *Séminaire International sur les Sciences Alimentaires (SISA)*. Constantine, 14-16 octobre 2014.

Communications Nationales (4):

- 1. AYAD-LOUCIF W., NEDJI N., ACHOU M., CHEFROUR A. & MAAZI M.C., 2012.** Les principales pathologies l'abeille mellifère et leurs traitements. *1ère Journée sur l'Apiculture: Perspectives et développement.* Souk-Ahras, le 12 décembre 2012.
- 2. AYAD-LOUCIF W., BOUCHEMA W.F., NEDJI N., ROUIBI A., ACHOU M. & SOLTANI N., 2012.** La varroase, maladie des abeilles: état des lieux et moyens de lutte contre l'agent causal. *1ère Journée sur l'Apiculture: Perspectives et développement.* Souk-Ahras, le 12 décembre 2012.
- 3. NEDJI N., SOLTANI N. & AYAD-LOUCIF W., 2012.** Etude de l'activité bactériostatique des miels algériens. *1ère Journée sur l'Apiculture: Perspectives et développement.* Souk-Ahras, le 12 décembre 2012.
- 4. AYAD- LOUCIF Wahida & NEDJI Neila.** Etude in vitro de l'activité antibactérienne de la propolis algérienne. *Les Deuxièmes Journées du Département de Pharmacie.* Annaba, 28- 29 mai 2014.

**Antimicrobial activity of algerian
propolis in foodborne pathogens and
its quantitative chemical composition**



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd

Document heading

doi:10.1016/S2222-1808(14)60601-0

© 2014 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition

Neila Nedji¹, Wahida Loucif–Ayad^{1,2*}¹Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, 23000–Annaba, Algeria²Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University, 23000–Annaba, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Noureddine Soltani, Department of Biology, University Badji, Mokhtar, Annaba, Algeria.

E-mail: nadia_mazouni@yahoo.fr

Comments

Propolis is a natural product and constitutes an alternative to chemical compounds in medicine and foods. The study aimed evaluation of the antimicrobial of propolis collected from different regions of Algeria. Bioassays were conducted according to conventional procedures. Results evidenced a strong antibacterial activity correlated with chemical composition of propolis and suggest its potential use in foods. The paper is good, and adequately describes its purpose. Results and discussion are well written.

Details on Page 436

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antimicrobial activity of propolis samples collected from different regions of Algeria and their chemical composition.

Methods: The antibacterial activity of ethanolic extract of Algerian propolis against *Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R) was evaluated by the disc diffusion method and determined as an equivalent of the inhibition zones diameters after incubation of the cultures at 37 °C for 24 h. The investigation of the polyphenol and flavonoid contents was done spectrophotometrically.

Results: The ethanolic extract of Algerian propolis samples inhibited the growth of all examined microorganisms with the highest antimicrobial activity against the Gram–positive bacteria. Polyphenol and flavonoids contents were variable, depending on the propolis samples and a positive correlation between antimicrobial activity and chemical composition was observed.

Conclusions: Antimicrobial activity, polyphenol and flavonoid contents were variable, depending on the propolis sample. The strong antimicrobial activity of *Algerian propolis* may be due to high total phenolic and flavonoid contents and this study suggests potential use of propolis in foods.

KEYWORDS

Algerian propolis, Antimicrobial activity, Polyphenols, Flavonoid contents

1. Introduction

Bacteria are considered as one of the major causes of serious and dangerous infections in human and animal. Food–borne diseases caused by the consumption of contaminated foods have a wide economic and public health impact worldwide. Many pathogenic microorganisms [*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*),

Bacillus cereus (*B. cereus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)] have been reported as the causal agents of food–borne diseases[1,2]. A variety of different chemical and synthetic compounds have been used as antimicrobial agents to inhibit bacteria in foods but with the increase of bacterial resistance to antibiotics, there is considerable interest to investigate the antimicrobial effects of different natural products

*Corresponding author: Wahida Loucif–Ayad, Badji Mokhtar University, 23000–Annaba, Algeria.

Tel: +213 774091021

E-mail: wahloucif@yahoo.fr

Foundation Project: Supported by the Algerian Fund for Scientific Research and by the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria, CNEPRU project to Dr. W. Loucif–Ayad (Grant No.F011 2011 / 00097).

Article history:

Received 25 Apr 2014

Received in revised form 3 May, 2nd revised form 17 May, 3rd revised form 30 May 2014

Accepted 10 Jun 2014

Available online 28 Dec 2014

against a range of bacteria[2].

Propolis is a resinous material that is collected by honeybees from buds, leaves, bark, and exudates of several trees and plants[3]. It has been used both internally and externally in traditional medicine. Propolis is an interesting alternative to be considered in new applications of food technology[1,2]. Propolis chemical composition is complex and varies according to its botanical and phytogeographical origin[4,5]. In general, propolis in nature is composed of 30% wax, 50% resin and vegetable balsam, 10% essential and aromatic oils, 5% pollens and 5% various other substances, including organic compounds and minerals[6–8]. Among these organic compounds, we may find phenolic compounds and flavonoids[3]. Propolis has attracted much attention in recent years as an useful ingredient applied in medicine, domestic products, and food products, since it possesses various biological properties including antioxidant[9], fungicidal[6,10], and antimicrobial effects[6,11–13]. The antimicrobial effect of propolis is due to its components that are mostly of phenolic nature, mainly flavonoids, as the simple phenols, phenolic acids and polyphenols are active antimicrobial agents[14]. Numerous reports describe the antibacterial properties of propolis but there has been only limited research on antimicrobial activity of Algerian propolis[15–19].

The present investigation was undertaken to evaluate the antibacterial potential of ethanolic extracts of Algerian propolis against a range of food-borne pathogenic bacteria and its quantitative chemical composition with the possible use as a natural antimicrobial agent in pharmaceutical or food industries.

