

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saida



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude de l'Activité Antibactérienne d'un Extrait de Propolis contre des Germes Isolés du Tissu Mammaire Infecté

Présenté par :

■ Ing. CHEBLI Kadda

Soutenu le : 15 – 06 – 2022

Devant le jury composé de :

Président	Mr. TERRAS Mohamed	Pr	Université de Saida
Examineur	Mr. HALLA Nouredine	MCA	Université de Saida
Encadrant	Mr. BERROUKCHE Abdelkrim	Pr	Université de Saida
Co-encadrant	Mr. BOUDDOU Farouk	Docteur	Université de Saida

Année universitaire 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا
يَعْرَشُونَ * ثُمَّ كُلِّي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ مِن
بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ
يَتَفَكَّرُونَ) (سورة النحل آية 68 - 69)

Remerciements

Tout d'abord, louage à Dieu, Allah, le tout puissant qui m'a donné la force, le courage et la patience pour terminer ce mémoire.

A monsieur le Professeur **Mohamed TERRAS**,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury,

Pour savoir vous rendre disponible et être à l'écoute,

Merci pour votre volonté de mettre toujours à notre disposition un plateau technique riche d'enseignement,

Veillez trouvez ici le témoignage de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A monsieur le Professeur **Abdelkrim BERROUKCHE**,

Doyen de la Faculté des Sciences, Université de Saida Dr Tahar MOULAY,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail,

Pour tout le temps que vous avez su m'accorder,

Pour tout les enseignements et les conseils que vous m'avez transmis,

Pour m'avoir accordé votre confiance et donné l'envie de progresser,

Que ce travail soit le témoignage de tous mes remerciements et de mon plus grand respect.

A monsieur le Docteur **Farouk BOUDDOU**,

Ingénieur de laboratoire,

Pour m'avoir guidé, encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté afin de bien accomplir ce travail,

Pour m'avoir accordé votre confiance ainsi que pour votre disponibilité,

Que ce travail soit le témoignage de toute ma gratitude et de ma profonde reconnaissance.

A monsieur le Docteur **Noureddine HALLA**,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail,

Pour tout les conseils que vous m'avez transmis,

Pour l'intérêt que vous avez porté à ce modeste travail,

Que ce travail soit le témoignage de tous mes remerciements et de ma profonde estime.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, tout puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, ma mère estimée,

A ma brave mère chérie, le plus beau cadeau que le bon Dieu m'a offert,

L'amour, le sacrifice de soi pour ses enfants, l'abnégation et la persévérance quelle que soient les épreuves et les embûches sont autant de qualités qui te caractérisent et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui,

Trouve ici toute mon affection et mon respect pour l'éducation que tu m'as donnée, qu'Allah la garde pour nous.

A l'âme de mon brave cher père,

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, celui qui a quitté notre monde et le son de ses conseils continuent de me guider, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études, depuis ma tendre enfance, tu es mon plus fort repère, un être unique, le meilleur des pères, quand je pense à toi, les pleurs montent avec les souvenirs, merci pour ce que tu as été pour moi, un chemin de sérénité, merci à toi Grand Homme, le bonheur dans ma vie tu as semé.

Merci pour tout mon père le t'aime d'un amour éternel, aujourd'hui je marche sur tes pas de miel, que Dieu vous récompense avec la meilleure récompense.

A mes sœurs et frères 'Fatima, Aicha, Khadidja, Mohamed, Djamel, Bouziane et Mokhtar',

Pour notre complicité, nos disputes et nos rires, votre soutien à été sans faille, amour et gratitude, je vous remercie énormément pour vos encouragements et je vous souhaite à tous plein de bonnes choses dans votre vie.

A mes étoiles,

Meriem, Oussama, Sara, Saadia et Arewa, j'espère vous voir un jour médecins, ingénieurs et cadres d'état pour servir notre cher peuple, je vous aime.

A ma chère femme qui à rempli ma vie de défis, de surmonter les difficultés, qu'Allah vous garde.

A mes sœurs Leila et Samira.

A mon grand frère BOUCETTA Noureddine.

Tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Aux âmes pures des martyrs, aux hommes

A l'Algérie ma chère patrie.

Résumé

La mastite, causée par *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, est une infection courante chez les mères allaitantes. Les antibiotiques (ATBs) constituent le pilier du traitement de la mastite. Cependant, étant donné le potentiel de transfert des antibiotiques de la mère à l'enfant, ainsi que le problème de la résistance bactérienne aux ATBs synthétiques, il est essentiel de développer de nouveaux composés naturels avec des propriétés antibactériennes. Ainsi, l'objectif de ce travail est de déterminer le contenu phytochimique, la capacité antioxydante et l'activité antibactérienne *In vitro* de l'extrait hydroéthanolique d'une propolis algérienne contre les deux souches bactériennes susmentionnées, en comparaison avec quatre ATBs à savoir : Gentamicine (GEN), Céfazoline (CZ), Céfotaxime (CT), et Acide Pipemidique (PI). Les estimations du polyphénol total et des flavonoïdes totaux ont révélé des niveaux de 113,65±2,41 mg AGE/g RS, et 0,072±0,039 mg CE/g RS respectivement. L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé une capacité significative à piéger le radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ($IC_{50}=2,95\pm0,70$ mg/ml). Les tests d'inhibition bactérienne effectués par la méthode de diffusion en puits d'agar ont montré à la concentration de 5000 µg/ml une forte activité antibactérienne avec des zones d'inhibition de 22,50±1,67 mm et 25,50±0,50 mm contre *E. coli* et *S. aureus*, respectivement, par rapport à GEN (31±1,00 mm et 35,50±0,50 mm), CZ (14,50±0,33 mm et 24,50±0,35 mm), CT (10,50±0,33 mm et 11±0,67 mm), et PI (06±0,00 mm et 35±0,50 mm) contre *E. coli* et *S. aureus*, respectivement. Ces résultats montrent que l'efficacité de l'extrait de propolis dépasse celle des deux ATBs appartenant à la famille des céphalosporines (CZ et CT de la 1ère et 2ème génération respectivement) et à la famille des Quinolones (PI de la 1ère génération).

Mots-clés : Antibiotiques ; Antioxydant ; *Escherichia coli* ; Propolis ; *Staphylococcus aureus*.

التهاب الثدي، الناجم عن *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، هو عدوى شائعة عند الأمهات المرضعات. المضادات الحيوية هي الدعامة الأساسية لعلاج التهاب الثدي. ومع ذلك، نظرًا لإمكانية نقل المضادات الحيوية من الأم إلى الطفل، فضلاً عن مشكلة المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية الاصطناعية، فمن الضروري تطوير مركبات طبيعية جديدة ذات خصائص مضادة للبكتيريا. وبالتالي، فإن الهدف من هذا العمل هو تحديد المحتوى الكيميائي النباتي، والقدرة المضادة للأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا في المختبر لمستخلص العكبر الإيثانولي جزائري ضد السلالتين البكتيريتين المذكورتين أعلاه، مقارنة بأربعة مضادات حيوية وهي: الجنتاميسين (GEN) ، سيفازولين (CZ) ، سيفوتاكسيم (CT) ، وحمض بيبميديك (PI). كشفت تقديرات البوليفينول الكلي و الفلافونويد الكلي عن مستويات $113,65 \pm 2,41$ مغ / AGE غ RS و $0,072 \pm 0,039$ مغ / CE غ RS على التوالي. أظهر تقييمًا لنشاط المضاد للأكسدة قدرة كبيرة على كبت جذور IC_{50} (DPPH) 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl $2,95 \pm 0,70$ مغ / مل. أظهرت اختبارات التثبيط البكتيري التي أجريت بواسطة طريقة الانتشار في آبار الأجار، بتركيز 5000 ميكروغرام / مل، نشاطاً قوياً مضاداً للبكتيريا مع مناطق تثبيط $22,5 \pm 1,67$ مم و $25,5 \pm 0,50$ مم ضد *E. coli* ، و *Staphylococcus aureus* على التوالي، مقارنة بـ GEN (مم $31 \pm 1,00$ و $35 \pm 0,50$) (CZ ($14,5 \pm 0,33$ مم و $24,50 \pm 0,35$ مم)، CT ($10,50 \pm 0,33$ مم و $11 \pm 0,67$ مم)، PI ($0,00 \pm 0,06$ مم و $35 \pm 50,0$ مم) ضد بكتريا *E. coli* و *S. aureus* على التوالي. تظهر هذه النتائج أن فعالية مستخلص العكبر تتجاوز فعالية اثنين من المضادات الحيوية ينتميان إلى عائلة السيفالوسبورين (CZ و CT للجيل الأول والثاني على التوالي) وعائلة Quinolone PI من الجيل الأول.

الكلمات المفتاحية: مضادات حيوية؛ مضادات الأكسدة؛ *Escherichia coli*؛ *Staphylococcus aureus*؛ دنج؛

Abstract

Mastitis, caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, is a common infection in nursing mothers. Antibiotics (ATBs) are the mainstay of treatment for mastitis. However, given the potential for transfer of antibiotics from mother to infant, as well as the problem of bacterial resistance to synthetic ATBs, it is critical to develop new natural compounds with antibacterial properties. Thus, the aim of this work is to determine the phytochemical content, antioxidant capacity, and *In vitro* antibacterial activity of the hydroethanol extract of an Algerian propolis against the two above-mentioned bacterial strains, in comparison with four ATBs namely: Gentamicin (GEN), Cefazolin (CZ), Cefotaxime (CT), and Pipemidic acid (PI). Estimates of total polyphenol and total flavonoids revealed levels of $113,65 \pm 2,41$ mg AGE/g DR, and $0,072 \pm 0,039$ mg EC/g DR respectively. Evaluation of antioxidant activity revealed a significant ability to scavenge 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ($IC_{50} = 2,95 \pm 0,70$ mg/ml). Bacterial inhibition tests performed by the agar well diffusion method showed at the concentration of 5000 μ g/ml a strong antibacterial activity with inhibition zones of $22,5 \pm 1,67$ mm and $25,5 \pm 0,50$ mm against *E. coli* and *S. aureus*, respectively, compared to GEN ($31 \pm 1,00$ mm and $35,50 \pm 0,50$ mm), CZ ($14,5 \pm 0,33$ mm and $24,50 \pm 0,35$ mm), CT ($10,50 \pm 0,33$ mm and $11 \pm 0,67$ mm), and PI ($06 \pm 0,00$ mm and $35 \pm 0,50$ mm) against *E. coli* and *S. aureus*, respectively. These results show that the efficacy of propolis extract exceeds that of the two ATBs belonging to the cephalosporin family (CZ and CT of the 1st and 2nd generation respectively) and the Quinolones family (PI of the 1st generation).

Keywords: Antibiotics; Antioxidant; *Escherichia coli*; Propolis; *Staphylococcus aureus*.

Liste des figures

Figure 01 : Les différentes phases de la croissance Et du fonctionnement de la glande mammaire	5
Figure 02 : Structure du sein	7
Figure 03 : Schéma de l'arbre galactophorique	9
Figure 04 : Arrangement des principaux ganglions lymphatiques Axillaires.....	11
Figure 05 : Structure schématisée du microenvironnement organisé autour du bourgeon Epithéliale terminal et des différents types cellulaires qui le compose.....	13
Figure 06 : Glande mammaire en repos (HE(a)x20-(b) x128)	13
Figure 07 : Glande mammaire au cours de la grossesse (HE (a)x20-(b) x128).....	14
Figure 08 : Glande mammaire au cours de la lactation(HE (a)x20-(b) x128).....	14
Figure 09 : Sécrétion apocrine du lait par les cellules épithéliales de l'acinus.....	17
Figure 10 : (A) procédure d'extraction par macération (B) concentration à sec par évaporateur rotatif.....	45
Figure 11 : Dosage de la teneur en polyphénols totaux(TPT) par la méthode FC.....	46
Figure 12 : Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT) par la Méthode de De complexation des flavonoïdes à Aluminium.....	47
Figure 13 : Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode piégeage du radical DPPH.....	48
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	50
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	51
Figure 16 : Résultats de l'activité antioxydante par inhibition du DPPH.....	52
Figure 17 : Résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de propolis.....	53
Figure 18 : Résultats de l'antibiogramme: Gentamicin (GEN), Cefazolin (CZ) Cefotaxime (CT), ET Pipemidic acid (PI).....	53
Figure 19 : L'activité antibactérienne par diffusion en puits d'Agar, et les méthodes de Disques d'antibiotiques.....	54

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont Représentées par différents conifères (pin, sapin, épicéa) t plusieurs espèces De peupliers (Qui semblent la source la plus importante).....	28
Tableau 02 : Composition chimique de la propolis brute.....	30
Tableau 03 : Composition chimique de la propolis pure.....	31
Tableau 04 : Espèces bactériennes testées.....	48
Tableau 05: Résultats du rendement d'extraction, des teneurs des polyphenols totaux ET flavonoïdes totaux.....	50

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGE : Acide gallique

AH : Antioxydants

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomal

ATBs : Antibiotiques

AZT : Inhibiteur de la transcriptase reverse

BFT : Toxine de la *B. fragilis*

BRM : *Biological Response Modifier* → Modificateur de la réponse biologique

CAPE : *Caffeic acid phenethyl ester* → ester phényléthylique de l'acide caféique

CE : Catéchine équivalent

CRC : Cancer colorectal

CT : Cefotaxine

CZ : Céfazoline

°C : Degrés Celsius

DPPH : 2,2-diphenyl 1-1- picrylhydrazyl

DPPH-H : 2,2-diphiphényl 1-1-hydrazine

DPPH-R : Hydrazine analogue substituée

EEP : Extrait éthanolique de propolis

Fap2 : Protéine d'activation des fibroblastes 2

FC : Folin-coicalteu

FISH : Hybridation in situ à fluorescence

FSH : Hormone folliculostimulante

GEN : Gentamicine

GF : Sans germe

HDAC : Inhibiteur des histones désacétylases

HGF : Facteur de croissance hépatique

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

HMP : Human microbiome project

HSV : Virus herpès simplex

IC₅₀ : Concentration inhibitrice

IHC : Immunohistochimie

JNK : C-Jun N-terminal

LDL : Low density lipoprotein

LH : Hormone lutéinisante

LPS : Lipopolysaccharide

MAMP : Motifs moléculaires associés aux microbes

mg : Milligramme

ml : Millilitre

mm : Millimètre

MMP : Métallo protéinases

NAF : Fluide aspiré du mamelon

NAT : Tissu normal adjacent à la tumeur

nm : Nanomètre

NO synthase : Protéine enzymatique qui synthétise l'oxyde nitrique

NSG : Séquençage de nouvelle génération

µg : Microgramme

µl : Microlitre

ORAC : *Oxygen radical absorbance capacity*, capacité d'absorption des radicaux oxygénés

ORL : Orto-rhino-laryngologie

PAK1 : *p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1* → enzyme codée par le gène PAK1

QE : Quercétine équivalent

PDAC : Adénocarcinome canalaire pancréatique

PI : Acide pipemidique

qPCR : PCR quantitative

RE : Récepteurs estrogénique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RP : Récepteurs à la progestérone

RS : Résidu sec

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SCFA : Acides gras à chaîne courte

SPF : Sans pathogènes spécifiques

TFT : Teneur en flavonoïdes totaux

TIGIT : Immunorécepteur des cellules T avec des domaines Ig et ITIM

TPT : Dosage de la teneur en polyphénols totaux

TRAIL : *Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligan*

UFC : Unités formant colonies

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

I. Introduction

I. Introduction	1
-----------------------	---

II. Revue Bibliographique

Chapitre 1 : Bactéries affectant le tissu mammaire

1. Introduction.....	4
2. Développement de la glande mammaire.....	4
3. Anatomie.....	6
3.1. Peau.....	8
3.2. Mamelon.....	8
3.3. Aréole.....	8
3.4. Arbre galactophorique.....	8
3.5. Vaisseaux sanguins.....	9
3.5.1. Veines.....	9
3.5.2. Artères.....	10
3.6. Drainage lymphatiques	10
3.7. Innervation.....	11
4. Histologie.....	12
5. Physiologie.....	15
5.1. Sécrétion lactée.....	16
6. Genres de bactéries affectant le tissu mammaire.....	18
7. Y'a-t-il un lien avec le cancer du sein ?.....	21

Chapitre 2 : Les produits de la ruche ‘ La Propolis’

1. Introduction.....	27
2. Définition de la propolis.....	27
3. Origine et botanique.....	28
4. Propriétés physico-chimiques de la propolis.....	29
4.1. Propriétés physiques.....	29
4.1.1. Consistance.....	29
4.1.2. Couleur.....	29
4.1.3. Saveur.....	29
4.1.4. Odeur.....	29
4.2. Propriétés chimiques.....	29
4.2.1. Solubilité.....	29
4.2.2. Point de fusion.....	30
4.2.3. Densité.....	30
5. Composition analytique.....	30
6. Utilisation dans la ruche.....	33
7. Conservation de la propolis.....	33
8. Propriétés thérapeutiques.....	34
8.1. Effet biologique.....	34

8.1.1. Effet antimicrobien.....	34
8.1.2. Effet antibactérien.....	34
8.1.3. Effet antiviral.....	36
8.1.4. Effet antifongique.....	37
8.1.5. Effet antiparasitaire.....	38
8.1.6. Effet anticancéreux.....	38
8.1.7. Effet anti-inflammatoire.....	40
8.1.8. Effet antioxydant.....	40
8.1.9. Effet antigéoginique.....	41
8.1.10. Effet cicatrisant.....	42
8.1.11. Effet anesthésique local.....	42
8.1.12. Autres effets.....	43

III. Matériels et Méthodes

1. Objectif du travail.....	45
2. Préparation de l'extrait hydro-alcoolique de propolis.....	45
3. Calcul du rendement.....	46
4. Dosage des métabolites secondaires.....	46
4.1. Dosage de la teneur en polyphénols totaux (TPT).....	46
4.2. Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT).....	47
5. Evaluation des activités biologiques.....	47
5.1. L'activité de piégeage des radicaux DPPH.....	47
6. Evaluation des activités antibactériennes.....	48
6.1. Souches bactériennes testées.....	48
6.2. Préparation de l'inoculum.....	48
6.3. Activité antibactérienne.....	49

IV. Résultats et Discussion

1. Résultats.....	50
1.1. Résultats du rendement d'extraction, et du dosage	50
Des métabolites secondaires	
1.2. Résultats de l'activité antioxydante	51
1.3. Résultats de l'activité antibactérienne.....	52
2. Discussion.....	54

V. Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives.....	57
Références bibliographiques.....	58

VI. Production Scientifique

Introduction

I. Introduction

La mastite est une affection courante chez les femmes qui allaitent (**Wilson et al., 2020**). Elle touche entre 3 et 20 % de toutes les femmes qui allaitent. La primiparité, l'utilisation d'un tire-lait, l'utilisation d'une tétérèlle, les antécédents de mastite et les traumatismes du mamelon sont autant de facteurs de risque (**Mitchell et Johnson, 2022**). La mastite se caractérise par une gêne unilatérale, une rougeur et un gonflement du sein, et peut s'accompagner de symptômes pseudo-grippaux (fièvre, frissons et courbatures) (**Wambach, 2003**). À l'examen, on observe fréquemment un érythème, un œdème et une sensibilité unilatérale du sein affecté. En cas d'abcès mammaire, on observe une masse mammaire fluctuante, douloureuse et dure, ainsi qu'un érythème sus-jacent. Afin de distinguer la mastite infectée de la mastite non infectieuse, des tests tels que la numération des leucocytes du lait, la numération des colonies bactériennes et leur culture peuvent être utiles (**Betzold, 2007 ; Barlow, 2011**), *Staphylococcus aureus*, qui comprend le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *S. epidermidis*, les *streptocoques* et les bâtonnets gram-négatifs, sont les bactéries les plus répandues associées à la mastite (**Kateete et al., 2013**), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont également été trouvés pour causer des mastites aiguës (**Underwood et al., 2015**). Le traitement de soutien, l'extraction efficace du lait, le traitement symptomatique (médicaments contre la douleur, utilisation d'anti-inflammatoires), le traitement probiotique et l'antibiothérapie sont autant de principes du traitement de la mammite (**Jahanfar et al., 2009**). Pour les infections *staphylococciques* et *streptococciques*, la pénicilline, la dicloxacilline et les céphalosporines sont recommandées, tandis que pour les organismes à Gram négatif, la céphalexine ou l'amoxicilline peuvent être utilisées (**Yang et al., 2018**). Une étude prospective portant sur un échantillon de 840 femmes aux États-Unis a révélé que 86 % des femmes atteintes de mastite ont reçu des antibiotiques, la majorité d'entre elles ayant reçu de la céphalexine (46 %). Les autres ont reçu de l'amoxicilline, de l'ampicilline et de l'amdinocilline clavulanate (**Foxman et al., 2002**). Il existe un risque élevé de transmission au nouveau-né, par le lait maternel, des antibiotiques utilisés par les mères qui allaitent. Si la majorité des médicaments utilisés par les femmes qui allaitent n'ont pas d'effets indésirables sur leurs nouveau-nés, ils peuvent parfois avoir

des conséquences graves (**Mathew, 2004**). L'exposition aux antibiotiques dans la petite enfance à été liée à un risque accru de troubles non transmissibles, notamment les allergies et l'obésité. Par ailleurs, l'influence des antibiotiques sur la création du résistome intestinal néonatal, ainsi que le rôle du microbiote comme réservoir de gènes de résistance, sont liés à l'augmentation du nombre de pathogènes résistants aux antibiotiques (**Nogacka et al., 2018**).

Cependant, face à cette double contrainte de transfert des antibiotiques de la mère au nourrisson, ainsi qu'au problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques de synthèse, il est essentiel de développer de nouveaux composés naturels aux propriétés antibactériennes. La propolis, parfois connue sous le nom de colle d'abeille, communément appelée "antibiotique naturel", est un composé résineux produit et utilisé par les abeilles pour sceller les parois de la ruche et renforcer les rayons et les bordures d'entrée de la ruche. Elle est utilisée par les humains depuis l'Antiquité pour ses propriétés pharmaceutiques, notamment ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes (**Bruschi et al., 2017**). Elle est relativement non toxique et sûre, et elle est utilisée dans les cosmétiques et les "produits naturels" pour l'auto-traitement en raison de ses caractéristiques antiseptiques, antimycosiques et bactériostatiques (**Desai, 2016**). Les principales catégories de composés présents dans la propolis sont les composés phénoliques et les flavonoïdes. Cependant, la composition de la propolis varie fortement en fonction de la région géographique et de la saison de collecte (**Freires et al., 2018**). Tous les types de propolis possèdent une activité antimicrobienne significative contre divers types de microorganismes, y compris les bactéries, les champignons et les virus (**Mohammadzadeh et al., 2007**). Une activité anti-inflammatoire et antimicrobienne contre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (entre autres) à été démontrée (**Freires et al., 2018**). La propolis gagne en popularité dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques en raison de ses caractéristiques médicales, et elle est maintenant utilisée dans des produits destinés à la consommation humaine, tels que des boissons et des additifs alimentaires (**Pascoal et al., 2014**).

En effet, l'objectif de ce travail est de déterminer le contenu phytochimique, la capacité antioxydante et l'activité antibactérienne *In vitro* de l'extrait hydroéthanolique de propolis contre les mastites induites par *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* chez les femmes allaitantes en comparaison avec quatre antibiotiques (ATBs) à savoir :

Gentamicine (GEN), Céfazoline (CZ), Céfotaxime (CT), et Acide Pipemidique (PI).

Revue Bibliographique

1. Introduction

Le sein est un organe qui contribue à l'intégrité de l'image corporelle de la femme. Il revêt une importance cruciale en représentant à la fois le symbole de la féminité et la maternité. Dans ce cas là, toute blessure ou mutilation de cet organe dans un tel contexte (tumorectomie et surtout mastectomie) entraîne un traumatisme psychique et une autodépréciation nécessitant pour les surmonter des processus d'adaptation parfois défailants.

Une meilleure connaissance de sein constitue la trame du fond d'une meilleure préservation de cet organe, dans ce but, quelques rappels embryologique, anatomique, histologique et physiologique sont présentés dans cette première partie.

2. Développement de la glande mammaire

Le sein ou glande mammaire subit un remaniement continu. Son développement s'étale depuis l'embryogenèse à la ménopause.

Chez l'embryon la glande mammaire dérive des deux crêtes mammaires primitives, épaissement épiblastique visible à la septième semaine, qui régresse rapidement sauf au niveau du thorax. Le bourgeon mammaire restant émet dans la profondeur des cordons cellulaires qui se creusent en canaux au cours du huitième mois. Ces canaux débouchent dans une dépression épithéliale qui se surélève en mamelon après la naissance (**Tuchmann-Dup et al., 1979**).

La régression incomplète des crêtes mammaires peut laisser persister des mamelons surnuméraires (polythélie) ou même des glandes surnuméraires (polymastie) plus ou moins développées (**Tuchmann-Dup et al., 1979 ; Lawrance RA et Lawrance RM., 2005**).

L'absence de la glande mammaire (amastie) est rare (**Tuchmann-Dup et al., 1979**) même si certaines des glandes mammaires surnuméraires produisent un peu de lait, ces vestiges embryonnaires n'étant pas stimulés par la succion du bébé, ils subissent une involution et diminuent en volume graduellement (**Lawrance RA et Lawrance RM., 2005**).

Pendant la période prépubère, le développement du sein suit principalement la croissance du corps (**Lawrance RA et Lawrance RM., 2005**), puis juste avant la puberté, chez les filles, les seins grossissent principalement à cause du développement des tissus adipeux et

conjonctif, une expansion plus rapide des canaux lactifères aura lieu aussi. L'aréole et le mamelon grossissent et foncent.

C'est en phase de gestation, suivi de lactation que la glande mammaire atteint son développement maximal qui se traduit par de très importantes modifications morpho-histologiques : **(Puddu et Tafforeau, 2005) (figure 01)**.

A la ménopause les glandes mammaires subissent une atrophie ainsi qu'une involution progressive de la structure glandulaire ou profit du tissu grasseux. **(Espie et Gorins, 1995)**.

Chez l'homme l'ébauche de la glande mammaire masculine correspond à celle de la femme mais son développement reste modeste. La puberté peut parfois déclencher un processus le plus souvent transitoire, qui mène à un développement plus marqué du sein (gynécomastie). **(Hamladji, 2006)**.

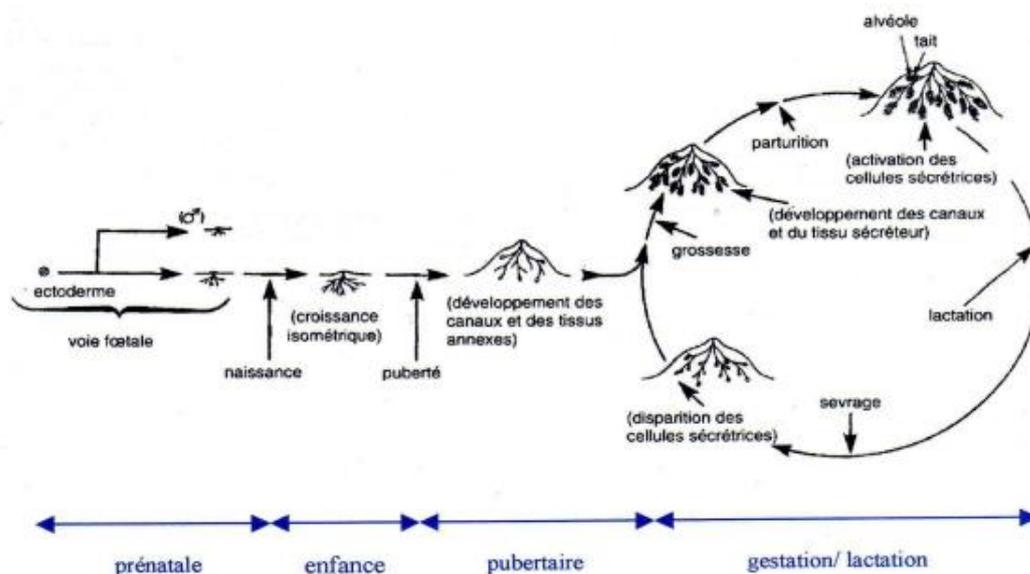


Figure 01 : Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire **(Vandermoere, 2005)**.

3. Anatomie

Chez la jeune femme le sein correspond à une éminence et pouvant peser de 150 à 200g (**Beauthier et Lefèvre, 1993**). Il se constitue de trois parties, à savoir la peau, la graisse et la glande mammaire, à proprement parler, incluse dans cette graisse (**Laurent, 2003**).

Chaque sein s'étend horizontalement du bord externe du sternum à la ligne axillaire antérieure et verticalement de la troisième à la septième côte (**Hamladji, 2006**). Il repose pour plus de sa moitié sur le fascia du muscle grand pectoral et pour le reste sur les fascias des muscles droits de l'abdomen. Par l'intermédiaire de ces fascias, le sein répond successivement au muscle petit pectoral et à son fascia clavi-pectoral, au gri costal et au delà de ce dernier, à la plèvre et au poumon.

Le sein est maintenu par la peau, il représente une zone périphérique lisse et souple, une zone moyenne ou aréole du sein et une zone centrale ou mamelon (**figure 02**).

Il est utile de noter qu'il est de forme variable, en fonction de l'âge, de la parité ainsi que la race (**Beauthier et Lefèvre, 1993**).

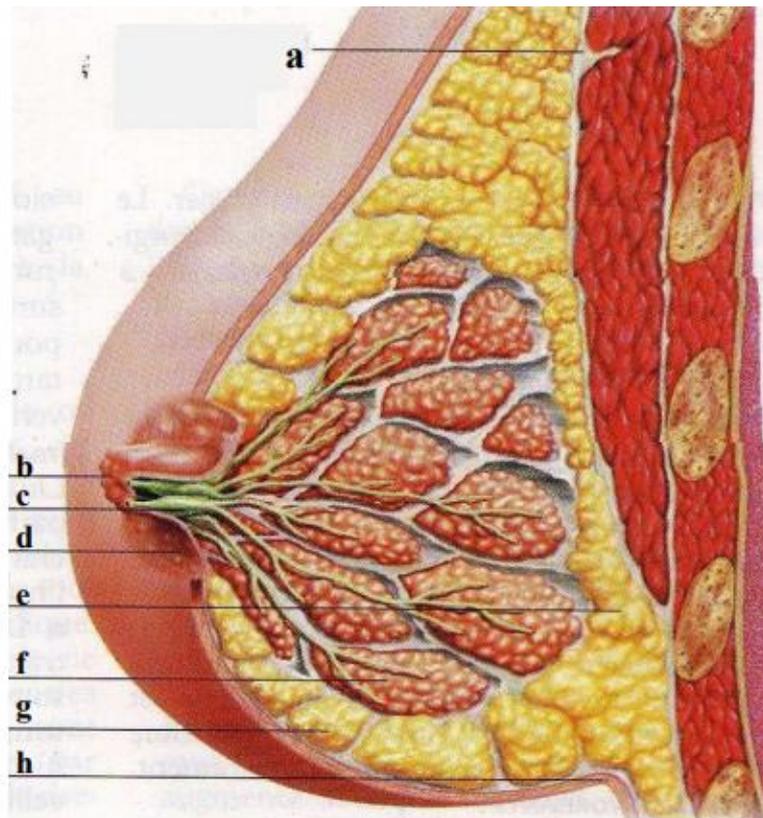


Figure 02 : Structure du sein (Larousse médical, 2006)

a : aponévrose du muscle grand, **b** : mamelon, **c** : canal galactophore **d** : aréole
e : graisse rétromammaire, **f** : glande mammaire, **g** : graisse pré mammaire, **h** : sillon sous
mammaire.

3.1. Peau

Le revêtement cutané du sein n'est pas homogène ; il est épais en périphérie et mince au centre, au contact de l'aréole et du mamelon où la peau s'adhère intimement à la glande pour assurer sa stabilité et présente une pigmentation plus intense que la peau avoisinante **(De Brux, 1979)**. Le sein est maintenu par la peau et ses ligaments suspenseurs constitués par les septièmes fibreux qui solidarisent les lames pré-mammaires. Le corps mammaire est développé par une lame pré-mammaire et une lame rétro-mammaire, dédoublement du fascia superficiel du thorax **(Beauthier et Lefèvre, 1993)**.

3.2. Mamelon

Les seins sont centrés par une surélévation cylindrique de 10 à 12 mm de long et de 10 à 12 mm de large appelée mamelon **(Hamladji, 2006)**. Il est peu développé chez l'homme et chez la jeune fille et il s'allonge chez la femme en particulier au cours de la grossesse. Au sommet du mamelon s'ouvrent des orifices qui servent de débouchés aux conduits lactifères appelés canaux galactophores (figure 02), ces derniers se singularisent, après une dilatation ampullaire fusiforme appelée sinus lactifère **(Colibn, 1996)** vers l'intérieur du sein. Le mamelon est cerné d'une zone circulaire appelée aréole **(Hamladji, 2006)**.

3.3. Aréole

L'aréole correspond à une surface annulaire entourant le mamelon **(figure 02)**. Elle fonce et grossit avec la puberté, puis un peu plus lors d'une grossesse et pendant la lactation. Elle servirait de repère visuel au bébé pour qu'il prenne toute l'aréole dans sa bouche pas seulement le mamelon pour obtenir du lait **(Cox et al., 1999)**. En périphérie de l'aréole sont situés les tubercules (glandes) de Montgomery sécrètent une substance lubrifiante et antiseptique qui protège le mamelon et l'aréole une infime quantité de lait est également sécrétée par ces tubercules. On y trouve aussi des glandes sudoripares et des follicules pileux **(Beaudry et al., 2006)**.

3.4. Arbre galactophorique

Sur le plan structural la glande mammaire s'organise sous une forme en grappe, constituée de 15 à 20 canaux galactophores drainant des lobes (en nombre égal aux canaux galactophores) subdivisés eux même en lobules et acini. De façon très dense, les acini s'assemblent autour d'un canal alvéolaire. Plusieurs canaux alvéolaires nommés encore canaux galactophores de troisième ordre ou canaux intra lobulaires, se joignent pour donner un canal lobulaire aussi appelé canal galactophore de deuxième ordre ou canalicule

extra lobulaire. Cette structure représente alors le lobule. A leurs tours plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour donner naissance à un canal galactophore de premier ordre. L'ensemble des lobules que draine le canal galactophore, forme un lobe (Sylvain, 2004; Laurent, 2003) (figure 03).

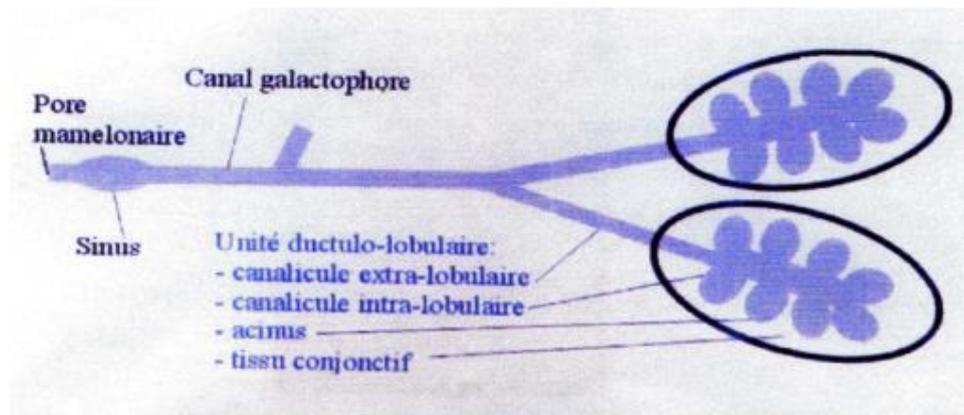


Figure 03 : Schéma de l'arbre galactophorique (Laurent, 2003).

3.5. Vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins qui pénètrent dans la glande proviennent de plusieurs origines, se ramifient dans le stroma et se terminent dans le plexus capillaires autour des canaux, des lobules ainsi que leurs acini. L'aspect vasculaire devient beaucoup plus riche dans la glande active.