2. Materials and methods

2.1. Propolis samples and extracts preparation

Propolis samples were gathered from honeybee colonies of the local strain *Apis mellifera intermissa* in four regions of Annaba, Northeastern Algeria: Seraidi (SP), Chetaibi (CP), Berrehal (BP) and El-Bouni (EP). All the samples were collected by using plastic nets in September and October 2012. The production of an ethanol extract of propolis (EEP) was adapted from the method of Miorin PL *et al*[20]. Propolis samples were grounded and 30 g of propolis were dissolved in 100 mL of 70% ethanol in tightly closed bottles with periodic stirring at room temperature for 7 d. The mixture is filtered twice and solutions were concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C. The residue was dissolved in a minimal volume of ethanol and kept at

room temperature in the dark until use.

2.2. Polyphenols of EEP

Total polyphenol contents in extract were determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method[21]. Extract solution (0.5 mL) was mixed with 0.5 mL of the Folin–Ciocalteu reagent and 0.5 mL of 75 mg/mL Na₂CO₃, after 1 h of incubation at room temperature the characteristic blue color developed. Absorbance of the clear supernatants was measured at 725 nm. The total polyphenol content was calculated based on a standard curve prepared using gallic acid and expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of sample.

2.3. Flavonoids of EEP

Total flavonoid contents in extract were determined by the method of Woisky *et al*[22]. To 0.5 mL of the extract solution, 0.5 mL of 20 mg/mL AlCl₃ ethanol solution was added. After 1 h at room temperature, the absorbance was measured at 420 nm. Total flavonoid contents were calculated as quercetin (mg/g) from a calibration curve.

2.4. Antimicrobial activity test

Antimicrobial activity of propolis samples were investigated by the disc diffusion method[23]. The antimicrobial screening was performed using Mueller–Hinton agar. The bacteria tested were graciously provided by Pasteur Institute of Algiers (Algeria) and included two Gram-positive bacteria strains [*B. cereus* (IPA) and *S. aureus* (ATCC 25923R)] and two Gram-negative bacteria strains [*E. coli* (ATCC25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 27893R)]. Extracts of propolis were weighed under aseptic conditions in sterile volumetric flasks, and dissolved with 70% sterile ethanol to obtain 0.1 mg/mL extract concentration. Agar disc diffusion method was employed for the determination of antimicrobial activities of EEP. Suspensions of tested microorganisms (0.5 McFarland scale) were spread into solid media plates. Filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated with 20 µL of each EEP sample and with ethanol (control) and the inoculated plates were incubated at 37 °C for 24 h. Diameters of the inhibition zones were measured in millimeters. All the tests were performed in triplicate.

2.5. Statistical analysis

The results are reported as mean±SD. One-way ANOVA and Tukey *post hoc* multiple comparison tests were used

to analyze data. P value less than 0.05 was considered as significant difference.

3. Results

3.1. Total polyphenols and flavonoid contents

Total polyphenol and flavonoid contents of propolis extract samples from the four regions of Algeria were investigated (Table 1). Results showed that there was a significant difference ($P < 0.0001$) among total polyphenol contents between the regions.

Table 1

Collection regions, total polyphenol and flavonoid contents of propolis extract.

Propolis	Collection site	Total polyphenol* (mg GAE/g of sample)	Flavonoid** (mg/g of extract)
SP	Sersaïdi	257.40±3.01 ^a	91.44±4.42 ^a
CP	Chetaïbi	233.73±7.03 ^{ab}	79.06±1.91 ^b
BP	Berrehal	215.40±11.09 ^b	65.12±2.42 ^c
EP	El-Bouni	100.90±2.72 ^c	58.99±2.49 ^c

*: Total polyphenol contents were determined by the Folin–Ciocalteu method. Value is mean±SD. **: Flavonoid contents were determined by AlCl₃ coloration. Means with different superscript letters within a column are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA followed by a *post-hoc* Tukey test).

Flavonoid contents were also evaluated in each extract and results showed that there was significant difference among flavonoid contents between the four regions ($P < 0.0001$).

The total polyphenol content of the propolis studied ranged between 100.90–257.40 mg GAE/g EEP. Propolis from Algeria contained flavonoids at levels of 58.99–91.44 mg/g of EEP, with the higher values observed in propolis from SP and CP and lower in EEP from BP and EP.

3.2. Antibacterial activity assay

The disc diffusion method was used to determine the inhibition zones of the different ethanolic extracts from the four regions. The two Gram-positive and two Gram-negative bacteria have been used. According to the results in Figure 1, different EEP samples showed antibacterial activity against all bacteria and the antimicrobial activity varies according to the origin of the propolis. Also, the EEP had a highly significant ($P < 0.0001$) antimicrobial activity for Gram-positive bacteria comparatively to Gram-negative bacteria.

Since EEP was used in this study, the possible inhibition by ethanol was also tested using 70% ethanol as a control. No growth inhibition against the tested microorganisms was observed suggesting the antimicrobial effect of propolis.

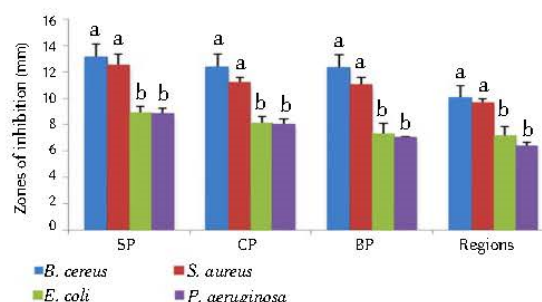


Figure 1. Diameters of the zones of inhibition (mm) of the growth bacteria tested according to the ethanolic extract of propolis.

In our results, the antimicrobial activity of the ethanolic extracts from the four regions varies according to the origin of the propolis. The largest inhibitory zones of the growth bacteria were noticed for the propolis of SP and CP which showed also the highest values of polyphenol and flavonoid contents.

4. Discussion

In the present study, the total polyphenol and flavonoid contents were evaluated and according to our results, it is evident that the quantitative differences in those compounds in propolis samples harvested in different regions. Some authors studying propolis from different areas also found quantitative differences in total phenols and flavonoid contents. Data in the literature showed a larger variability in polyphenol contents from different areas of China: 43–302 mg/g[24], India: 159–269 mg/g[25], Iran: 31–187 mg/g[26], Portugal: 151–329 mg/g[27] and Algeria: 55–279 mg/g[19]. In Greek regions, polyphenol contents of propolis were 80–338 mg/g[6]. A larger variability in flavonoid contents was shown in propolis collected in different regions of Iran ranged from 12 to 78 mg/g[26]. According to Ahn *et al.*[28], the flavonoid content of propolis from China is between 8 and 188 mg/g of propolis. Propolis from Greece and Cyprus contained flavonoids at levels from 8.8 to 182.6 mg/g and flavonoid content of propolis from Algeria ranged between 10–69 mg/g[6,19].