3.5.1. Veines

Le drainage veineux se fait selon deux voies, à savoir une voie profonde dans laquelle les veines se rendent aux veines thoraciques externes en dehors, à la veine thoracique en dedans et aux veines intercostales en arrière (Rouvière et Dalmas, 2002), ainsi qu'une voie superficielle (ou sous cutanée) aboutissent sur le plan latéral dans la veine thoracique externe ou sur le plan sagittal dans la veine thoracique interne (Sylvain, 2004).

3.5.2. Artères

L'irrigation de la glande mammaire s'effectue par les branches perforantes de l'artère thoracique interne, qui traversent les six espaces inter costaux pour assurer la vascularisation de la partie interne de la glande mammaire. Les parties externe et inférieure reçoivent leurs artères des artères thoraciques externes, scapulaire inférieur, thoracoacromiale et thoraciques supérieur, branches de l'artère axillaire. Enfin la glande mammaire reçoit encore quelques rameaux des artères intercostales. La majeure partie des artères aborde les glandes mammaires par sa face superficielle **(Rouvière et Dalmas, 2002)**.

3.6. Drainage lymphatiques

L'anatomie descriptive des lymphatiques de la glande mammaire est connue depuis plus d'un siècle. Cette même anatomie envisagée sous un angle fonctionnel, est d'un intérêt capital dans la compréhension de l'atteinte métastatique lymphonodale dans le cancer du sein **(Oliviera et al ., 2006)**.

Les voies de drainage lymphatique mammaire semblent s'organiser de la manière suivante : un premier réseau lymphatique superficiel (déjà décrit par Sappey **(Sappey, 1985)**) drainant le parenchyme glandulaire superficiel jusque dans les lymphonoeuds (ganglions) axillaires, et un réseau profond (décrit par Hidden et ses collaborateurs **(Hidden et Arvy, 1973)**), drainant le parenchyme glandulaire profond jusque dans les chaines mammaires interne **(Oliviera et al ., 2006)**. Ce drainage s'effectue à 75% vers l'aisselle, le reste (25%) vers la chaine mammaire interne (ou thoracique) **(Bannister et al., 1995)** et accessoirement vers les ganglions sus-claviculaire **(Peltier, 1998)**. Le nombre de ganglions axillaires varie de 20 à 30. Ils se divisent en cinq groupes à savoir groupe latéral, groupe antérieur (pectoral), groupe postérieur (sus-claviculaire), groupe central et groupe apical **(Ellis, 2007) (figure 04)**.

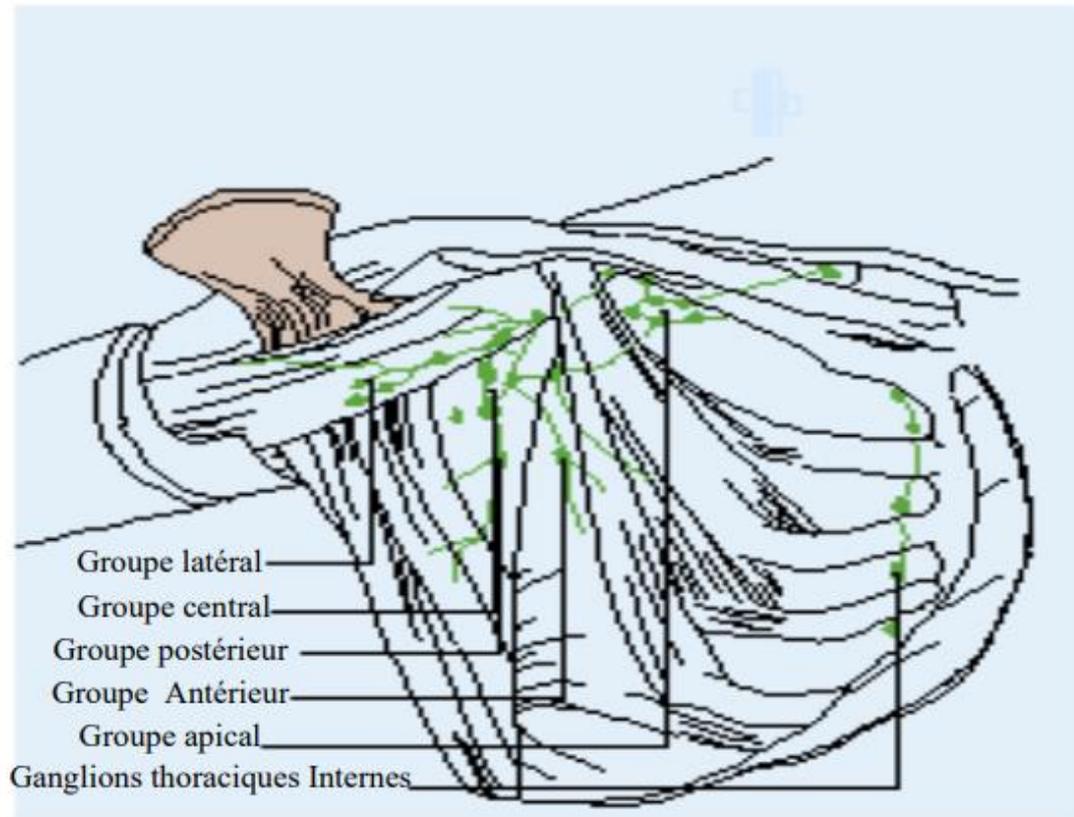


Figure 04 : Arrangement des principaux ganglions lymphatiques axillaires (Ellis, 2007).

3.7. Innervation

Cooper (Cooper, 1840) à montré que les deuxième, troisième, quatrième, cinquième et sixième nerfs intercostaux innervent le sein. La distribution de ces nerfs est complexe et variable (Donna et Geddes, 2007). Les nerfs cutanés sont fournis par la branche sus-claviculaire de plexus cervical superficiel par le rameau cutané latéral du deuxième, troisième, quatrième, cinquième et sixième nerf intercostaux. Toutes ces nerfs renvoient de nombreuses ramifications à la plaque aréolomamelonnaire qui est de ce fait une des régions les plus sensibles de l'organisme (De Brux, 1979 ; Donna et Geddes, 2007).

4. Histologie

Le tissu mammaire est formé d'une variété de types cellulaires (**Ollivier-Bousquet et Devinoy, 2005**). Une monocouche de cellules épithéliales, de forme cubique, tapisse la lumière des canaux et des acini et présente un phénotype sécrétoire très caractéristique (**Ollivier-Bousquet, 2006**). Juste au dessous s'organise une ceinture discontinue des cellules myoépithéliales, de forme allongée, qui expriment une forme d'actine et favorisent l'éjection du lait, synthétisé et accumulé dans les acini, en se contractant. Cette bicouche cellulaire est délimitée par une membrane basale, qui est apte de limiter la prolifération des cellules épithéliales et d'induire leur polarisation (**Laurent, 2003 ; Sylvain, 2004 ; Vandermoere, 2005**), parmi les cellules du stroma, les fibroblastes du tissu mammaire contribuent à l'organisation de la matrice extracellulaire sur laquelle repose l'épithélium mammaire. Un dysfonctionnement de ces fibroblastes contribue à la désorganisation de cette matrice et peut permettre aux cellules de migrer hors de la couche épithéliale. Les adipocytes du stroma, bien que n'étant pas strictement considérés comme des cellules mammaires, sont des partenaires indispensables à la mise en place du tissu mammaire (**figure 05**). En effet, en absence du coussin adipeux, les ébauches mammaires sont incapables de se développer et de constituer le réseau de canaux et de lobules mammaires (**Morroni et al., 2005**).

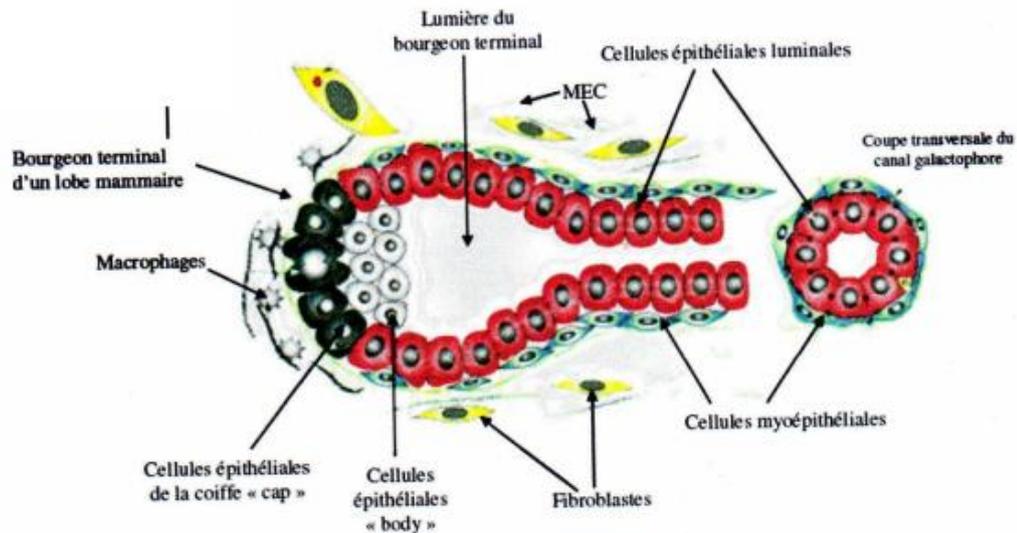


Figure 05 : Structure schématisée du microenvironnement stromal organisé autour du bourgeon épithélial terminal et des différents types cellulaires qui le compose (Cowin, 2005).

Le parenchyme de la glande mammaire montre des changements structuraux importants qui dépendent des différents conditions physiologiques (figures 06, 07, 08).

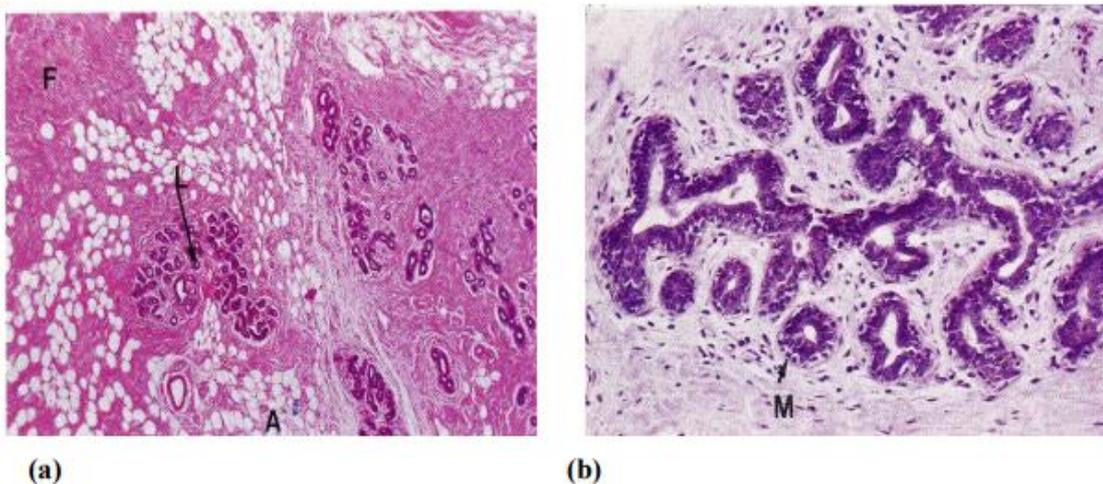


Figure 06 : Glande mammaire en repos (HE (a) x 20 – (b) x 128)
 L : les lobules, F : tissu conjonctif dense fibreux, A : tissu adipeux, M : cellules myoépithéliales (Wheater *et al.*, 1982).

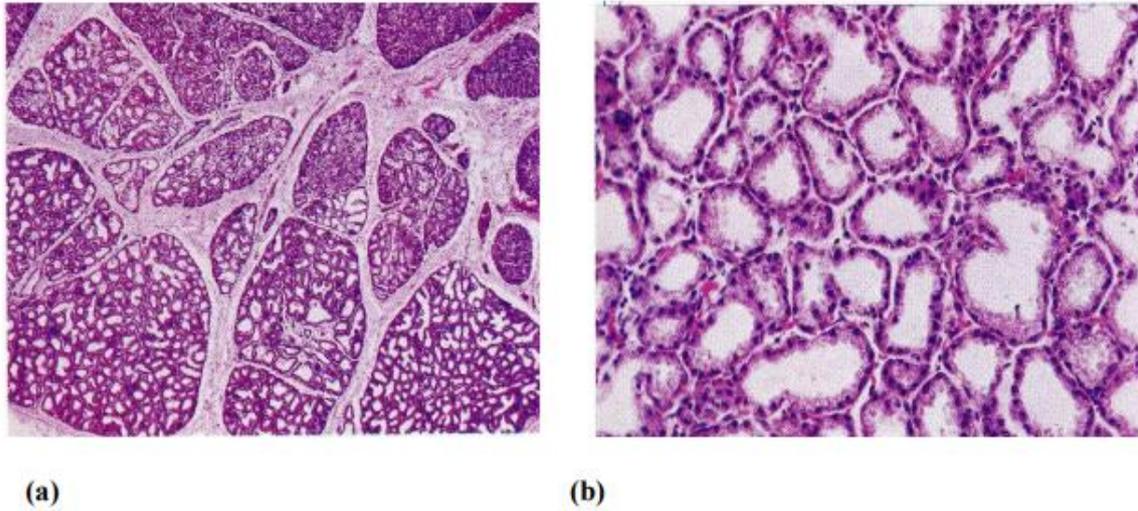


Figure 07 : Glande mammaire au cours de la grossesse (HE (a) x 20 – (b) x 128)
(Wheater *et al.*, 1982).

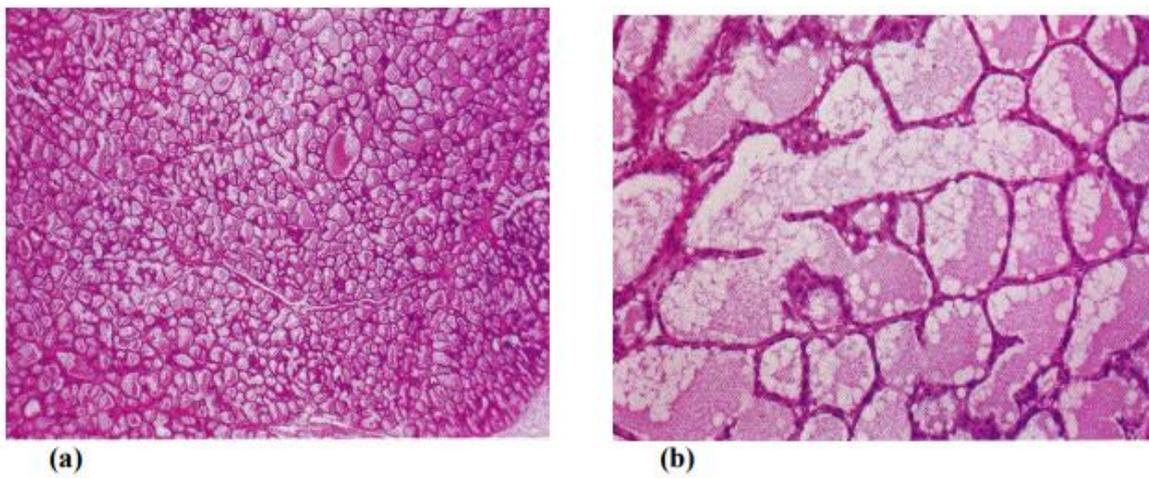


Figure 08 : Glande mammaire au cours de la lactation (HE (a) x 20 – (b) x 128)
(Wheater *et al.*, 1982).

5. Physiologie

Le sein de la femme est à l'évidence un organe hormonodépendant et hormonosensible. Les hormones interviennent à chacune des étapes du développement de la glande mammaire et tout au long de la vie génitale, par le biais de leurs récepteurs cellulaires, et au niveau des divers facteurs de croissance. La régulation de la croissance et de la maturation de la glande mammaire dépendent essentiellement de l'action synergique de l'estrogène, qui induit la prolifération des cellules épithéliales des canaux, et de la progestérone, qui favorise le développement des lobules et des acini, principales hormones sécrétées, de façon cyclique, par l'ovaire (**Espie et Gorins, 1995**).

Après l'accouchement, la crise génitale du nouveau-né intéresse tout aussi bien le garçon que la fille. A la faveur de taux élevés de prolactine par sécrétion hypophysaire directe et suite à la chute des estrogènes circulants d'origine maternelle, la glande mammaire rudimentaire particulièrement sensible, peut se congestionner et émettre une sécrétion colostrale appelée 'lait de sorcière' (**Colibn, 1996**).

A la puberté. Le développement des seins est le premier signe de la puberté féminine. Il se fait sans l'influence des œstrogènes. De la progestérone et des hormones hypophysaires (hormone folliculostimulante ou FSH, hormone lutéinisante ou LH) (**Larousse Médicale, 2006**).

Durant chaque cycle menstruel, d'importants phénomènes à l'échelon cellulaire interviennent ; ils entraînent en particulier en phase lutéale, entre le 15^{ème} et le 20^{ème} jour du cycle, un œdème tissulaire du lobule et une congestion veineuse ce qui explique les mastodynies fréquemment ressenties par les femmes à ce moment du cycle (**Chopier et al., 2003**).

La survenue d'une grossesse menée à terme marque la fin de la croissance mammaire. Au cours de cette phase, la glande mammaire se modifie considérablement. La grossesse est une période d'influence estrogénique, progestative sur l'épithélium qui débute dès le premier trimestre de la grossesse. La progestérone a également une action proliférative, permet la différenciation de l'épithélium mammaire et s'oppose, avant l'accouchement, à l'action sécrétoire de la prolactine, qui est une hormone hypophysaire déclenchant après accouchement la sécrétion des glandes mammaires. Aussi, enfin de grossesse, les cellules épithéliales des acini sont pleinement différenciées en cellules

sécrétrices. Après l'accouchement, la chute des hormones placentaires associée à un pic de prolactine stimule les cellules sécrétrices. Ces cellules lactogènes élaborent les différents composants du lait. Après le sevrage, l'apoptose ou mort cellulaire programmée, permet l'élimination du tissu lactant. Cette apoptose a un rôle capital dans l'homéostasie et la physiologie du sein. Après la fin de l'allaitement, le sein retrouve son état latent antérieur tout en concevant un réseau canalaire plus développé (**Mathelin et al., 2007**).

La présence de récepteurs estrogénique (RE) dans les cellules épithéliales est fondamentale pour la réponse aux stimuli hormonaux régulant le développement de la composante épithéliale (**Russo, J. et Russo, I., 2004**).

Les estrogènes ont un rôle de promoteur direct seulement dans les cellules épithéliales RE+. Ils peuvent toutefois jouer un rôle promoteur indirect via les facteurs de croissance et les cytokines sécrétées par les cellules épithéliales et stromales hormonosensibles qui vont stimuler les cellules épithéliales ayant des récepteurs spécifiques à ces facteurs quel que soit leur statut (RE+ ou RE-) (**Cavaliere et Rogan, 1992**).

Les récepteurs à la progestérone (RP) exerçant également un rôle crucial dans la prolifération de l'épithélium mammaire au cours de la grossesse. En début de grossesse, la prolifération épithéliale induite par la progestérone est liée à l'expression élevée des récepteurs progestéroniques par un mécanisme paracrine. En fin de grossesse, le blocage, de cette prolifération permet la différenciation cellulaire en réponse à une chute marquée de l'expression des récepteurs progestéroniques. Les récepteurs à la prolactine, dont six isoformes ont été identifiées, sont exprimés à des degrés divers dans l'épithélium mammaire (**Clevenger, 2003**).

L'interaction de ces récepteurs avec la prolactine contribue à la fois au développement de la glande mammaire pendant la grossesse et à la lactation lorsque surviennent le pic de prolactine et la chute des hormones placentaires. A la ménopause, on assiste à la disparition des acini et à la raréfaction des structures glandulaires qui deviennent non fonctionnelles et seront remplacées par du tissu graisseux (**Espie et Gorins, 1995**).

5.1. Sécrétion lactée

La sécrétion lactée est l'ensemble des processus de synthèse par lesquels les cellules des acini métabolisent les substances provenant du sang et les expulsent dans la lumière (**figures 09**). Le lait est stocké dans les acini et les petits canalicules, puis dans les grands

canalicules. La cellule mammaire accomplit sa fonction avec les mitochondries, l'ergastoplasme ainsi que l'appareil de Golgi. Le lait est un produit complexe contenant des protéines dont les caséines, les immunoglobulines, des graisses, des carbohydrates dont le lactose, des ions anorganiques, des vitamines et de l'eau. Au cours de la lactation la composition du lait élaboré est modifiée constamment, par les cellules glandulaires, pour s'adapter aux différents besoins des petits.

Le *colostrum*, liquide sécrété par la glande mammaire après l'accouchement, diffère du lait normal ; il est composé de plus de graisse, de protéines, de Na et Cl, moins de lactose et de potassium. Il contient des immunoglobulines IgA, IgG, sécrétées localement par les plasmocytes de la glande mammaire (De Brux, 1979).

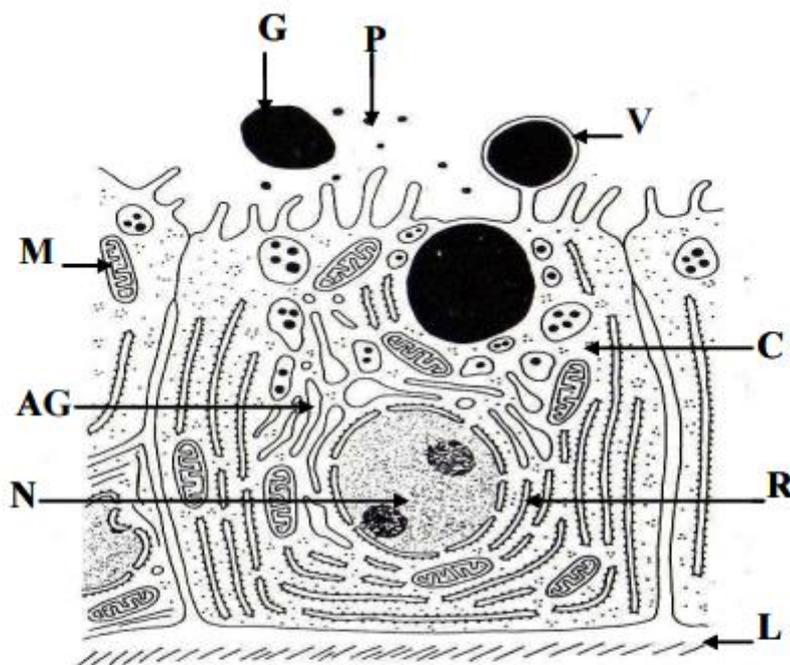


Figure 09 : Sécrétion apocrine du lait par les cellules épithéliales de l'acinus (De Brux 1979).

M : mitochondrie, **R** : réticulum endoplasmique, **L** : lame basale, **G** : gouttelette lipidique,

V : vésicule de sécrétion protéique, **P** : protéines sécrétées, **AG** : appareil de Golgi, **N** : noyau,

C : cytoplasme.

6. Genres de bactéries affectant le tissu mammaire

Ces dernières années, l'intérêt porté envers le microbiote n'a cessé de se développer avec la découverte de l'impact de ces microorganismes symbiotiques, commensaux ou pathogènes sur la santé humaine (Wang et al., 2017). D'ailleurs, des projets de recherche de haute envergure, dont le *Human Microbiome Project* (HMP), ont été initiés afin d'identifier et de caractériser les microorganismes qui colonisent l'humain, incluant des virus, des bactéries, des archées, des champignons et des protistes, et d'évaluer leurs effets sur le développement de maladies, mais aussi chez les individus sains (Group et al., 2009 ; Turnbaugh et al., 2007).

Quant à la localisation de la population bactérienne chez l'Homme et de la composition de certains microbiotes d'intérêt. Puis, la notion de « dysbiose », ou un déséquilibre du microbiote normal à un site corporel, et son impact seront introduits. Le microbiote entier du corps humain est généralement estimé à plus de 100 trillions (10^{14}) de cellules bactériennes, soit environ 10 fois plus que le nombre de cellules humaines. Récemment, certains auteurs ont plutôt proposé un ratio 1:1 entre les bactéries et les cellules humaines (environ 3×10^{13} cellules humaines et bactériennes pour un humain de 70 kg) (Sender et al., 2016). Néanmoins, le nombre de bactéries qui compose le corps humain reste considérable. Le nombre de genres bactériens retrouvé sur le corps humain serait présentement évalué à plus de 5000. Cependant, ce nombre sous-estime probablement la diversité bactérienne réelle puisque le microbiote de certains sites corporels est très peu caractérisé. Des populations bactériennes variées se sont établies sur des surfaces du corps qui sont exposées à l'environnement extérieur, telles que les constituants du tractus gastro-intestinal (intestin), des appareils respiratoire (cavité orale et poumons), urinaire (urètre) et reproducteur (vagin) et de la peau et d'autres muqueuses. Le tractus gastro-intestinal est considéré comme l'emplacement du corps humain ayant le microbiote le plus important et le plus diversifié (entre 1183 à 3108 genres) (Rojo et al., 2017).

Ce qui en fait le microbiote le plus caractérisé pour son impact sur la santé humaine (Llyod et al., 2016). Jusqu'à récemment, le dogme en microbiologie était que le microbiote humain serait limité à certains sites corporels, les tissus profonds étant dépourvus de tout microorganisme et donc, complètement stériles (Ford et al., 1901 ; O'connor et al., 2018). Ainsi, pour un individu sain, une détection bactérienne dans des tissus internes comme le tissu mammaire ou les liquides biologiques tels

que le sang était liée à une condition médicale particulière, telle une infection. Cependant, l'avancement des techniques de détection et d'identification bactériennes par des méthodes indépendantes de la culturomique a permis de détecter la présence de bactéries dans plusieurs tissus humains et dans le sang (**Gosiewski et al., 2017**). Même chez les individus sains. Par conséquent, les évidences expérimentales semblent contredire le dogme initial et suggèrent que la localisation des communautés bactériennes dans le corps humain est beaucoup plus étendue que préalablement proposé. Récemment, Urbaniak et al. ont utilisé le séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing NSG) et les cultures microbiennes pour démontrer l'établissement d'une population bactérienne viable dans le tissu mammaire, formant une communauté diversifiée et unique (**Urbaniak et al., 2014**). De plus, ils ont comparé leurs résultats obtenus dans deux régions géographiques distinctes, le Canada et l'Irlande, pour montrer que le microbiote mammaire a une composition stable et établie, malgré les variations pouvant être introduites par la localisation des cohortes. Bien que l'origine de ces bactéries soit toujours méconnue, le sein partage une signature bactérienne similaire avec le microbiote intestinal et le microbiote du lait maternel (**Jandhyala et al., 2015 ; Ward et al., 2013**). D'ailleurs, les souches bactériennes lactiques *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* et *Pediococcus pentosaceus* ont été retrouvées dans les selles de la mère, le lait maternel et les selles de l'enfant (**Albesharat et al., 2011**). Ces résultats proposent une interrelation entre l'intestin, le sein et le lait maternel afin de permettre une transmission verticale de certaines bactéries bénéfiques entre la mère et l'enfant. Un des processus qui pourrait expliquer la colonisation du tissu mammaire en provenance du microbiote intestinal (voie « entéro-mammaire »), mais aussi de plusieurs autres régions corporelles (cavité orale, vagin, peau, voies respiratoires) est la translocation bactérienne à travers différents épithélia et muqueuses qui permettrait aux bactéries d'entrer dans la circulation sanguine, possiblement à l'aide de cellules immunitaires, et de migrer jusqu'au sein (**Perez et al., 2007 ; Urbaniak et al., 2012**). Une autre hypothèse est leur déplacement par les canaux galactophores (« transfert rétrograde ») en provenance de la peau ou de la bouche de l'enfant (**O'Connor et al., 2018 ; Moossavi et al., 2019**). En effet, le liquide mammaire collecté par aspiration (*fluide aspiré du mamelon*, NAF) et le lait maternel présentent une population bactérienne, même lorsque la papille mammaire est désinfectée, suggérant une présence microbienne le long des canaux galactophores (**Chan et al., 2016 ; Hunt et al., 2011**). Les études ont été réalisées pour la plupart

sur le microbiote intestinal, mais des processus similaires pourraient se produire dans le tissu mammaire s'il partage certaines espèces bénéfiques ou nuisibles.

La composition bactérienne du microbiote humain démontre une variabilité interindividuelle et intraindividuelle. Plusieurs facteurs endogènes ou exogènes divers tels que le mode de vie, la diète, l'environnement, l'âge et le fonds génétique peuvent expliquer les différentes espèces identifiées dans les individus (**Blekhman et al., 2015**).

Il a été démontré que la région géographique où habite un individu peut être un facteur déterminant dans la composition de sa communauté bactérienne (**Yatsunenکو et al., 2012**). Les diètes différentes sont souvent présentées comme une explication pour la diversité du microbiote intestinal entre les pays/continents. L'alimentation peut en effet avoir une influence importante sur le microbiote comme le démontrent les études comparant la diète occidentale riche en protéines animales à une diète rurale africaine riche en fibres (**De Filippo et al., 2010**). Ou à la diète méditerranéenne, constituée de céréales, de fruits et de légumes (**Di Filippo et al., 2016**). D'ailleurs, une signature bactérienne enrichie en firmicutes, au dépend des bactéroïdètes, peut être observée dans le microbiote des souris obèses comparativement aux souris minces (**Ley et al., 2005**). Malgré cette diversité inter- et intraindividuelle, le microbiote humain pourrait être formé en partie d'une communauté bactérienne partagée parmi les individus (*core microbiota*), bien que ce concept soit encore peu documenté et contredit (**Falony et al., 2016 ; Ursell et al., 2012**). À tout le moins, un individu pourrait posséder un microbiote relativement stable dans le temps une fois que celui-ci s'est installé après la naissance (eubiose), ce qui lui conférerait des bénéfices pour sa santé (**Costello et al., 2009 ; Clemente et al., 2012**). Ce microbiote qui est en équilibre homéostatique avec un hôte en bonne santé peut être déséquilibré par la modification de la population bactérienne normale, en composition ou en quantité, engendrant un état de dysbiose.

La dysbiose se traduit généralement par une augmentation des bactéries nuisibles au détriment des bactéries bénéfiques et d'une perte de la diversité microbienne (**Degruttola et al., 2016**). Dans certains contextes, les facteurs mentionnés précédemment, soit la diète, le mode de vie et les gènes peuvent mener à la dysbiose (**Degruttola et al., 2016**). Le stress physiologique est aussi un facteur non négligeable dans le débalancement de la flore normale (**Hawrelak et al., 2004**).

L'étude du microbiote intestinal de macaques récemment éloignés de leur mère à permis d'observer une variation de plusieurs jours dans la signature bactérienne intestinale, à la suite du stress de séparation, avant qu'elle ne revienne à la normale (**Bailey et al., 1999**). Par la suite, la prise de médicaments, notamment les antibiotiques mais aussi les traitements systémiques contre le cancer, peut altérer de façon drastique la composition du microbiote. L'analyse du microbiote intestinal à la suite de l'administration d'un antibiotique à large spectre, la ciprofloxacine, à montré une diminution de l'abondance de 30 % des taxa bactériens, induisant une perte de l'uniformité, de la diversité et de la richesse dans la population bactérienne (**Dethlefsen et al., 2008**). Le microbiote peut prendre plusieurs semaines avant de revenir à son état initial après cette perturbation. Or, suivant la prise répétée d'antibiotiques, la signature bactérienne observée peut ne plus être identique à ce qu'elle était avant, du fait de changements permanents à sa composition (**Dethlefsen et al., 2011**). De plus, il a été démontré que le traitement d'enfants souffrant de leucémie aigüe lymphoblastique à l'aide de doses élevées de méthotrexate, un agent chimiothérapeutique, menait à une diminution de 29.6 % de la charge bactérienne dans leurs fèces (**Huang et al., 2012**).

Enfin, l'intégrité de la flore microbienne du corps humain est essentielle afin de préserver une bonne santé.

7. Y'a-t-il un lien avec le cancer du sein ?

Au cours des dernières années, plusieurs évidences expérimentales ont suggéré la participation du microbiote dans les étapes multiples du développement d'un cancer. *H. pylori*, mais aussi *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella enterica*, *E. faecalis* et *Clostridium leptum* font partie des espèces bactériennes ayant été associées à des effets protumoraux (**Vivarelli et al., 2019**). Dernièrement, Arthur et al. ont revu les « hallmarks » du cancer, en y incorporant cette fois-ci l'influence des bactéries dans l'accumulation des propriétés nécessaires à l'apparition d'une cellule cancéreuse (**Fulbright et al., 2017**). Globalement, le microbiote peut avoir un impact sur l'instabilité génétique et l'accumulation de mutations, l'inflammation protumorale, l'autonomie envers les facteurs de croissance et l'évasion du système immunitaire. Tout d'abord, plusieurs bactéries résidant dans l'intestin peuvent produire des toxines qui augmentent la prolifération ou l'instabilité du génome des cellules intestinales. Il a été démontré

par l'utilisation d'un modèle murin que la toxine de *B. fragilis* (BFT) entraîne une voie de signalisation induisant la transcription du proto-oncogène c-Myc, suivant le clivage de la *cadhérine E* (Rhee et al., 2009). Également, la *colibactine* produite par certaines *E. coli* peut non seulement favoriser la prolifération cellulaire par l'induction de la production du facteur de croissance hépatique (*hepatic growth factor*, HGF), mais aussi provoquer des cassures double brin à l'ADN, participant donc à l'accumulation des mutations (Nougayrède et al., 2006 ; Cougnoux et al., 2014). Certaines molécules sécrétées ou présentées par les bactéries modulent la réponse immunitaire ce qui peut promouvoir l'évasion des cellules tumorales. C'est le cas de *F. nucleatum* qui inhibe les fonctions cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T CD8+ dans l'environnement tumoral par l'interaction entre l'immunorécepteur inhibiteur TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) et la protéine d'activation des fibroblastes (*fibroblast activation protein*, Fap2) (Gur et al., 2015). Par ailleurs, de nombreuses bactéries comme *E. faecalis*, *H. pylori* et *B. fragilis* peuvent créer un environnement inflammatoire chronique protumoral, notamment par leur sécrétion de molécules inflammatoires telles que des dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) ou de l'azote (Garrett et al., 2015; Vivarelli et al., 2019). Pour finir, le métabolisme du microbiote pourrait être un facteur à évaluer lors du choix de la thérapie contre le cancer. Récemment, Geller et al. ont démontré que les *Gammaproteobacteria* étaient capables de métaboliser la gemcitabine en une forme inactive, rendant certains cancers du pancréas résistants à la chimiothérapie (Geller et al., 2017). Outre l'effet néfaste de bactéries spécifiques dans l'oncogenèse, la signature bactérienne globale d'un microbiote peut être associée au développement de la maladie, principalement lors d'une dysbiose. Le transfert du microbiote de souris avec ou sans cancer colorectal (CRC) dans des souris saines, traitées pour développer un CRC, a permis d'observer un nombre plus élevé de tumeurs dans les souris ayant reçu un microbiote d'un donneur malade (Zackular et al., 2013). De plus, il a été démontré que le CRC est fréquemment accompagné d'une réduction des firmicutes, des bactéroïdètes et des bactéries lactiques, suivi d'une augmentation des *Fusobacterium* (Raskov et al., 2017). Ces résultats suggèrent que l'ensemble du microbiote d'un individu atteint d'un cancer est relié aux 50 développements de sa maladie. Cela s'explique par une augmentation des bactéries néfastes dans sa composition et la dérégulation de la balance entre les processus pro-inflammatoire et anti-inflammatoire normalement retrouvés dans un microbiote en eubiose. En se fiant à ces observations, il est clair

que la caractérisation du microbiote dans le cancer doit se faire non seulement en évaluant l'effet de bactéries protumorales, mais aussi en prenant en considération l'intégralité de la population microbienne qui, lors d'un déséquilibre, participe au développement tumoral.