In this study, the antimicrobial activity of propolis was investigated. The EEP samples showed antibacterial activity against all bacteria tested with high antimicrobial activity against Gram positive bacteria. The antimicrobial

activity of the EEP from the four regions varies according to the origin of the propolis. The extract of SP and CP had strong antimicrobial activity. Strong antimicrobial activity of SP and CP seemed to relate with high values of total polyphenol and flavonoid contents. The presence of polyphenols has been reported to be associated with valuable pharmacological and biological properties of propolis[29]. Propolis from different regions varied in its ability to inhibit the growth of bacteria suggesting that botanical origin plays an important role in influencing a propolis's antimicrobial activity[9,28,30,31]. It has been indicated that phenolic acids and flavonoid components of propolis uncouple the energy transducing cytoplasmic membrane which leads to the inhibition of bacterial viability. The antimicrobial action of propolis may be attributed to these effects on the bioenergetic status of the membrane[32].

Natural products are promising natural antimicrobial agents with potential applications in pharmaceutical or food industries for controlling the pathogenic bacteria. The strong antibacterial effects of Algerian propolis against foodborne pathogens such as *B. cereus* and *S. aureus* suggests potential as a food preservative against pathogenic food-related microorganisms. Other research will be pursued to determine the plant origin of Algerian propolis and its qualitative chemical composition.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Comments

Background

Bacteria are considered as one of the major causes of serious and dangerous infections in human and animal. Food-borne diseases caused by the consumption of contaminated foods have a wide economic and public health impact worldwide.

Research frontiers

Numerous reports describe the antibacterial properties of propolis. Information regarding the antimicrobial activity of Algerian propolis are scarce.

Related reports

The methodology in this work was based on standard methods. Extraction of propolis was made according to Miorin *et al.* (2003). Total polyphenol contents were

determined colorimetrically (Singleton *et al.* 1999), while total flavonoids were quantified following the procedure of Woisky and Salatino (1998). Finally the antimicrobial bioassays were conducted according to Bauer *et al.* (1966). They are related reports dealing with propolis from different countries such as El-Bassiony *et al.* (2012), Kosalec *et al.* (2004), Seidel *et al.* (2008), Dias *et al.* (2012).

Innovations & breakthroughs

The antimicrobial activity of propolis has been effectively established against an extensive spectrum of microorganisms. It differs depending on the type of propolis. To date, only limited studies on antimicrobial activity of Algerian propolis has been reported.

Applications

The strong antibacterial effects of Algerian propolis against foodborne pathogens such as *B. cereus* and *S. aureus* suggest potential as a food preservative against pathogenic food-related microorganisms.

Peer review

Propolis is a natural product and constitutes an alternative to chemical compounds in medicine and foods. The study aimed evaluation of the antimicrobial of propolis collected from different regions of Algeria. Bioassays were conducted according to conventional procedures. Results evidenced a strong antibacterial activity correlated with chemical composition of propolis and suggest its potential use in foods. The paper is good, and adequately describes its purpose. Results and discussion are well written .

References

- [1] El-Bassiony TA, Saad NM, El-Zamkan MA. Study on the antimicrobial activity of ethanol extract of propolis against enterotoxigenic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lab prepared ice-cream. *Vet World* 2012; **5**(3): 155–159.
- [2] Erkmen O, Ozcan MM. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food* 2008; **11**: 587–592.
- [3] Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez Hernández I, Rastrelli L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem* 2010; **58**: 2209–2213.
- [4] Seidel V, Peyfoon E, Watson DC, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother Res* 2008; **22**: 1256–1263.
- [5] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis and royal

- jelly. *J Food Sci* 2008; **73**(9): R117–R124.
- [6] Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinis I, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 2009; **116**: 452–461.
- [7] Petrova A, Popova M, Kuzmanova C, Tsvetkova I, Naydenski H, Muli E, et al. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* 2010; **81**(6): 509–514.
- [8] Tylkowski B, Trusheva B, Bankova V, Giamberini M, Peev G, Nikolova A. Corrigendum to “Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. *J Membr Sci* 2010; **356**: 154.
- [9] Kang HJ, Ko KW, Lee OH, Lee BY. [Antioxidant, antimicrobial, and cancer cell proliferative inhibition activities of propolis]. *Food Sci Biotechnol* 2009; **18**: 1042–1045. Korea.
- [10] Dota KFD, Consolaro MEL, Svidzinski TIE, Bruschi ML. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid Based Complementary Altern Med* 2011; doi: 10.1093/ecam/nea029.
- [11] Farooqui T, Farooqui AA. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Curr Nutr Food Sci* 2010; **6**: 186–199.
- [12] Bonheví JS, Cutiérréz AL. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J Microbiol Biotechnol* 2012; **28**: 1351–1358.
- [13] Dias LG, Pereira AP, Estevinho LM. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food Chem Toxicol* 2012; **50**: 4246–4253.
- [14] de Castro Ishida VF, Negri C, Salatino A, Bandeira MFC. A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chem* 2011; **125**(3): 966–972.
- [15] Lahouel M, Boutabet K, Kebba W, Alyane M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African J Pharm Pharmacol* 2010; **4**: 712–720.
- [16] Rebiai A, Lanez T, Belfar ML. *In vitro* evaluation of antioxidant capacity of Algerian propolis by spectrometrical and electrochemical assays. *Int J Pharmacol* 2011; **7**: 113–118.
- [17] Segueni N, Magid AA, Decarme M, Rhouati S, Lahouel M, Antonicelli F, et al. Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Med* 2011; **77**: 999–1004.
- [18] Benhanifia M, Mohamed WM, Bellik Y, Benbarek H. Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western Algeria. *Int J Food Sci Technol* 2013; **48**: 2521–2527.
- [19] Boufadi YM, Soubhye J, Riazzi A, Rousseau A, Vanhaeverbeek M, Nève J, et al. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 2327–2345.
- [20] Miorin PL, Levy Junior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 2003; **95**: 913–920.
- [21] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; **299**: 152–178.
- [22] Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 1998; **37**: 99–105.
- [23] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; **45**: 493–496.
- [24] Kumazawa S, Ohta T, Kaji K, Nakayama T. Antioxidant and antiangiogenic activities of propolis. *Yakugaku Zasshi* 2007; **127**: 16–18.
- [25] Laskar RA, Sk I, Roy N, Begum NA. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem* 2010; **122**: 233–237.
- [26] Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamed M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN. Antioxydant power of Iranian propolis extract. *Food Chem* 2007; **103**: 729–733.
- [27] Moreira L, Duis LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol* 2008; **46**: 3482–3485.
- [28] Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem* 2004; **52**: 7286–7292.
- [29] Gülçin I, Bursal E, Sehitoglu MH, Bilsel M, Gören AC. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* 2010; **48**: 2227–2238.
- [30] Jorge R, Furtado NAJC, Sousa JPB, da Silva Filho AA, Gregório Junior LE, Martins CHG, et al. Brazilian propolis: Seasonal variation of the prenylated *p*-coumaric acids and antimicrobial activity. *Pharm Biol* 2008; **46**: 889–893.
- [31] Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Caribay-Escobar A, Calvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem* 2012; **131**: 645–651.
- [32] Kim YH, Chung HJ. The effect of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. *N Biotechnol* 2011; **28**: 713–718.