Bien que certaines bactéries ou la dysbiose soient associées au développement du cancer, le microbiote joue un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance tumorale, des bactéries commensales produisent des acides gras à chaîne courte (SCFA) qui régulent non seulement la réponse immunitaire, mais peuvent aussi avoir un effet antitumoral direct. Il a été montré que le propionate et l'acétate produits par les bactéries du genre *Propionibacterium* génèrent des ROS et activent la caspase-3 dans les cellules cancéreuses ce qui entraîne leur mort par apoptose (**Jan et al., 2002**). Le butyrate peut aussi mener à l'apoptose des cellules cancéreuses par l'activation des caspases. Il peut également modifier l'expression génique des cellules malignes par l'inhibition des histones désacétylases (*histone deacetylase inhibitors*, HDAC), induisant un arrêt du cycle cellulaire et de la synthèse d'ADN ainsi que l'apoptose (**Chai et al., 2000 ; Stelio et al., 2012**). D'autres molécules synthétisées par certaines bactéries peuvent aussi participer directement au contrôle de la tumeur comme le ferrichrome de *L. casei* qui a un effet suppresseur de tumeur dépendant de l'apoptose activée par la signalisation des kinases JNK (c-Jun N-terminal) (**Konishi et al., 2016**). Cependant, l'impact du microbiote sur la croissance tumorale se fait principalement de façon indirecte, en stimulant la réponse immunitaire antitumorale par la génération d'un environnement pro-inflammatoire. L'étude des modèles murins sans germe (GF) et exempt d'organismes pathogènes spécifiques (*specific-pathogen-free*, SPF) a permis d'illustrer l'importance de l'inflammation causée par le microbiote dans le contrôle tumoral et l'efficacité de la thérapie contre le cancer. Dans une étude sur le développement du CRC, les souris GF présentaient des tumeurs plus importantes en nombre et en taille comparativement aux souris SPF possédant un microbiote (**Zhan et al., 2013**). La croissance tumorale pouvait être limitée dans les souris GF par leur colonisation avec des bactéries commensales ou par l'administration du LPS, suggérant ainsi que la présence d'une communauté microbienne et de ses composantes (motifs moléculaires associés aux microbes-MAMP) permet de maintenir une inflammation basale antitumorale. Plusieurs études ont aussi démontré que cette influence de la population microbienne sur l'inflammation locale stimule la réponse immunitaire antitumorale et ultimement, améliore l'efficacité de la

chimiothérapie (5-fluorouracile, **(Gonzalez-sarrias et al., 2015)**. cyclophosphamide, **(Viaud et al., 2013)**.) et de l'immunothérapie (CpG-oligonucléotide, **(Lida et al., 2013)**, anti-PD-L1, **(Sivan et al., 2015)**. anti-CTLA4, **(Vétizou et al., 2015)**). L'étude de Viaud et al. à par exemple démontré que la déplétion du microbiote d'une souris avec de la vancomycine (antibiotique contre les Gram+) ou l'utilisation de souris GF réduisaient l'effet de la chimiothérapie au cyclophosphamide sur la tumeur **(Viaud et al., 2013)**. D'ailleurs, il à été démontré que la perte d'une partie du microbiote par le traitement de la souris avec un antibiotique menait à la diminution de la réponse inflammatoire des lymphocytes Th17, importante pour l'efficacité de la cyclophosphamide. Ainsi, même si le microbiote peut promouvoir l'inflammation chronique, et par le fait même la cancérogenèse, l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale grâce à cette inflammation peut avoir des effets bénéfiques pour le contrôle de la tumeur. La relation entre le microbiote et le cancer à été principalement caractérisée par des études sur le microbiote intestinal et le CRC, même si des populations bactériennes ont été découvertes dans des tissus distants et qu'elles pourraient avoir un impact semblable sur l'oncogenèse locale. Un certain nombre d'études, bien qu'insuffisant, à tenté d'évaluer l'impact du microbiote mammaire dans le développement ou le contrôle du cancer du sein. Urbaniak et al. Ont montré une différence significative entre la composition microbienne des tissus mammaires sains et celle du tissu normal adjacent à la tumeur (*normal tissue adjacent to the tumor*, NAT) **(Urbaniak et al., 2016)**. Les tissus sains étaient caractérisés par une quantité importante de *Prevotella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* et *Micrococcus*, tandis que les NAT étaient composés de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *entérobactéries*, *Comamonadaceae* et *bactéroïdètes*. De plus, l'analyse de quatre représentants des *entérobactéries* (*E. coli*) et *Staphylococcus* (*S. epidermidis*) retrouvés préférentiellement dans le sein cancéreux à démontré leur capacité à induire des dommages à l'ADN, suggérant qu'une dysbiose est associée au cancer du sein et peut promouvoir l'oncogenèse **(Urbaniak et al., 2016)**. Les connaissances sur le microbiote mammaire et son influence sur le cancer du sein restent toutefois très limitées. À la suite de résultats démontrant une diminution du risque de cancer du sein ou de mastite (inflammation mammaire) après l'administration orale de produits fermentés ou de *lactobacillus* sous forme de probiotiques, certains ont émis l'hypothèse selon laquelle les bactéries lactiques retrouvées principalement dans le tissu mammaire en santé auraient un effet protecteur **(Hurtado et al., 2017 ; Urbaniak et al., 2012)**. Cependant, la compréhension de l'effet bénéfique ou nocif des bactéries résidentes dans le

sein sur l'oncogénèse en est à ses débuts et doit continuer d'être étudiée afin de déterminer les mécanismes par lesquels le microbiote mammaire participe au contrôle de la tumeur.

Lors de la formation de la tumeur, le microbiote présent dans le tissu peut s'infiltrer dans l'agrégat de cellules tumorales, permettant de moduler l'inflammation, le métabolisme et la réponse immunitaire au centre du microenvironnement tumoral. L'étude de Geller et al. a permis entre autres d'observer, par l'utilisation de marquages contre le LPS en immunohistochimie (IHC) et l'ARNr 16S avec l'hybridation *in situ* à fluorescence (*fluorescence in situ hybridization*, FISH), la présence de ces composants bactériens au sein des adénocarcinomes canauxaires pancréatiques humains (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) (Geller et al., 2017). Un nouveau champ de recherche dans l'étude du microbiote et son impact dans le cancer s'est ouvert avec la découverte de cette population bactérienne, considérée comme le microbiote intratumoral. La caractérisation de ce microbiote en est à son commencement, mais il est dorénavant connu, notamment grâce aux études sur les cancers mammaires et gastro-intestinaux, que la signature bactérienne et la charge bactérienne dans le microbiote intratumoral se différencient de celles des tissus normaux. Dans le cancer du sein, Xuan et al. ont montré un enrichissement de la tumeur mammaire en *M. radiotolerans*, tandis que le NAT était plutôt enrichi en *S. yanoikuyae* (Xuan et al., 2014). Également, l'étude démontrait que la charge bactérienne, déterminée par la quantification qPCR du gène de l'ARNr 16S, ainsi que la réponse antibactérienne étaient moins élevées dans les tumeurs mammaires que dans les NAT appariés. Considérant qu'une réduction drastique de l'ADN bactérien dans les tumeurs du sein corrèle avec une expression plus faible des gènes immunitaires antibactériens, il est possible que la présence d'un microbiote intratumoral soit souhaitable pour le bon fonctionnement de la réponse immunitaire antitumorale en favorisant l'inflammation locale dans le microenvironnement tumoral. Jusqu'à présent, cette hypothèse n'a pas été évaluée dans le cancer du sein. Toutefois, Riquelme et al. ont récemment démontré chez des patients avec un PDAC qu'une diversité bactérienne élevée dans leur tumeur, synonyme d'un microbiote intratumoral en eubiose, était un facteur déterminant dans le recrutement et l'activation de lymphocytes T CD8+ (Riquelme et al., 2019). De plus, la diversité bactérienne intratumorale élevée était associée à une survie à long terme augmentée pour les patients atteints de PDAC, habituellement caractérisés par leur risque élevé de récurrences mortelles. Par ailleurs, l'effet de certaines bactéries présentes dans le microenvironnement tumoral

sur la réponse aux traitements antitumoraux ou sur le développement des cellules cancéreuses ne doit pas être négligé. Malgré la découverte et l'identification de bactéries dans le microbiote intratumoral mammaire, celui-ci est très peu caractérisé. En prenant en considération les interactions multiples que le microbiote peut avoir avec nos processus physiologiques, il est primordial de déterminer si le microbiote intratumoral mammaire a une importance pour le recrutement de cellules immunitaires et ultimement, sur le devenir clinique des patients.

1. Introduction :

Le mot propolis est d'origine grecque et il signifie « pro » en avant et « polis » cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche « devant » la cité. Son étymologie viendrait aussi du verbe latin propolire qui signifie « enduire ». En effet, l'abeille enduit l'intérieur de son habitat de cette résine pour se protéger des agressions microbiennes. Son usage remonte à plusieurs millénaires et elle est surtout réputée pour ses propriétés antibactériennes, immunostimulantes et cicatrisantes (**Castaldo et Capasso, 2002**). Connue déjà des prêtres de l'Égypte antique ou elle servait à momifier les cadavres, la propolis fut très certainement utilisée par les grecs anciens puisque Aristote la signale comme un remède aux affections de la peau, plaies et suppurations dans son 'histoire des animaux'.

Les romains l'ont donné à tous les soldats pour soigner leurs blessures pendant les différentes invasions. Les anciens textes grecs rapportent que les médecins l'utilisaient pour la fabrication de baumes (**Golder, 2004 ; Viel et Dore, 2003**).

Les ouvrages du moyen âge européen décrivent même les préparations médicales à base de propolis pour les traitements des maladies de la sphère ORL et de la respiration.

Son activité anesthésiante reconnue permet à cette époque la chirurgie des fentes labiales chez l'enfant. A la fin du XIX^e siècle, la propolis était en plein essor grâce à ses vertus médicinales, employée sous forme d'onguent, d'emplâtre, de lotion ou de fumigation. De nos jours, elle est utilisée surtout en Europe de l'est, au Brésil, en Asie et notamment au Japon (**Blanc, 2010**). Parmi les usages médicaux, nous citons son emploi comme vernis pour le traitement des violons, ce qui leur donne un meilleur son et les protège contre le ver de bois (**Marcucci, 1995 ; Prost, 1979 ; Viel, 2003**).

2. Définition de la propolis

La propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles sur certaines parties de végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certains ordres), substances qu'elles rapportent à la ruche et qu'elles modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs propres sécrétions (cire et sécrétions salivaires principalement) (**Donadieu, 2008**).

3. Origine et botanique

Il existe plusieurs types de propolis qui sont fonction de la zone géographique de la ruche des végétaux présents sur cette zone, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille. Tout cela explique que l'on trouve des propolis de couleurs jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés qualifiées de vertes ou de rouges. L'abeille va aller rechercher sa résine dans son écosystème et c'est bien de cet écosystème que va dépendre la composition de la propolis (**Burdock, 1998**).

Tableau 01. Principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis
Sont représentées par différents conifères (pin, sapin, épicéa) et plusieurs espèces
De peupliers (qui semblent la source la plus importante) (**Bankova et al., 2000**).

arbres	Familles (Bezanger et al., 1990)	Provenance (Burnie, 1998)	Principales propriétés (Giamalia et al., 1999 ; Krol et al., 1993)
Chêne	Fagacées	Asie Afrique	Anti inflammatoire Astringente Analgésique Hyoglycéniant
Peuplier	Salicacées	Afrique du nord Moyen orient Europe	Diurétique Facilite l'urico-élimination Fluidifiant Antiseptique
Bouleau blanc	Bétulacées	Europe du nord Amérique Canada	Diurétique Facilite l'urico-élimination Cicatrisante
Orme	Ulmacées	Amérique Europe Chine	Anti inflammatoire Antifongique Anti diarrhéique Astringente
Pin	Pinacées	Amérique du nord Europe du nord Russie	Mucolytique Cicatrisante Astringente Antiseptique
Marronnier d'Inde	Hippocastanacées	Europe Turquie Balkans	Antihémorragique Astringente Vasoconstricteur
Frêne	Oléacées	Europe du sud Afrique du nord	Antiarthritique Antalgique Diurétique

4. Propriétés physico-chimiques de la propolis

4.1. Propriétés physiques

4.1.1. Consistance

La propolis est une substance naturelle de consistance variable suivant la température :

- A 15C°, elle est dure et friable ;
- A 30C°, elle est molle et malléable ;
- Entre 30 et 60C°, elle devient collante ou gluante, jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70C° ou plus (**Donadieu, 2008**).

4.1.2. Couleur

Très variable suivant sa provenance, allant du jaune claire ou brun très foncé, presque noir, en passant par toute la gamme des bruns (**Donadieu, 2008**).

4.1.3. Saveur

Elle est souvent âcre et parfois amère (**Donadieu, 2008**).

4.1.4. Odeur

Variable selon son origine botanique : en générale arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelles, vanille, etc.). Lorsqu'on la brule, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient (**Donadieu, 2008**).

4.2. Propriétés chimiques

4.2.1. Solubilité

La propolis est insoluble dans l'eau à froid. Elle est en revanche, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, etc. il importe de noter que la propolis est beaucoup plus soluble dans une solution de soude caustique à 2% (**Donadieu, 2008**).

4.2.2. Point de fusion

Son point de fusion se situe autour de 70°C. Chauffée au bain marie, elle se divise en deux parties :

- Une partie visqueuse qui tombe au fond du récipient ;
- Une partie liquide appelée cire de propolis, qui reste en surface et qui a de nombreux usages dans le domaine apicole (**Donadieu, 2008**).

4.2.3. Densité

La densité de la propolis est de 1,2 (soit supérieur à celle de l'eau) (**Donadieu, 2008**).

5. Composition analytique

La composition de la propolis est variable selon la source végétale visitée par les abeilles. On connaît actuellement plus de 300 composants différents de la propolis qui ont été identifiés par la méthode d'analyse modernes : chromatographie en phase gazeuse et spectromètre de masse (**Agra et al., 2006 ; Donadieu, 2008 ; Kumazawa et al., 2004**).

La composition de la propolis brute diffère de celle de la propolis pure (**Agra et al., 2006 ; Kumazawa et al., 2004**).

Toutefois, un échantillon de propolis est généralement composé de :

Tableau 02. Composition chimique de la propolis brute (**Pietta et al., 2002**).

Composition en ordre	Composition par groupe	quantité
Résines et baumes	Flavonoïdes, acides phénoliques+esters	45-55%
Cire et acides gras	La cire d'abeille et des plantes	25-35%
Huiles essentielles volatiles	Anéthol et eugénol +++	10%
Pollen	Protéines (6 acides aminés libres >1%) Arginine et proline jusqu'à 45% du total	5%
Autres composés organiques et substances minérales diverses	Cétones, latones, quinones, stéroïdes, acide benzoïque, vitamines A/B, sucres, 14 traces de minéraux, silice et zinc sont les plus connus	5%

La composition chimique de la propolis pure diffère complètement de celle de la propolis brute, c'est ce que nous montre le tableau suivant :

Tableau 03. Composition chimique de la propolis pure (Velicova et al., 2000).

Composition	
Flavonoïdes	Naringenin
Acides aliphatiques	9-Octadecanoic acide Hexadecanoic
Acides aromatiques	Ferulic acide 3,4-Dimethoxycinnamic acide 3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acide 4-Pentenoic acide
Esters	Benzyl cinnamate Benzyl benzoate
Alcool, terpènes, quinone	Chrysophanol 4,5-Dimethoxy-2-phenol ∞ -Bisabolol 4-Vinylphenol 2-Methoxy-4-vinylphenol
Autres	2-Nonadecanone 2-Propen-1-one 4H-1-Benzopyrane-4-one 1-Methyl-4-azailuorenone >Nonadecane, Heneicosane, Eicosane Docosane 2,5 Diethyl-3,6-dimelpyrazine Vanilin

L'origine botanique dont sera la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique. Les autres facteurs seront les modifications générées à travers les sécrétions hypopharyngiennes de l'abeille qui vont apporter d'autres éléments spécifiques en plus de certaines transformations (hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycone) (Marcucci, 1995 ; Viuda-Martos et al., 2008).

Les constituants de la propolis du point de vue de l'activité pharmacologique sont :

- Les flavons, les flavols, et les flavonones, communément appelés les **flavonoïdes** ;
- Les **phénols** (Antiseptiques) ;
- Les **substances aromatiques** : vanilline et isovanilline (principes odorants de la vanille).

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la pigmentation des plantes. On dénombre dans la propolis pas moins de 60 flavonoïdes, comme la galanine, le kaempférol, la quercétine, la pinostrobine et la pinobansine (**Agra et al., 2006 ; Kumazaw et al., 2004**).

Ce nombre important de flavonoïdes fait de la propolis une substance aux multiples propriétés biologiques (anti oxydante, anti inflammatoire, etc.) (**Pietta et al., 2002 ; Velikova et al., 2000**).

Les phénols se trouvant dans la propolis sont principalement : l'acide caféique (au fort pouvoir anti oxydant), l'acide cinnamique (antiseptique, et antifongique), l'acide et l'alcool benzoïque, ainsi que l'acide férulique (puissant anti oxydant et anti inflammatoire).

La composition chimique de la propolis est très variable et complexe, à cause de la biodiversité de la végétation de chaque région visitée par les abeilles ou elles collectent cette substance (**Khayyal et al., 1993 ; Szliszka et al., 2009**).

Ainsi, par exemple, la propolis de nouvelle Zélande contient jusqu'à 70% de pinobanksine et de pinocembrine, alors que celle de Chine, du Brésil et de l'Uruguay montre 10 à 50% de dihydroflavonoïdes ; quant à celle de Cuba, elle ne possède pas de flavonoïdes et elle aurait donc peu d'effets biologiques (**Bankova, 2005 ; Katircioglu et Mercan, 2006**).

Par conséquent, la composition de la propolis sur les différentes zones phytogéographiques devrait varier et de ce fait, l'intensité ou la présence de certaines activités biologiques varie également (**Katircioglu et Mercan, 2006 ; Mohammadzadeh et al., 2007**).

Même au sein du même pays, la composition de la propolis peut être qualitativement et quantitativement différente en fonction de la région et la période de sa collection (**Koo et al., 2000**).

Au Brésil, certains auteurs ont rapporté que la propolis issues des régions distinctes à été chimiquement classée en 12 catégories (**Park et al., 2002**).

La cire d'abeille, se trouvent dans la propolis affecte généralement sa composition chimique. Plus il ya de cire, moins la propolis est bonne. La couleur joue peu, mais on constate que les propolis jaunes ont une meilleure efficacité thérapeutique (**Kumazawa et al., 2004**).

Discussion : La composition de la propolis est donc d'une incroyable richesse en éléments biologiques mais, de ce fait même, extrêmement complexe. Il faudra certainement encore de nombreuses années de recherches analytiques pour en avoir une connaissance absolument parfaite et établir de façon constante, quelle que soit son origine botanique, sans qu'il soit certain, d'ailleurs, qu'une telle systématisation soit possible (**Donadieu, 2008**).

6. Utilisation dans la ruche

Les abeilles utilisent la propolis de deux façons différentes :

- Mastic servant à colmater les cavités ou à fixer les pièces mobiles (cadres, corps, hausses (magasins à miel), etc.) ;
- Couche antiseptique mince et uniforme qui tapisse toute la ruche (parois, alvéoles, cadres, etc.). tout ce qui est en contact avec l'abeille est recouvert de cette substance. Les ennemis tués dans la ruche, sont enduits de propolis (momifiés) s'ils sont trop importants pour être évacués par les abeilles (**Ghisalberti, 1979 ; Prost, 1979**).

7. Conservation de la propolis

La propolis est un produit facile à conserver, quelque que soit la forme sous laquelle elle se présente. Il est toutefois préalable de le conserver dans des récipients hermétiques, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur. Pour bénéficier de toutes ses propriétés, il est recommandé d'utiliser la propolis aussi fraîche que possible (**Philippe, 1994**).

Elle présente un intérêt certain sous forme lyophilisée, car ce procédé de conservation assure, pendant un temps presque illimité, le maintien de toutes ses propriétés et de la composition chimique du produit. Une première méthode de lyophilisation, brevetée aux Etats Unis, propose une solution hydro-alcoolique de propolis évaporée sous vide à basse température (**Philippe, 1994**).

Une seconde méthode utilisée en Roumanie, propose une préparation préliminaire d'extrait mou de propolis par dissolution d'alcool éthylique. Cet extrait mou de propolis est ensuite dissout par le biais de solvants à groupe amino (amines organiques.) la solution résultante est filtrée et les résidus de cire sont éliminés par précipitation. Elle devient alors soluble

à l'eau et cette solution aqueuse peut être lyophilisée sous vide et congelée (Philippe, 1994).

8. Propriétés thérapeutiques

8.1. Effets biologiques

La propolis est utilisée par l'Homme sur le plan médical depuis des millénaires. Depuis une cinquantaine d'années, la littérature scientifique a rapporté et confirmé de bon nombre de propriétés thérapeutiques intéressantes de ce produit de la ruche (Banskota et al., 2001 ; Burdock, 1998 ; Isala et al., 2001 ; Khalil, 2006).

Malgré des différences de composition entre les propolis, un certain nombre d'activités pharmacologiques et/ou d'effets biologiques communs font consensus.

8.1.1. Effets antimicrobien

Les activités antimicrobiennes de la propolis sont bien documentées contre différents microorganismes :

- Bactéries (Koo et al., 2002 ; Lu et al., 2005 ; Pavlonis et al., 2008 ; Onlen et al., 2007 ; Uzel et al., 2005) ;
- Virus (Gekker et al., 2005 ; Kujumgiev et al., 1999 ; Maichuk et al., 1995 ; Schitler et al., 2010) ;
- Levures (Kujumgiev et al., 1999 ; Oliveira et al., 2006 ; Suzuki et al., 2002 ; Cushnie et Lamb, 2005) ;
- Parasites (Abde1-Fattah et Nada, 2007 ; Decastro et Higashi, 1995 ; Machado et al., 2007 ; Xubu et Shimz, 2006).

In vitro, la propolis peut agir directement sur les microorganismes, et *in vivo*, elle peut stimuler le système immunitaire en activant les mécanismes impliqués dans la lutte de ces microorganismes (Sforcin et Bankova, 2011). En effet, c'est grâce à son activité antimicrobienne très intense que la propolis est connue sous le nom d'Antibiotique naturel. (Jdaragic-Ibricevic, 1983).

8.1.2. Effet antibactérien

L'activité bactéricide de la propolis et/ou de ses constituants est la plus largement documentée. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et

Gram- (de type anaérobie et aérobie) mais avec une plus grande efficacité sur les souches Gram+ (Koo et al., 2000 ; Koo et al., 2000 ; Krol et al., 1993).

Parmi les bactéries inhibées, on trouve des *Staphylococcus aureus* (Krol et al., 1993 ; Lu et al., 2005) , des *Streptococcus mutans* (Koo et al., 2002), des Bacilles (*cereus* et *subtilis*) (Parolia et al., 2010), des *Pseudomonas* (Onlen et al., 2017), des *Lesteria* (Yang et al., 2006), des *Salmonella* (Uzel et al., 2005), des *Clostridium*, des Pyogènes, *Escherichia coli* et *faecalis* et *Helicobacter pylori* (Banskota et al., 2001 ; Boyanova et al., 2003 ; Coelho et al., 2007), autant de souches qui sont impliquées dans les troubles des sphères otorhinopharyngées, gastro-intestinale, génitale ou buccale (Krol et al., 1993 ; Samet et al., 2007 ; Santos et al., 2008).

En se référant aux travaux de Krol W. et Coll (1993), ils préconisent l'utilisation de l'extrait éthanolique de propolis à coté des antibiotiques contre le *Staphylocoque doré* :

Bactérie Gram+ pathogène pour l'Homme (Krol et al., 1993).

Le mécanisme de l'activité antibactérienne de la propolis n'a pas été complètement élucidé. Apparemment, il serait associé à une action synergique de composés (Liberio et al., 2009).

A cet égard, les différentes études mécanistiques suggèrent que la propolis et/ou ses composés pourraient inhiber la croissance bactérienne par blocage de la division cellulaire, par une désorganisation du cytoplasme, par une inhibition de la synthèse protéique ou par inhibition du processus d'adhésion (Farooqui T et Farooqui A, 2010 ; Scazzocchio, 2006). Certaines études ont montré que des souches résistantes, voire multirésistantes aux antibiotiques, étaient sensibles à la propolis (Raghukumar et al., 2010).

Selon Koo H et Coll. (2000) (Koo et al., 2000), la propolis comparée à d'autres produits comme l'Arnica, démontre une activité antimicrobienne beaucoup plus développée avec une large zone d'inhibition des actinomyces. Ces bacilles Gram+ sont des saprophytes habituels de la cavité buccale, retrouvés dans la salive, sur la langue et dans les sillons gingivo-dentaires. Il a également été montré que la propolis, lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques, augmente leur efficacité (streptomycine, ampicilline, gentamycine, cloxacilline...) (Fernandes et al., 2005 ; Sforcin et Bankova, 2011 ; Speciale et al., 2006 ; Stepanovic et al., 2003).

Bien que les propriétés antimicrobiennes de la propolis aient fait l'objet de nombreuses recherches, il est cependant difficile de comparer les résultats de différentes études, en raison de la composition très hétérogène des propolis et/ou les diverses méthodes utilisées pour l'évaluation des activités antibactériennes de ce produit de la ruche (**Sforcin et Bankova, 2011**).

8.1.3. Effet antiviral

L'action de la propolis contre les virus est bien démontrée et ce notamment grâce aux flavonoïdes. Cette activité antivirale a été fortement documentée.

En effet, les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus, HSV et adénovirus. (**Gekker et al., 2005 ; Kujumgiev et al., 1999 ; Maichuk et al., 1995 ; Schnitzler et al., 2010**).

On peut expliquer cette action par la présence de certains composants comme :

- Les naphthoquinones ;
- Les sesquiterpènes ;
- Les esters de l'acide caféique.

De plus, la propolis et certains de ses constituants (apigénine, chrysin) possèdent un effet prophylactique contre le virus de la grippe, en atténuant les symptômes à travers une action antineuraminidase (**Liu et al., 2008 ; Shimizu et al., 2008**).

La propolis de peupliers et l'un de ses principaux composés, l'ester phényléthylique d'acide caféique, ont un potentiel anti HIV (comme agent anti-intégrase du virus) (**Burke et al., 1995**). et un effet additif avec l'AZT (inhibiteur de la transcriptase reverse) (**Gekker et al., 2005**). Des crèmes à base de propolis se sont avérées efficaces pour les durées des lésions, les douleurs et augmenter les intervalles entre deux épisodes d'herpès labial et génital (**Vynograd et al., 2000**).

8.1.4. Effet antifongique

Les effets antimycosiques de la propolis résultent de l'activité de substances multiples telles que : la Galangine, le Kaempférol, la Pinocembrine et l'acide caféique.

Cette activité s'exerce sur plusieurs espèces de champignons parasites générateurs de mycoses, notamment :

- Le genre *Candida* et, plus particulièrement, le *Candida albicans* ;
- Le *Trichophyton* ;
- Les *Microsporum Canis* (Dobrowski et al., 1991).

Comme substance modulatrice de la réponse biologique, la propolis stimulerait en effet le système immunitaire en favorisant un nombre élevé de macrophages, très actifs dans l'éradication de ces espèces. Elle trouve donc son intérêt dans les mycoses de la peau, des muqueuses ORL, du vagin ou encore les infections causées par *Monilia albicans* au niveau du tube digestif chez le nourrisson.

Les résultats de récentes études *in vitro* (Kujungiev et al., 1999 ; Oliveira et al., 2006 ; Suzuki et al., 2002 ; Cushnie et Lamb, 2005). Indiquent que la propolis possède une action antimycosique comparable à celle de l'itraconazole antifongique de synthèse utilisée actuellement en thérapeutique médicale contre :

- Les mycoses superficielles (Kératites et dermatophytes cutanées) ;
- Les mycoses exotiques (chromocytose et histoplasmose) ;
- Les infections systémiques comme l'aspergillose, ce médicament étant efficace sur pratiquement toutes les familles de champignons.

Une autre études *in vitro* à montré un effet coopératif de la propolis pour lutter contre une souche mycosique (*Paracoccidioides brasiliensis*) d'Amérique du sud en stimulant l'activité fongicide macrophages (Murad et al., 2002).

8.1.5. Effet antiparasitaire

Selon certaines études (**Abdel-Fattah et Nada, 2007** ; **Decastro et Higashi, 1995** ; **Machado et al., 2007** ; **Xu et Shi, 2006**), la propolis serait efficace contre la plupart des parasites répandus essentiellement dans les pays tropicaux, tels que :

- Les *Tricochomonas* → Tricomonose uro-génitale ; (**Xu et Shi, 2006**) ;
- Le *Trypanosoma cruzi* → Maladie de chagas ou trypanosomiase américaine ; (**Decastro et Higashi, 1995**) ;
- Les *Leshmania* → Leishmaniose ; (**Machado et al., 2007**) ;
- Le *Gardia lamblia* → Lambliose ou parasitose intestinale humaine (**Abdel-Fattah et Nada, 2007**).

Dans plus, il à été démontré qu'elle aurait une action inhibitrice contre le *Toxoplasma gondii*, connu pour être l'agent responsable de la toxoplasmose (**Dobrowski et al., 1991**). Ce dernier est particulièrement redoutable chez la femme enceinte à cause des atteintes fœtales (lésions cérébrales et oculaires, notamment) qu'elle peut causer.

Consommer de la propolis durant la grossesse peut donc s'avérer utile, car il n'existe malheureusement pas de vaccin contre la toxoplasmose et le risque pour l'enfant à naitre est réel. En effet, la propolis inhiberait la croissance du parasite en y empêchent la synthèse protéique et par là en bloquant sa multiplication (**Wright et Philipson, 1990**).

8.1.6. Effet anticancéreux

Les propriétés anti-carcinogènes de la propolis et plus particulièrement des flavonoïdes (dont la quercétine) ont été signalées dans de nombreux travaux scientifiques réalisés sur l'animal (**Banskota et al., 2002** ; **El khawaga et al., 2003** ; **Huleihel et Ishano, 2004** ; **Rao et al., 1993** ; **Russo et al., 2004** ; **Suzuki et al., 2002**).

Toutefois, cette protection ne se limite pas aux seuls flavonoïdes. Des chercheurs sur des souches cellulaires de culture, porteuses de tumeurs cancéreuses, ont aussi permis d'identifier un dérivé de l'acide caféique connu sous le nom de (*caffeic acid phenethyl ester* → ester phényléthylique de l'acide caféique, CAPE) comme un inhibiteur du processus tumoral. On estime actuellement qu'environ 70% des cancers sont dépendants de la voie de signalisation (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1* → enzyme codée par le gène PAK1, PAK₁) pour leur croissance. Diverses études ont montré que l'extrait

alcoolique de propolis et/ou ses principaux constituants étaient capables d'inhiber la voie de signalisation PAK₁ en modulant l'expression et/ou l'activité d'un certain nombre de facteurs impliqués dans cette voie de signalisation telle que GTPase Rac. Dans la grande majorité des cas, l'effet antiprolifératif résulte d'une restauration du signal d'apoptose (Avci et al., 2011 ;Huang et al., 2007 ; Kampa et al., 2004 ; Szliszka et al., 2009 ; Watabe et al., 2004). Les différentes molécules de la propolis vont pouvoir agir à différents endroits pour induire l'apoptose soit par la voie intrinsèque, via la libération du cytochrome C mitochondrial, soit par la voie extrinsèque, via l'induction de ligands (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*, TRAIL), de protéines pro-apoptotiques (bax, bak), des caspases, des protéines p21 et p53 et l'inhibition des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bc-xl) (Popolo et al., 2011). L'effet antiprolifératif peut également, selon les lignées considérées, résulter d'un arrêt du cycle cellulaire par inhibition des cyclines ou par blocage des récepteurs hormonaux (Weng et al., 2007).

La propolis exerce également, entre autres via le CAPE, des effets biologiques bénéfiques sur le système immunitaire. C'est particulièrement vrai pour les macrophages et pour les défenses contre les métastases cancéreuses. Son effet immunomodulateur expliquerait aussi l'action de l'extrait aqueux de la propolis observable dans le traitement de l'asthme. Enfin, son efficacité a également été mise à l'épreuve, avec succès, dans l'étude du cancer du sein et dans certaines formes de leucémie.

Des agents cytotoxiques (qui attaquent spécifiquement les cellules cancéreuses) naturels de la propolis, le diterpénoïde du Clerodane et l'Artepilline C, ont permis d'obtenir d'excellents résultats sur la croissance de tumeurs malignes. C'est notamment le cas du diterpénoïde du Clerodane dans le traitement du cancer de l'utérus (action antivirale) et le cancer du foie. Des récentes études ont également montré que le CAPE pouvait inhiber la prolifération de lignées d'hépatocarcinomes (Hep3B et SK-Hep1) à travers une inhibition de l'activité des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, responsables de la dégradation de la membrane (Chung et al., 2004).

La propolis par sa richesse en « défenseurs » naturels s'érige donc naturellement comme l'avocate d'une meilleure compréhension du cancer et de son traitement. Cela est dû à sa propriété de type BRM (*modificateur de la Réponse Biologique*) (El khawaga et al., 2003 ; Huleihel et Ishano, 2004 ; Rao et al., 1993 ;Russo et al., 2004 ; Suzuki et al., 2002).

8.1.7. Effet anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de la propolis est dose-dépendant. Son mécanisme est sensiblement proche de celui de l'aspirine. Les extraits aqueux montrent de meilleurs résultats et de nombreux flavonoïdes y coopèrent certainement (**Borrelli et al., 2002**).

Cet effet est dû à son action inhibitrice (principalement celle des flavonoïdes qu'elle contient) sur la prostaglandine synthétase, empêchant ainsi la synthèse des prostaglandines, composants responsables de la réaction inflammatoire (**Khayyal et al., 1993 ; Menezes et Al meida, 2002 ; Metzner et al., 1982**).

Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés : inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (**IL-6**) et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxidase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase) (**Khayyal et al., 1993**). Le CAPE s'est révélé être le plus puissant modulateur du métabolisme de l'acide arachidonique à la base de la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines pro-inflammatoires (**Rossi et al., 2002**).

La cire de la propolis provenant des résidus solides de la fabrication des teintures de propolis, possède encore des constituants actifs. Son utilisation sous forme de cataplasme donne de très bons résultats (**Menezes et Al meida, 2002 ; Metzner et al., 1982**).

L'extrait éthanolique de la propolis rouge de Cuba a prouvé ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et anti-psoriasiques sur les rats (**Mirzoeva et Calder, 1996**).

8.1.8. Effet antioxydant

La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants : vitamines E et C et des polyphénols (**Ahn et al., 2004 ; Gomez et al., 2007**). L'activité antioxydante et du '*free radicals scavenger*' (capteur de radicaux libres) de la propolis est régie, sans partage ou presque, par les quarante flavonoïdes qui la constituent, ce qui en fait un des aliments les plus riches en cas composés, après le thé (**Kandaswam et Middleton, 1994**).

Son action favorable a été démontrée dans les affections hépatiques où les flavonoïdes s'opposent à l'oxydation des lipides. En effet, les lipides se transforment par oxydation en peroxydes toxiques (des radicaux libres), très agressifs au niveau de l'organisme et responsables de toute une série de réactions nocives (**Shinohara et al., 2002**).

Les études ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec son contenu en polyphénols (**Gregoris et Stevanato, 2010**). De ce fait, la propolis de peupliers plus riche en polyphénols possède un potentiel antioxydant supérieur à celui de la propolis verte du Brésil. Dans le même esprit, on trouve que la valeur ORAC (capacité d'absorption des radicaux oxygènes) d'une résine pure et entière de propolis est supérieure à celle de ses différentes sous-fractions organiques.