**Antimicrobial Effects of Algerian
Honey on Pathogenic Food-Related
Bacteria**

Antimicrobial Effects of Algerian Honey on Pathogenic Food-Related Bacteria

¹Neila Nedji and ^{1,2}Wahida Loucif-Ayad

¹Department de Biology, Laboratory of Applied Animal Biology, Faculty of Sciences,

²Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University, 23000-Annaba, Algeria

Abstract: The purpose of the study was to characterize the physicochemical properties and the antibacterial activity of honey samples collected from different sites of Northeast Algeria. The antibacterial activity of honey against *Bacillus cereus* (IPA), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923R), *Escherichia coli* (ATCC25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27893R) was evaluated by the disc diffusion method and determined as an equivalent of the inhibition zones diameters after incubation of the cultures at 37°C for 24 h. The moisture content, pH, Electrical conductivity and Ash were measured and the investigation of the polyphenol and flavonoid contents were done spectrophotometrically in each honey sample. Results showed that Algerian honey inhibited the growth of all examined microorganisms with the highest antimicrobial activity against the Gram positive bacteria. Physicochemical parameters were similar between the honey samples collected from different sites and polyphenol and flavonoid contents were variable, depending on the honey samples. The strong antimicrobial activity of Algerian honey may be due to high total phenolic and flavonoid contents and this study suggests potential use of honey in foods.

Keywords: Algerian honey, antimicrobial activity, polyphenol and flavonoid contents

INTRODUCTION

Microbial infections are the cause of a large burden of diseases and bacteria are listed in the first position among the common microorganisms responsible for opportunistic diseases. Therapy of bacterial infections is a frequent problem due to the emergence of bacterial strains resistant to numerous antibiotics (Ahmed *et al.*, 2013). Food-borne diseases caused by the consumption of contaminated foods have a wide economic and public health impact worldwide. Many pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) have been reported as the causal agents of food-borne diseases (Erkmen, 2008; El-Bassiony *et al.*, 2012). A variety of different chemical and synthetic compounds have been used as antimicrobial agents to inhibit bacteria in foods. There is great interest in controlling the growth or eliminating foodborne pathogens using natural antimicrobials (Taormina *et al.*, 2001).

Honey, a natural product formed from nectar by honeybees, has attracted much attention in recent years as a useful ingredient applied in medicine (Mandal *et al.*, 2010; DebMandal and Mandal, 2011; Alvarez-Suarez *et al.*, 2013). Honey possesses biological properties including antioxidant (Erejuwa *et al.*, 2010), fungicidal (Koc *et al.*, 2011), anti-inflammatory (Kassim *et al.*, 2010), reproductive (Mohamed *et al.*, 2012; Zaid *et al.*, 2010), hypoglycemic (Erejuwa *et al.*, 2010) and antibacterial effects (Tan *et al.*, 2009). Numerous reports describe the antibacterial properties

of honey but there has been only limited research on antimicrobial activity of Algerian honey (Ouchemoukh *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2011, 2012).

Antimicrobial activity of honey varies greatly with processing and origin, depending on the natural vegetative flowers blooming in different seasons and in different places (Tan *et al.*, 2009; Manyi-Loh *et al.*, 2011). The healing effect of honey could be due to various physical and chemical properties (Snow and Manley-Harris, 2004). The floral source of honey plays an important role on its biological properties (Bogdanov, 2002; Molan, 2002). An extensive review of the antimicrobial activity of honey showed it to be derived from high sugar content low water content, acidity, the generation of hydrogen peroxide on dilution (Kacaniova *et al.*, 2011; Hegazi and Abd Allah, 2012; Mistry and Shah, 2013) and phytochemical components (Snow and Manley-Harris, 2004; Kwakman and Zaat, 2012), aromatic acids and phenolic compounds (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

The present investigation was undertaken to evaluate the antibacterial potential of Algerian honey against a range of food-borne pathogenic bacteria and its physico-chemical properties.

MATERIALS AND METHODS

Honey samples and preparation: Honey samples were gathered from honeybee colonies of the local strain *Apis mellifera intermissa* in four sites of Annaba, in Northeast Algeria: Seraidi (36°54'39.92"N,

7°37'36.24"E), Chetaibi (36°59'41.47"N, 7°19'30.29"E), Berrehal (36°50'16.89"N, 7°26'56.51"E) and El-Bouni (36°49'35.92"N, 7°39'51.45"E) and designed as SH, CH, BH and EH respectively. The four sampling sites belong to the same climatic level (sub-humide). Seraidi and Chetaibi are located far from road traffic and presented a rich floral diversity as compared to Berrehal and El-Bouni. All the samples were collected in september 2013 from the nests using sterile syringes, stored in dark glass bottles at room temperature. Initially, the honeys were subjected to sterilization by γ -irradiation at a dose of 25 kGy (Molan and Allen, 1996).