In vivo, la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différentes organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes antioxydantes (catalase, superoxide dismutase, glutathion peroxydase) (**Okutan et al., 2005 ; Sobocanec et al., 2006**). Le CAPE est le composé présentant le meilleur pouvoir antioxydant (**Farooqui Tet Farooqui A; 2010**). L'effet positif de la propolis à encore été mis en évidence dans le traitement de la cataracte et dans la protection du *Low density lipoprotein* (LDL-cholestérol) contre la peroxydation. Or, on sait que l'oxydation des LDL favorise l'artériosclérose. On peut donc considérer que la propolis joue un rôle dans la prévention de cette dégénérescence (**Isala et al., 2001 ; Volpert et Elstner, 1993**).

8.1.9. Effet antiangiogénique

L'action antiulcéreuse de la propolis à été largement discutée, mais grâce à de nombreuses études chimiques, son activité antiulcéreuse est aujourd'hui évidente.

Boyanova L (**Boyanova et al., 2003**), à démontré qu'un volume de 90µl d'extrait éthanolique de propolis (EEP) bulgare de 30%, possède un effet inhibiteur sur les souches d'*Helicobacter pylori* supérieur à 15 mm (environ 90%) contre 52,6% d' *Helicobacter pylori* inhibée pour un volume de 30µl d'EEP. De plus, en comparaison à l'éthanol (groupe contrôle), l'EEP à été significativement plus actif contre cette bactérie très commune (trouvée chez 50% des humains) et responsable de 80% des ulcères gastroduodénaux (**Boyanova et al., 2003**).

L'éradication de *Helicobacter pylori* s'avère parfois difficile car elle développe une résistance à la Clarithromycine et au Métronidazole, les deux principaux antibiotiques utilisés dans la thérapie de l'ulcère. Certains auteurs insistent à ce que la propolis soit présente comme traitement adjuvant des antibiotiques pour bénéficier de ses propriétés anti-inflammatoires et régénératives des tissus (**Banskota et al., 2001 ; Boyanova et al., 2003 ; Megraud, 2000**).

Les travaux de Barros et coll (**Barros et al., 2008 ; Barros et al., 2007**), ont rapporté l'effet 'protecteur gastrique' de la propolis. Ils ont décrit les propriétés antiulcérogènes des principaux acides phénoliques de la propolis Brésilienne (50 et 250mg/kg), dans différents modèles : anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) → ulcère ; éthanol → ulcère ; stress → ulcère ; attestant que les acides caféique, férulique *p*-coumarique et cinnamique affichent une activité antiulcéreuse.

Massignani et coll. (2009) (**Massignani et al., 2009**), ont étudié les effets de l'huile essentielle (50, 250 et 500 mg/kg) obtenue à partir de *Baccharis dracunculifolia*- la plus importante source botanique de la propolis verte du Brésil- sur les ulcères gastriques, ce qui suggère qu'elle pourrait probablement être un bon agent thérapeutique pour le développement de nouveaux médicaments phytothérapeutiques pour le traitement de ces types d'affections.

8.1.10. Effet cicatrisant

Les vertus cicatrisantes de la propolis sont connues depuis l'antiquité. Utilisé au cours des âges, la propolis a démontré qu'elle possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire épidermique, les vaisseaux du collagène grâce à un phénomène de stimulation fibroblastique (**Almas et al., 2001 ; Arvouet et al., 1993 ; Duraffoud et Laparaz, 2002**).

En effet, la propolis accélère la régénération de différents tissus abîmés : c'est le cas notamment de la pulpe dentaire, des tissus hépatiques ou du tissu osseux, comme l'ont suggéré des études réalisées sur l'animal (**Bankova et al., 2000 ; Jdaragic-bricevih, 1983**).

Ces actions sont dues à l'activité antioxydante des flavonoïdes qui piègent les radicaux libres ainsi qu'à des acides phénoliques et certains acides aminés comme la choline (dans la division donc le renouvellement cellulaire) ou la proline (dans la synthèse de collagène, de l'élastine et de facteurs intervenant dans l'élasticité de la peau) (**Blanc, 2010**).

8.1.11. Effet anesthésique local

L'action anesthésique de la propolis est très curieuse. Une expérience très simple la prouve, qui consiste à appliquer à l'aide d'une boulette de coton de la teinture mère de propolis à un endroit quelconque de la muqueuse buccale. On obtient en quelques minutes une anesthésie comparable à n'importe quel anesthésique de contact utilisé couramment en

chirurgie dentaire (**Castaldo et Capasso, 2002**). Cette action est vraisemblablement liée à l'activité des huiles volatiles de la propolis, mais est indépendante d'un mécanisme central, comme pour la morphine. La propolis, par son activité immunomodulatrice, est indiquée contre piqûre d'insectes, ce qui pourrait expliquer la relative immunité des apiculteurs (**Castaldo et Capasso, 2002 ; Ghisalberti, 1979**). Les anesthésiques largement utilisés en application locale (la cocaïne, par exemple) présentent un inconvénient essentiel : ils sont fortement toxiques. Les cas où l'anesthésie avec cocaïne est suivie d'un collapsus ou d'une perte de connaissance ne sont pas rares (**Castaldo et Capasso, 2002**). La propolis avec ses composants est un très anesthésique, et des études ont démontré que cette résine est 3 fois plus anesthésiante que la cocaïne et 52 fois plus puissante que la procaine dans les tests sur les cornées de lapin (**Ghisalberti, 1979**). L'effet anesthésique est dû à la pinocembrine, à l'acide caféique, et aux composés des esters de la propolis (**Ghisalberti, 1979**).

8.1.12. Autres effets

La propolis possède une action immunomodulatrice *in vitro* et *in vivo* sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise (**Prsatti et al., 2010 ; Orsi et al., 2006**). Elle stimule le pouvoir de présentation des macrophages, l'activité lytique des macrophages et des *Natural killer* contre les cellules tumorales. Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoire (TNF- α , IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (**Orsi et al., 2000 ; Sforcin, 2007**).

Il a également été démontré que la propolis exerçait une activité antiallergique. La prise de propolis réduit les éternuements et irritations dans le cas de rhinite allergique par inhibition de la libération d'histamine (**Shinmei et al., 2009**). La prise orale quotidienne de propolis pendant deux mois a permis une réduction du nombre et de la sévérité des crises nocturnes et une amélioration des fonctions ventilatoires chez des patients souffrant d'asthme. En parallèle, ces auteurs ont constaté une diminution des prostaglandines, des leucotriènes et des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation des cytokines anti-inflammatoires chez ces patients (**Khayyal et al. 2003**).

La propolis montre un effet préventif contre les neutropénies, anémies et thrombopénies consécutives aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie (**Benkovic et al., 2009 ; Lahouel et Fillastre, 2004 ; Montoro et al., 2011 ; Suzuki et al., 2002**).

Ces traitements anticancéreux sont particulièrement toxiques envers certains organes (foies, cœur, rein, neurone). Des études *in-vitro* et *in-vivo* ont là aussi montré un effet protecteur de la propolis contre ces agents chimiques (**Alyane et al., 2008 ; Benguedouar et al., 2008 ; Chopra et al., 1995**). Ces effets passent en partie par les propriétés antioxydantes de la propolis qui va protéger les cellules, contribuer au mécanisme de réparation de l'ADN et au mécanisme de défense endogène (surexpression des enzymes antioxydantes, maintien du glutathion intracellulaire).

Une étude également montrée que la propolis pouvait prévenir l'insulinorésistance induite chez l'animal (**Elsayed et al., 2009**). Cet effet passerait par une modulation du métabolisme des lipides et du glucose, une inhibition de la production d'IL-1 β et de l'activité de la NO synthase (protéine enzymatique qui synthétise l'oxyde nitrique, un radical libre présent dans la circulation sanguine).

Matériels et Méthodes

1. Objectif du travail

Ce travail à été réalisé dans les laboratoires de la Faculté des Sciences, Département de Biologie. Université de Saida-Dr MOULAY Tahar. L'objectif de notre étude est d'évaluer les effets antioxydants et antibactériens de la propolis contre des souches pathogènes issues d'un tissu mammaire infecté. La propolis à été choisi parmi d'autres pour son caractère médical, sa grande utilisation par la population et ses vertus thérapeutiques intéressantes.

2. Préparation de l'extrait hydro-alcoolique de propolis

L'extrait hydro-alcoolique de propolis à été préparé selon la méthode décrite par (Mohdaly et al., 2015). Pour cela, dix gramme (10g) de propolis séchée et broyée, achetée chez un apiculteur local dans la wilaya de Saida, sont macérés pendant 24H dans 100 ml d'éthanol 70%. Une fois la macération finie, la solution obtenue est filtrée avec du papier filtre (Whatman N °1) et centrifugée à 5000 tr/min pendant 10 min, les surnageants sont ensuite concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (heidolphlaborota 4000), et le résidu obtenu est stocké au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation ultérieure (figure 10).

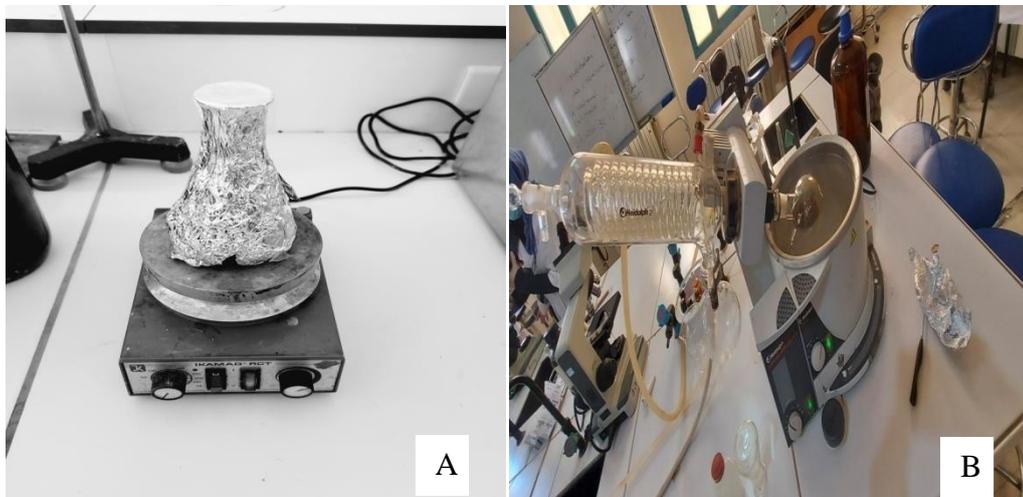


Figure 10 : (A) Procédure d'extraction par macération; (B) Concentration à sec par évaporateur rotatif.

3. Calcule du rendement

Le rendement (R) à été calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{Masse du ballon rempli (g)} - \text{Masse du ballon vidé (g)}}{\text{Masse de la matière première utilisée (g)}} \times 100$$

4. Dosage des métabolites secondaires

4.1. Dosage de la teneur en polyphenols totaux (TPT)

La TPT de l'extrait de propolis à été estimée par spectrométrie selon la méthode du Folin-Ciocalteu (FC) adopté par (Afroz, Tanvir et al. 2014). Brièvement, une aliquote de la fraction d'échantillon diluée à été ajoutée à 0,5 ml d'eau distillée et à 0,125 ml de réactif de FC. Le mélange est ensuite agité et incubé pendant 6 min, avant d'ajouter 1,25 ml de Na₂CO₃ (7%). La solution est ensuite ajustée avec d'eau distillée jusqu'à un volume final de 3 ml. Après incubation dans l'obscurité (30 min), l'absorbance est lue à 760 nm par rapport à un blanc préparé (figure 11).

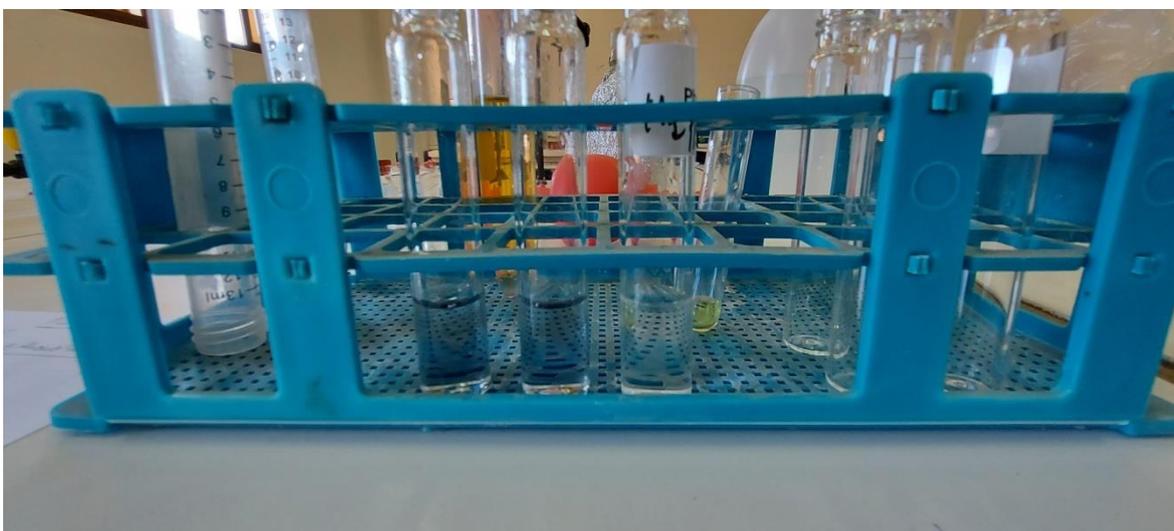


Figure 11 : Dosage de la teneur en polyphenols totaux (TPT) par la méthode FC.

4.2. Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT)

Tout d'abord, 100 μ l de l'extrait (1 mg / ml) est mélangé avec 0,3 ml de nitrite de sodium à 5%. Après environ 5 min, 0,3 ml d' AlCl_3 à 10% sont ajoutés. Puis, après 6 min, 2 ml supplémentaires d'hydroxyde de sodium 1M (NaOH) sont ajoutés. La solution est ensuite ajustée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 2.5 ml. L'intensité de la couleur du complexe flavonoïde-aluminium a été mesurée à 510 nm (**figure 12**).

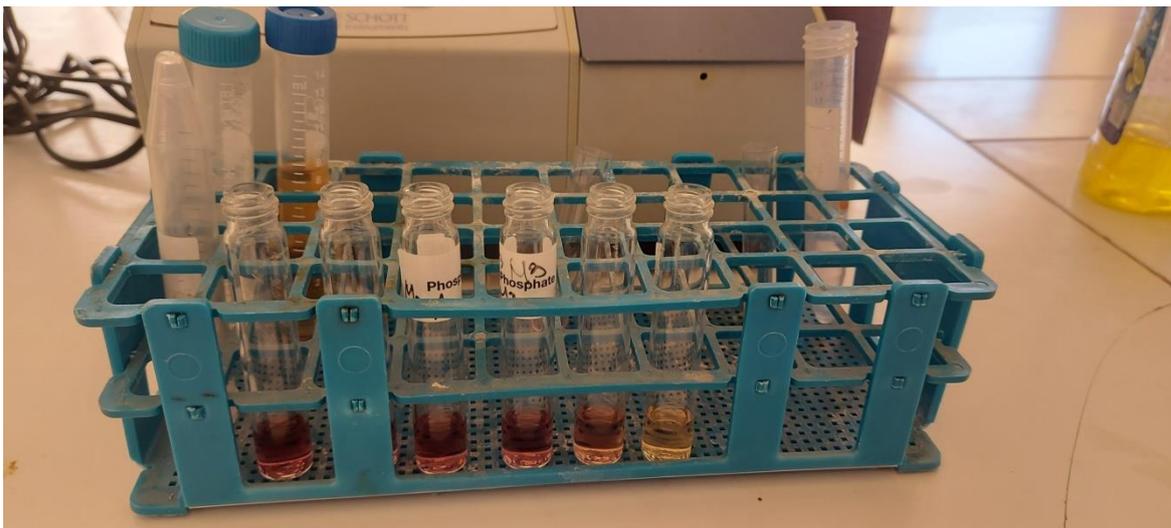


Figure 12 : Dosage de la teneur en flavonoïdes totaux (TFT) par la méthode de complexation des flavonoïdes à Aluminium.

5. Evaluation des activités biologiques

5.1. L'activité de piégeage des radicaux DPPH

Ce test est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante d'extraits bruts ou de composés purifiés de plantes. Le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une molécule stable soluble dans le méthanol, caractérisée par sa couleur violet foncé avec un maximum d'absorption à 515 nm. Les antioxydants (AH) ou d'autres espèces radicalaires sont capables de réagir avec ce radical stable en lui fournissant un électron ou un atome d'hydrogène, le réduisant ainsi en 2,2-diphényl-1-hydrazine (DPPH-H) ou en une hydrazine analogue substituée (DPPH-R) caractérisée par une couleur incolore ou jaune pâle qui peut être facilement suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (**Njoya , 2021**), (**figure 13**).



Figure 13 : Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode piégeage du radical DPPH.

6. Evaluation des activités antibactériennes

6.1. Souches bactériennes testées

Les deux (2) espèces bactériennes utilisées dans notre travail sont des souches disponibles au sein de notre laboratoire (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Espèces bactériennes testées.

Espèce à Gram positif	Espèce à Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922

Ces espèces bactériennes ont été choisi parce qu'elles représentent les espèces à Gram positif et à Gram négatif, les plus réponsues dans les infections mammaires et qui présentent une forte résistance aux ATBs.

6.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum à été préparé en cultivant les microorganismes (*Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli*) dans une gélose nutritive à 37°C pendant 12 heures et une concentration d'environ $1,5 \times 10^8$ unités formant colonies (UFC/ml) à été utilisée pour l'analyse antibactérienne (aromatogramme et antibiogramme) (**Hayouni et al. 2007**).

6.3. Activité antibactérienne

La méthode de diffusion en puits d'agar à été réalisée en étalant chaque suspension bactérienne sur la surface de plaques d'agar de Mueller-Hinton contenant quatre puits de 6 mm de diamètre. Les puits ont été remplis avec environ 30 µl de chacune des concentrations d'extraits utilisées (625, 1250, 2500, 5000 µg/ml). L'éthanol à été utilisé comme test de contrôle. Tandis que l'antibiogramme à été effectué en utilisant des ATBs commerciaux (Gentamicine, Cefazolin, Cefotaxime, et Acide Pipemidique) de 6 mm de diamètre déposés dans les boîtes de Pétri préalablement préparées. Les boîtes pétris ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les résultats ont été exprimés en termes de diamètre (mm) de la zone d'inhibition (**Kaushik et al. 2010**).