Physicochemical analysis: The determination of moisture (AOAC, 1990) was ascertained by refractometry. All measurements were performed at 20°C, after waiting for 6 min for equilibrium and obtaining the corresponding % moisture from the refractive index of the honey sample by consulting a standard table for the purpose (Zerrouk *et al.*, 2011).

The pH value was determined in a solution containing 10 g of honey in 75 mL of distilled water. Determination of pH was done with pH-meter mode (AOAC, 1990).

Honey Electrical conductivity was determined by conductimetric assay from a solution containing 10 g of honey in 75 mL of distilled water (Sancho *et al.*, 1992).

Ash content was indirectly determined using the measured Electrical conductivity and applying the following equation:

$$X1 = (X2 - 0.143) / 1.743$$

where,

X1 = Ash value

X2 = Electrical conductivity in mS/cm at 20°C (Piazza *et al.*, 1991)

All physicochemical tests were performed in triplicate.

Polyphenols of honey: Total *polyphenol* contents of honey were determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton *et al.*, 1999; Vit *et al.*, 2009). Honey sample (0.1 mL) was mixed with 0.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent and 0.5 mL of 7.5% (w/v) Na₂CO₃ and the reaction was kept in the dark for 1h, after which the absorbance was read at 725 nm. The total polyphenol content was calculated based on a standard curve prepared using gallic acid and expressed as milligrams of gallic acid Equivalent (GAE) per 100 g of sample.

Flavonoids of EEP: Total flavonoid contents in honey were determined by the method of Woisky and Salatino (1998) with minor modifications (Vit *et al.*, 2009). To 0.1 mL of the honey sample solution (10% w/v), 0.5 mL of 20 mg AlCl₃/mL ethanol 96% (v/v) solution was added. After 1h at room temperature, the absorbance

was measured at 420 nm. Total flavonoids are calculated as mg quercetin equivalents QE/100 g honey from a calibration curve.

Antimicrobial activity test: Antimicrobial activity of honey samples were investigated by the disc diffusion method (Bauer *et al.*, 1966). The antimicrobial screening was performed using Mueller-Hinton agar. The bacteria tested were graciously provided by Pasteur Institute of Algiers (Algeria) and included two Gram-positive bacteria [*Bacillus cereus* (IPA): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923R)] and two Gram-negative bacteria [*Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27893R)] strains. Agar disc diffusion method was employed for the determination of antimicrobial activities of Algerian honey. Suspensions of tested microorganisms (0.5 Mac Farland scale) were spread into solid media plates. Filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated with 20 μ L of each honey sample and with distilled water (control) and the inoculated plates were incubated at 37°C for 24 h. Diameters of the inhibition zones were measured in millimeters. All the tests were performed in triplicate.

Statistical analysis: The results are reported as mean $\pm$ standard deviation (m $\pm$ SD). One-way ANOVA and Tukey post hoc multiple comparison tests were used to analyze data. P value less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Physicochemical parameters: The results of the analysis of quality parameters, such as moisture, pH, Electrical conductivity and Ash content are summarized in Table 1. There were no significant differences ($p > 0.05$) in all physicochemical parameters between honey samples of different sites. Moisture is a parameter related to the maturity degree of honey and temperature. In the present study, moisture values are between 17.88 and 18.38% and all the Algerian honeys analyzed were found to be acidic in character. Their pH values ranged from 3.77 to 4.6 (Table 1). The Electrical conductivity (mS/cm) in honey samples, varied in the range of 0.29 to 0.41 and the Ash content is generally small and its values were ranged from 0.08 to 0.15%.

Total polyphenol and flavonoid contents: Total polyphenol and flavonoid contents of honey samples from the four sites of Algeria were investigated (Table 2). Results showed that there was a significant difference between the sites for total polyphenol contents ($F = 16.48$, $df = 3$, $p < 0.001$) and also for flavonoid contents ($F = 15.42$, $df = 3$, $p < 0.001$).

The total polyphenol contents of honey studied were ranged between 92.14 to 189.2 mg GAE/100 g of

Table 1: Collection sites and physicochemical parameters of honey samples; Data are expressed as means $\pm$ SD

Honey	Collection site	Moisture content (%)	pH	Electrical conductivity(mS/cm)	Ash (%)
SH	Seraidi	17.88 $\pm$ 0.22 ^a	3.77 $\pm$ 0.05 ^a	0.36 $\pm$ 0.06 ^a	0.12 $\pm$ 0.03 ^a
CH	Chetaibi	17.94 $\pm$ 0.63 ^a	3.83 $\pm$ 0.05 ^a	0.29 $\pm$ 0.05 ^a	0.08 $\pm$ 0.03 ^a
BH	Berrehal	18.24 $\pm$ 0.60 ^a	3.89 $\pm$ 0.18 ^a	0.38 $\pm$ 0.11 ^a	0.14 $\pm$ 0.06 ^a
EH	El-Bouni	18.38 $\pm$ 0.51 ^a	4.6 $\pm$ 0.08 ^a	0.41 $\pm$ 0.02 ^a	0.15 $\pm$ 0.01 ^a

Means with the same superscript letters within a column are not significantly different ($p > 0.05$)

Table 2: Total polyphenol and flavonoid contents in honey samples

Honey	Total polyphenol* (mg GAE/100 g of honey)	Flavonoid** (mg EQ /100 g of honey)
SH	189.2 $\pm$ 16.01 ^a	95.94 $\pm$ 5.97 ^a
CH	131.3 $\pm$ 13.64 ^b	69.99 $\pm$ 7.36 ^b
BH	99.03 $\pm$ 3.97 ^{b,c}	64.47 $\pm$ 1.39 ^{b,c}
EH	92.14 $\pm$ 5.23 ^c	44.56 $\pm$ 3.88 ^c

*: Total polyphenol contents were determined by the Folin-Ciocalteu method; Value is mean $\pm$ standard deviation; **: Flavonoid contents were determined by AlCl₃ coloration; Means with different superscript letters within a column are significantly different at $p < 0.05$ (ANOVA followed by a post-hoc Tukey test)

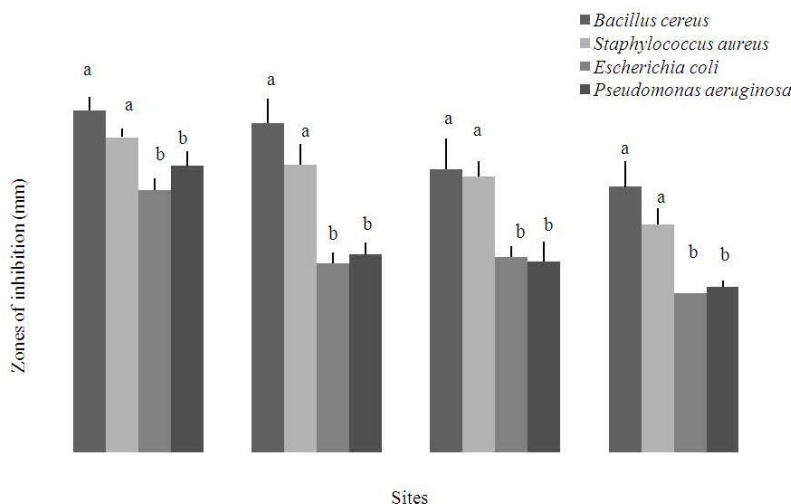


Fig. 1: Diameters of the zones of inhibition (mm) of the growth bacteria tested according to the honey samples

honey. Honeys also contained flavonoids at levels of 44.56-95.94 mgQE/100 g of honey, with the higher values observed in honey samples from Seraidi and Chetaibi sites.

Antibacterial activity assay: The disc diffusion method was used to determine the inhibition zones of the different honey from the four sites. The two Gram positive and two Gram negative bacteria have been used. According to the results in Fig. 1, different honey samples showed antibacterial activity against all bacteria with the highest antibacterial activity against the Gram positive bacteria.

In our results, the antimicrobial activity of honey from the four sites varies according to the origin of the honey. The largest inhibitory zones of the growth bacteria were noticed for the honey of Seraidi and Chetaibi sites which showed also the highest values of polyphenol and flavonoid contents.

DISCUSSION

In the present study, the analysis of some parameters of Algerian honey, such as moisture, pH, Electrical conductivity and Ash content was evaluated. Moisture values were within the values found in Moroccan honeys by Chakir *et al.* (2011) (14.64-18.59%) and Terrab *et al.* (2003) (14.5-23.6%). The moisture content of honey depends on various factors such as harvesting season, degree of maturity reached in the hive and climatic factors (Finola *et al.*, 2007). Also, the moisture content of honey is a highly important factor contributing to its stability against fermentation and granulation during storage (Al *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2010).

In general, honey is acidic in nature, irrespective of its variable geographical origin. The pH values of Indian, Morocco, Argentinean honeys and Saudi honeys, have been found to vary between 3.7 to 4.4, 3.91 to 4.93, 3.25 to 3.32 and 3.48 to 6.06, respectively

(Azeredo *et al.*, 2003; Ouchemoukh *et al.*, 2007). This parameter is of great importance, during extraction and storage of honey, as it influences the texture, stability and shelf life of honey (Terrab *et al.*, 2004). The values obtained in this study were similar to those previously reported for other honey samples from India, Brazil, Spain and Turkey, which were reported to have pHs between 3.49 and 4.70 (Azeredo *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2010). The pH values of Algerian honey samples previously reported were ranged from 3.49 to 4.43 (Ouchemoukh *et al.*, 2007), 3.29 to 4.37 (Cheffrou *et al.*, 2009) and 3.70 to 4.00 (Khalil *et al.*, 2012).

A linear relationship is known to exist between the electrical conductivity and the Ash content. Similarly, a correlation has been found between the electrical conductivity and Ash content for some Algerian honeys (Ouchemoukh *et al.*, 2007; Khalil *et al.*, 2012). The electrical conductivity shows great variability according to the floral origin and is important for differentiating honeys of different floral origin (Terrab *et al.*, 2004). Ash content is a parameter that has been associated with botanical and geographical origins of honey samples. The Ash content in honey is generally small and depends on nectar composition of predominant plants in their formation (Adams *et al.*, 2008). Our results are in agreement with those of some authors (Al-Khalifa and Al-Arif, 1999; Sudhanshu *et al.*, 2010).

Polyphenols are an important group of compounds which influence the appearance and the functional properties of honey (Khalil *et al.*, 2011; Cimpoiu *et al.*, 2012).

The total polyphenolic and flavonoid content of honey samples has been determined in different countries. Dong *et al.* (2013) has reported that total phenols in Chinese honey were 9.41 to 102.1 mg GAE/100 g and in Romanian honey samples, values were 23.0-125.0 mg GAE/100 g (Al *et al.*, 2009; Bobis *et al.*, 2011). Total phenols of Burkina Faso honey were 32.59-114.75 mg GAE/100 g (Meda *et al.*, 2005) while in Paraguay, it varied between 125.17 and 176.50 mg GAE/100 g honey (Vit *et al.*, 2009). For Indian and Croatian honeys, the phenolic content ranged from 48 to 99 and 31.72 to 80.11 mg GAE/100 g, respectively (Saxena *et al.*, 2010; Krpan *et al.*, 2009). Total phenols of Algeria were 63.93 - 95.36 mg GAE /100 g (Ahmed *et al.*, 2013).

The concentration and type of polyphenolic substances depend on the floral origin of honey and are major factors responsible for biological activities (Bobis *et al.*, 2010; Mărgăritas *et al.*, 2010), including antimicrobial activities (Al-Mamary *et al.*, 2002). Also, flavonoid contents in Romanian honey samples were 38.96-65, 98 mg QE/100 g of honey (Bobis *et al.*, 2011). In samples from Venezuela, flavonoid content were ranged from 2.6 to 31.0 mg QE/100 g of honey (Rodríguez-Malaver *et al.*, 2009) and Socha *et al.*

(2009) has reported that total flavonoid content ranged from 6.9 to 28.5 mg QE/100 g. Total flavonoid contents varied from 41.88 to 211.68 mgQE/kg of Italian honeys (Pichichero *et al.*, 2009) and flavonoids varied between 2.52-27.21 mgQE/100 g for honey samples of Nigeria. Flavonoid contents were ranged between 27.07-71.78 mg/kg of honey in sample from Algeria (Khalil *et al.*, 2012).

In this study, the antimicrobial activity of honey was investigated and showed antibacterial activity against all bacteria tested with high antimicrobial activity against Gram+ bacteria. The antimicrobial activity of the honey from the four sites varies according to the origin of the honey. The honey samples of Seraidi and Chetaibi had strong antimicrobial activity as compared to those from Berrehal and El-Bouni. This strong antimicrobial activity is related with high values of total polyphenol and flavonoid contents in SH and CH. The rich floral diversity of the two sites (Seraidi and Chetaibi) seems to play an important role in polyphenol and flavonoid contents, influencing the honey's antimicrobial activity. In fact, honey from different regions varied in its ability to inhibit the growth of bacteria suggesting that botanical origin plays an important role in influencing a honey's antimicrobial activity (Taormina *et al.*, 2001; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Silici *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). The total content of phenolic compounds is dependent on the botanical source of honey and its collection region (Socha *et al.*, 2009).

Natural products are promising natural antimicrobial agents with potential applications in pharmaceutical or food industries for controlling the pathogenic bacteria. The strong antibacterial effects of Algerian honey against foodborne pathogens such as *B. cereus* and *S. aureus* suggests potential use as a food preservative against pathogenic food-related microorganisms. Other research will be pursued to determine the plant origin of Algerian honey and its qualitative chemical composition.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financially supported by the Algerian Fund for Scientific Research and by the Ministry of High Education and Scientific Research of Algeria, CNEPRU project to Dr. W. Loucif-Ayad. [grant No.F011 2011/00097].

REFERENCES

- Adams, C.J., C.H. Boulton, B.J. Deadman, J.M. Farr and M.N.C. Grainger, M. Mainley-Harris and M.J. Snow, 2008. Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Carbohydr. Res., 343: 651-659.

- Ahmed, M., S. Aissat, N. Djebli, A. Boulkaboul, M. Abdelmalek, B. Khiati, 2011. The influence of starch of ginger on the antibacterial activity of honey of different types from Algeria against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Int. J. Microbiol. Res., 2(3): 258-262.
- Ahmed, M., N. Djebli, S. Aissat, A.M. Meslem and S. Bacha, 2012. The influence of botanical origin and physico-chemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. J. Plant Pathol. Microb., 3: 5.
- Ahmed, M., N. Djebli, S. Aissat, K. Zerrouki and A. Bourabeh, 2013. *In vitro* synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. J. Plant Pathol. Microb., 4: 152.
- Al, M.L., D. Daniel, A. Moise, O. Bobis, L. Laslo and S. Bogdanov, 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. Food Chem., 112: 863-867.
- Al-Khalifa, A.S. and I.A. Al-Arif, 1999. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. Food Chem., 67: 21-25.
- Al-Mamarya, M., A. Al-Meerib and M. Al-Haborib, 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutr. Res., 22: 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J.M., S. Tulipani, D. Díaz, Y. Estevez, S. Romandini, F. Giampieri, E. Damiani, P. Astolfi, S. Bompadre and M. Battino, 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food Chem. Toxicol., 48(8-9): 2490-2499.
- Alvarez-Suarez, J.M., F. Giampieri and M. Battino, 2013. Honey as a source of dietary antioxidants: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. Curr. Med. Chem., 20(5): 621-638.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edn., Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington.
- Azeredo, L.D.C., M. Azeredo, S.R. De Souza and V.M.L. Dutra, 2003. Protein content and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. Food Chem., 80: 249-254.
- Bauer, A.W., M.D.K. Kirby, J.C. Sherris and M. Truck, 1966. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. Am. J. Clin. Pathol., 45: 493-496.
- Bobis, O., L.A. Mărghitas, D. Dezmirean, V. Bonta and C.M. Mihai, 2010. Beehive products: Source of nutrients and natural biologically active compounds. J. Agroalim. Proc. Technol., 16(2): 104-109.
- Bobis, O., L.A. Mărghitas, D. Dezmirean, F. Chirilă and R.F.A. Moritz, 2011. Preliminary studies regarding antioxidant and antimicrobial capacity for different types of Romanian honeys. Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol., 68(1-2): 91-97.
- Bogdanov, S., 2002. Harmonized Methods of the International Honey Commission. International Honey Commission. Retrieved from: <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>.
- Chakir, A., R. Abderrahmane, L.M. Gian and F. Paola, 2011. Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. Arab. J. Chem., DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.10.013.
- Chefrour, C., R. Draiaia, A. Tahar, Y. Ait Kaki, S. Bennadja and M. Battesti, 2009. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev., 9: 1276-1293.
- Cimpoi, C., A. Hosu, V. Miclaus and A. Puscas, 2012. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. Spectrochim. Acta A, 100: 149-154.
- DebMandal, M. and S. Mandal, 2011. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 1(2): 154-160.
- Dong, R., Y.N. Zheng and B.J. Xu, 2013. Phenolic profiles and antioxidant capacities of Chinese unifloral honeys from different botanical and geographical sources. Food Bioprocess. Tech., 6(3): 762-770.
- El-Bassiony, T.A., N.M. Saad and M.A. El-Zamkan, 2012. Study on the antimicrobial activity of ethanol extract of propolis against enterotoxigenic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in lab prepared ice-cream. Vet. World, 5(3): 155-159.
- Erejuwa, O.O., S. Gurtu, S.A. Sulaiman, M.S. Ab Wahab, K.N. Sirajudeen and M.S. Salleh, 2010. Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 80: 74-82.
- Erkmen, O., 2008. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. J. Med. Food, 7: 587-592.
- Finola, M.S., M.C. Lasagno and J.M. Marioli, 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food Chem., 100: 1649-1653.
- Hegazi, A.G. and F.M. Abd Allah, 2012. Antimicrobial activity of different Saudi Arabia honeys. Global Vet., 9(1): 53-59.
- Kacaniova, M., K. Fatrcova-Sramkova, J. Nozkova, M. Melich, M. Kadasi-Horakova, V. Knazovicka, S. Felsociova, S. Kunova and M. Mariassyova, 2011. Antiradical activity of natural honeys and antifungal effect against *Penicillium genera*. J. Environ. Sci. Heal. B., 46(1): 92-96.

- Kassim, M., M. Achoui, M.R. Mustafa, M.A. Mohd and K.M. Yusoff, 2010. Ellagic acid, phenolic acids and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate *in vitro* anti-inflammatory activity. *Nutr. Res.*, 30: 650-659.
- Khalil, M.I., N. Alam, M. Moniruzzaman, S.A. Sulaiman and S.H. Gan, 2011. Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *J. Food Sci.*, 76: 921-928.
- Khalil, M.I., M. Moniruzzaman, L. Boukraâ, M. Benhanifia, M.A. Islam, M.N. Islam, S.A. Sulaiman and S.H. Gan, 2012. Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17: 11199-11215.
- Koc, A.N., S. Silici, F. Kasap, H.T. Hormet-Oz, H. Mavus-Buldu and B.D. Ercal, 2011. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* *J. Med. Food.*, 14: 128-134.
- Krpan, M., K. Marković, G. Šarić, B. Skoko, M. Hruškar *et al.*, 2009. Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey. *Czech J. Food Sci.*, 27: 245-247.
- Kwakman, P.H. and S.A. Zaat, 2012. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, 64: 48-55.
- Liu, J.R., Y.L. Ye, T.Y. Lin, Y.W. Wang and C.C. Peng, 2013. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chem.*, 139(1-4): 938-943.
- Mandal, S., M. DebMandal, N.K. Pal and K. Saha, 2010. Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 3(12): 961-964.
- Manyi-Loh, C.E., A.M. Clarke and R.N. Ndi, 2011. An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5: 844-852.
- Mărghitas, L.A., D. Dezmirean, C. Pocol, M. Ilea, O. Bobis and I. Gergen, 2010. The development of a biochemical profile of acacia honey by identifying biochemical determinants of its quality. *Not. Bot. Horti. Agrobo.*, 38(2): 9-13.
- Meda, A., C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo and O.G. Nacoulma, 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasho honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.*, 91: 571-577.
- Mistry, R. and G. Shah, 2013. Study of inhibitory effect of honey on various pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.*, 1(4): 279-281.
- Mohamed, M., S.A. Sulaiman, H. Jaafar and K.N. Sirajudeen, 2012. Effect of different doses of Malaysian honey on reproductive parameters in adult male rats. *Andrologia*, 44(1): 182-186.
- Molan, P.C. and K.L. Allen, 1996. The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48(11): 1206-1209.
- Molan, P.C., 2002. Not all honeys are the same for wound healing. *Bull. Eur. Tissue Rep. Soc.*, 9: 5-6.
- Ouchemoukh, S., H. Louaileche and P. Schweizer, 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honey. *Food Control*, 18: 52-58.
- Ouchemoukh, S., P. Schweizer, M. Bachir Bey, H. Djoudad-Kadji and H. Louaileche, 2010. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.*, 121: 561-568.
- Piazza, M.G., M. Accorti and L. Persano Oddo, 1991. Electrical conductivity, Ash, colour and specific rotatory power in Italian unifloral honeys. *Apicoltura*, 7: 51-63.
- Pichichero, E., I.L. Canut and A. Canini, 2009. Characterization of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *J. Sci. Food Agr.*, 89: 609-616.
- Rodríguez-Malaver, A.J., C. Rasmussen, M.G. Gutiérrez, F. Gil, B. Nieves and P. Vit, 2009. Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Nat. Prod. Commun.*, 4(9): 1221-1226.
- Sancho, M.T., S. Muniategui, J.F. Huidobro and J. Simal, 1992. Evaluating soluble and insoluble Ash, alkalinity of soluble and insoluble ash and total alkalinity of Ash in honey using electrical conductivity measurements at 20°C. *Apidologie*, 23: 291-297.
- Saxena, S., S. Gautam and A. Sharma, 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem.*, 118: 391-397.
- Silici, S., O. Sagdic and L. Ekici, 2010. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chem.*, 121: 238-243.
- Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.*, 299: 152-178.
- Snow, M. and M. Manley-Harris, 2004. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand Manuka honey. *Food Chem.*, 84: 145-147.
- Socha, R., L. Juszczak, S. Pietrzyk and T. Fortuna, 2009. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chem.*, 113: 568-574.
- Sudhanshu, S., G. Satyendra and S. Arun, 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food. Chem.*, 118: 391-397.

- Tan, H.T., R.A. Rahman, S.H. Gan, A.S. Halim, S.A. Hassan, S.A. Sulaiman and B. Kirnpal-Kaur, 2009. The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complem. Altern. M.*, 9: 34.
- Taormina, P.J., B.A. Niemira and L.R. Beuchat, 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. J. Food Microbiol.*, 69(3): 217-225.
- Terrab, A., A. Gustavo González, M.J. Díez and F.J. Heredia, 2003. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *Eur. Food Res. Technol.*, 218: 88-95.
- Terrab, A., A.F. Recamales, D. Hernanz and F.J. Heredia, 2004. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chem.*, 88: 537-542.
- Vit, P., M.G. Gutiérrez, A.J. Rodríguez-Malaver, G. Aguilera, C. Fernández-Díaz and A.E. Tricio, 2009. Comparación de mieles producidas por la abeja yateí (*Tetragonisca fiebrigi*) en Argentina y Paraguay. *Acta Bioquím. Clin. L.*, 43: 219-226.
- Woisky, R.G. and A. Salatino, 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.*, 37: 99-105.
- Zaid, S.S., S.A. Sulaiman, K.N. Sirajudeen and N.H. Othman, 2010. The effects of Tualang honey on female reproductive organs, tibia bone and hormonal profile in ovariectomised rats-animal model for menopause. *BMC Complem. Altern. M.*, 10: 82.
- Zerrouk, S.H., B.G. Fallico, E.N. Arena, G.F. Ballistreri and L.A. boughediri, 2011. Quality evaluation of some honey from the central region of Algeria. *Jordan J. Biol. Sci.*, 4(4): 243-248.