Résultats et Discussions

1 . Résultats

1.1. Résultats du rendement d'extraction, et du dosage des métabolites secondaires

Comme le montre le tableau 05, l'extraction hydroalcoolique de la propolis par la méthode de macération nous à permis de calculer le rendement d'extraction (18,2%) exprimé en pourcentage du résidu sec par rapport au poids initial. Le contenu en polyphenols totaux à été déterminé comme équivalent d'acide gallique en milligramme par gramme de résidu sec ($113,65 \pm 2,41$ mg AGE/g RS), alors que le contenu en flavonoïdes totaux à été calculé en équivalence de catéchine en milligramme par gramme de résidu sec ($0,072 \pm 0,039$ mg CE/g RS). (Figure 14 et 15).

Tableau 05: Résultats du rendement d'extraction, des teneurs des polyphenols totaux ET flavonoïdes totaux.

Paramètres	Rendement d'extraction (%)	Polyphenols (mg AGE/g RS)	Flavonoïdes (mg CE/g RS)
Propolis	18,2%	$113,65 \pm 2,41$	$0,072 \pm 0,039$

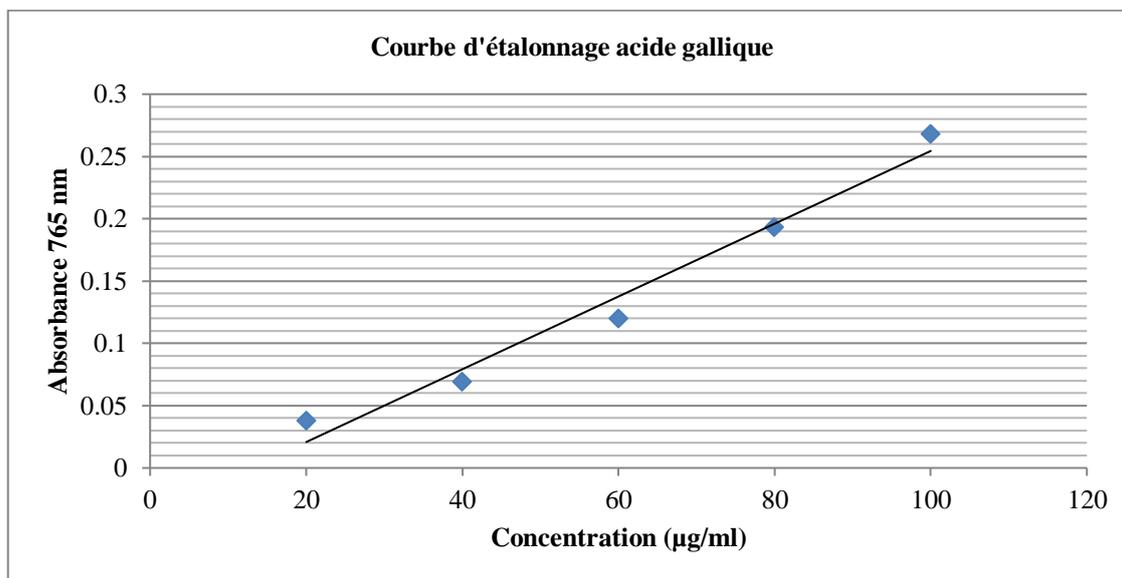


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

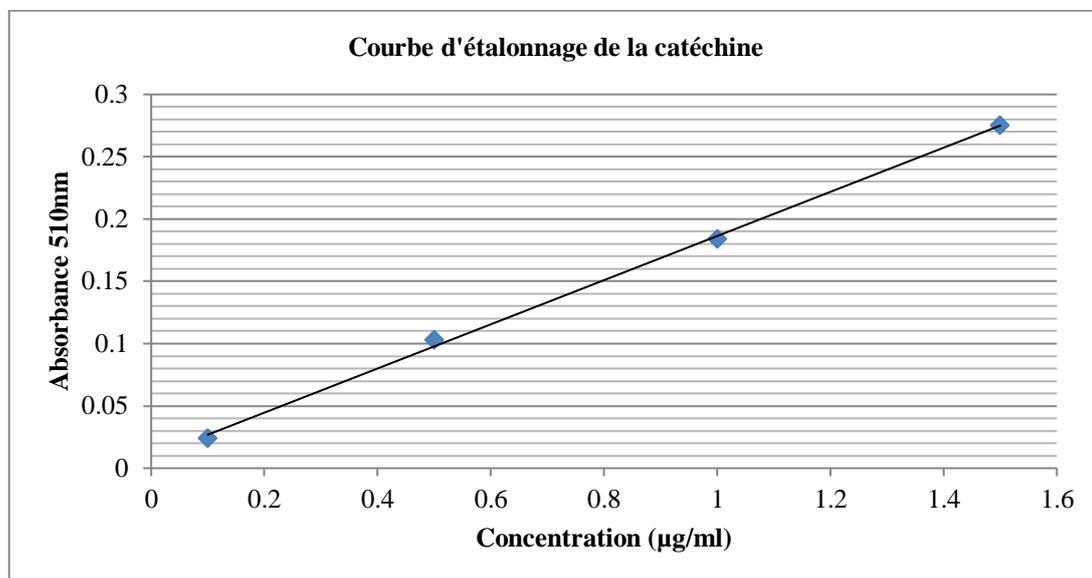


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

1.2. Résultats de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait de propolis contre le radical DPPH a été mesurée en suivant la réduction de ce radical, qui s'accompagne du passage de la couleur violette (DPPH-) à la couleur jaune (DPPH-H) à 515 nm. Ainsi, l'extrait hydroéthanolique de propolis a une capacité significative à piéger le radical DPPH, comme le montre la figure 16, avec une concentration inhibitrice de $IC_{50}=2,95$ mg/ml.

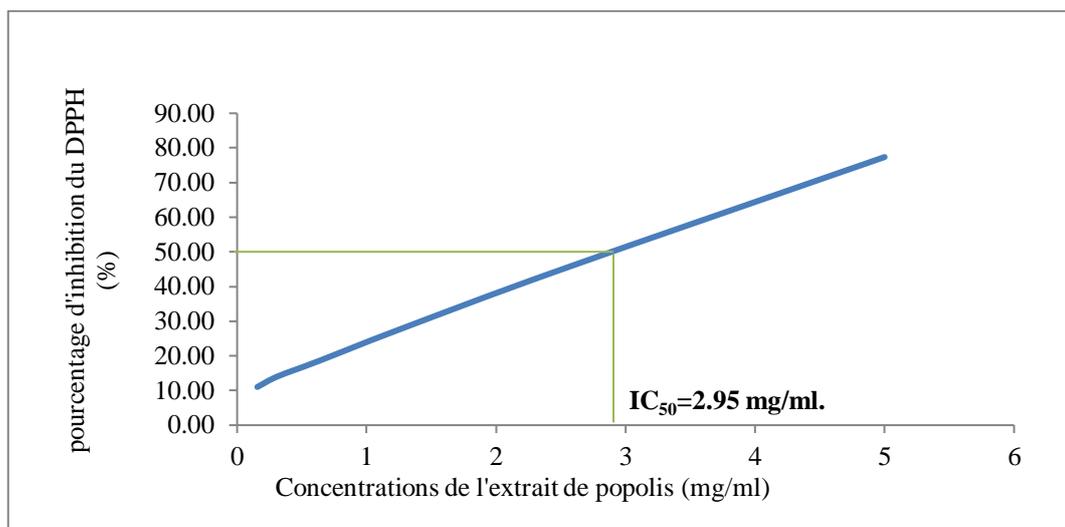


Figure 16 : Résultats de l'activité antioxydante par inhibition du DPPH.

1.3. Résultats de l'activité antibactérienne

Les figures 17, 18 et 19 reflètent les résultats des tests d'inhibition effectués par diffusion sur gélose (méthode de puits) et par méthode des disques d'antibiotiques. L'interprétation des résultats a montré une forte activité antibactérienne de l'extrait de propolis à la concentration de 5000 $\mu\text{g/ml}$ avec des zones d'inhibition de $22,50 \pm 1,67$ mm et $25,50 \pm 0,50$ mm contre *E. coli*, et *S. aureus* respectivement. Aux deux concentrations de 2500 et 1250 $\mu\text{g/ml}$, l'extrait a montré la même activité avec des zones d'inhibition de $20,50 \pm 0,33$ mm et $14,50 \pm 0,33$ mm contre *E. coli*, et *S. aureus* respectivement. Alors que pour la concentration de 625 $\mu\text{g/ml}$ l'extrait de propolis a eu plus d'effet sur *S. aureus* avec une zone d'inhibition de $12 \pm 0,00$ mm, que sur *E. coli* avec une zone d'inhibition de $10,50 \pm 3,00$ mm. Ces résultats ont été comparés à ceux des antibiotiques qui ont montré des zones d'inhibition contre *E. coli*, et *S. aureus* respectivement exprimées comme suit : GEN ($31 \pm 1,00$ mm et $35,50 \pm 0,50$ mm), CZ ($14,50 \pm 0,33$ mm et $24,50 \pm 0,35$ mm), CT ($10,50 \pm 0,33$ mm et $11 \pm 0,67$ mm), et PI ($06 \pm 0,00$ mm et $35 \pm 0,50$ mm), où il a été constaté que l'efficacité de l'extrait de propolis dépasse celle des deux ATBs appartenant à la famille des céphalosporines (CZ et CT de la 1ère et 2ème génération respectivement) et à celui de la famille des Quinolones (PI de la 1ère génération).

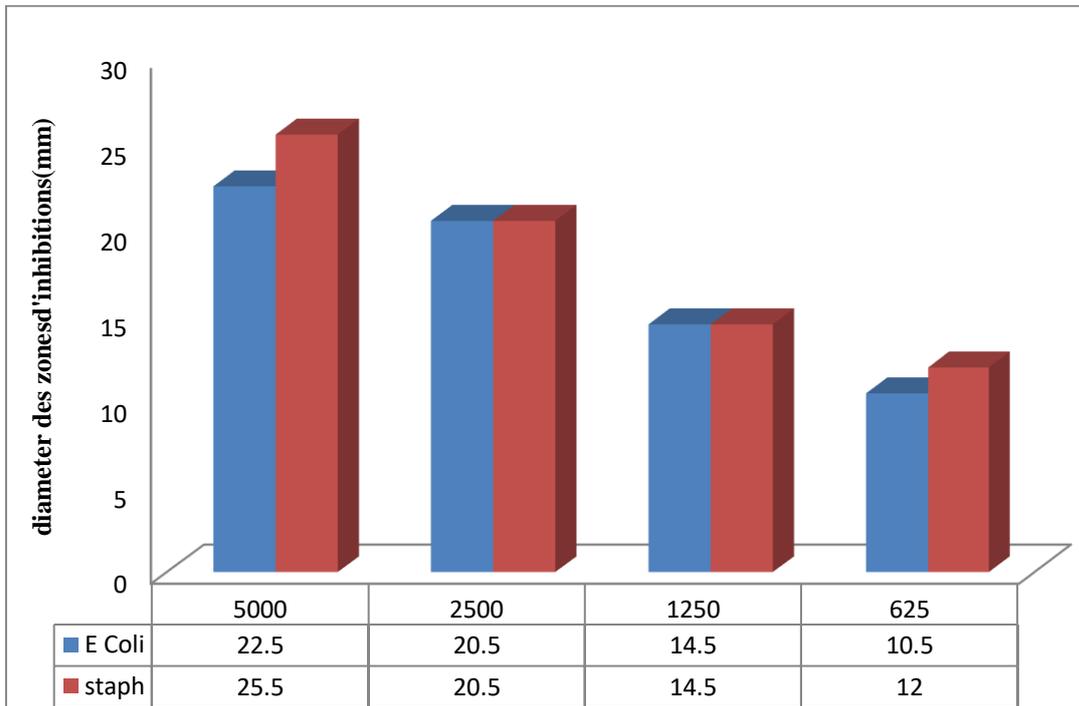


Figure 17: Résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de propolis.

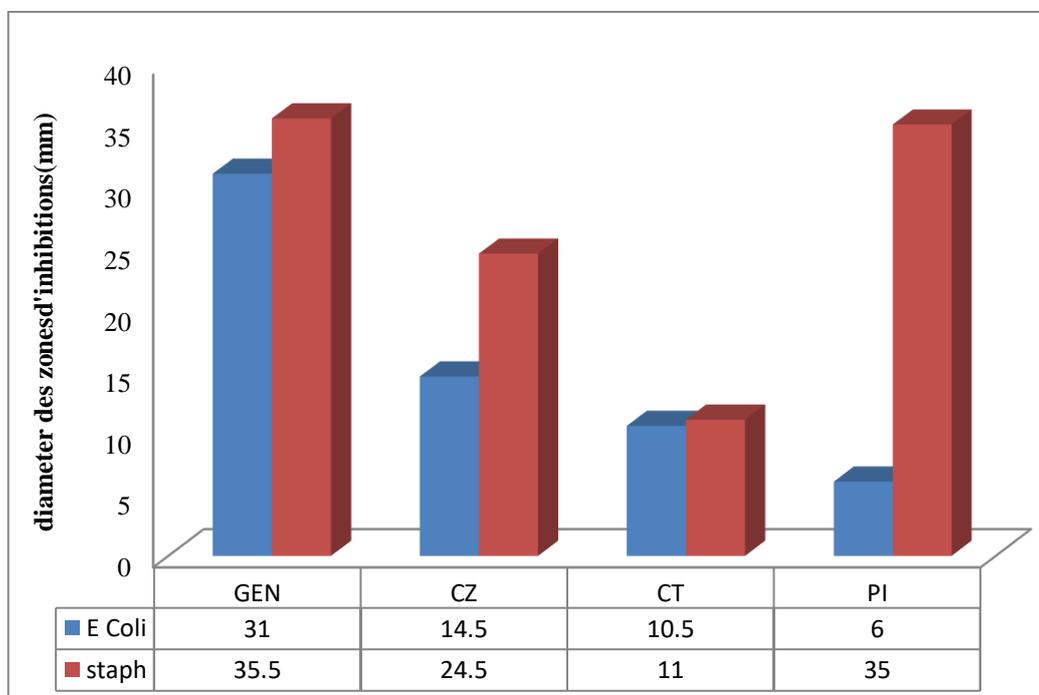


Figure 18 : Résultats de l'antibiogramme: Gentamicin (GEN), Cefazolin (CZ), Cefotaxime (CT), et Pipemidic acid (PI).

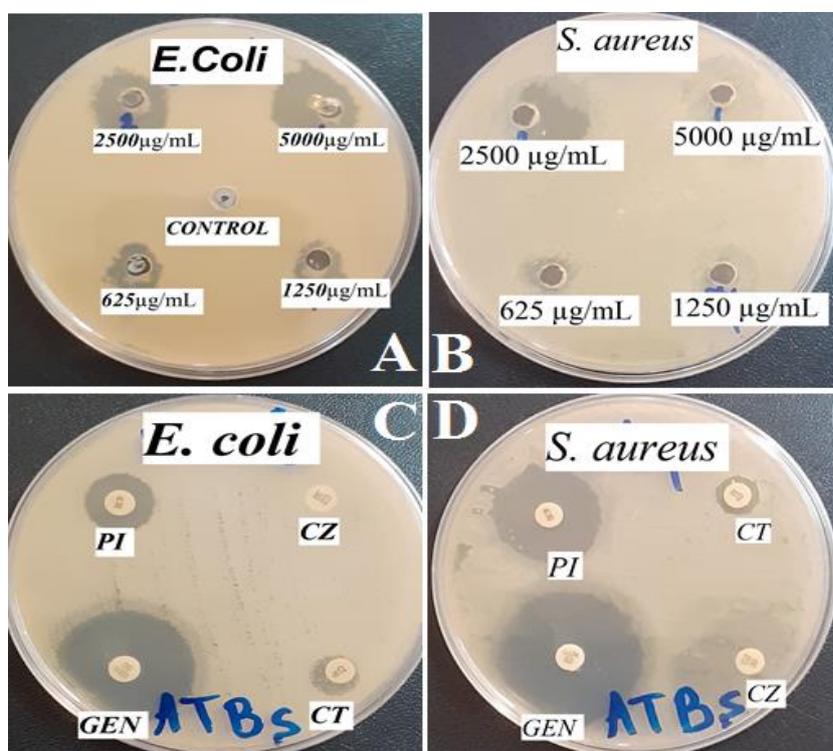


Figure 19 : L'activité antibactérienne par diffusion en puits d'Agar, et les méthodes de disques d'antibiotiques. A et B : Activité antibactérienne de la propolis contre *E. coli*, et *S. aureus* respectivement. C et D : Activité antibactérienne des antibiotiques contre *E. coli* et *S. aureus* respectivement.

2. Discussion

Les résultats de cette étude ont révélé que l'extrait hydroéthanolique de la propolis obtenu par macération pendant une période de 24 heures a conduit à un rendement d'extraction important évalué à 18,2% et que le résidu sec obtenu contenait une quantité importante de polyphénols totaux estimée à $113,65 \pm 2,41$ mg AGE/g RS, avec une teneur négligeable en flavonoïdes de $0,072 \pm 0,039$ mg CE/g RS. En effet, nos résultats sont en accord avec ceux de (Socha et al., 2015) qui ont montré dans leur étude menée pour estimer la composition phénolique et l'activité antioxydante de la propolis de différentes régions de la Pologne que le contenu phénolique total des échantillons de propolis variait de 150,05 à 197,14 mg AGE/g, tandis que le contenu total en flavonoïdes était de 35,64 à 62,04 mg QE/g. Ils ajoutent que l'acide phénolique dominant était l'acide p-coumarique, et l'acide férulique. Parmi les flavonoïdes, la chrysin, la naringine et la galangine étaient

dominantes. D'autre part, l'étude de **(Segueni et al., 2021)** montre après l'analyse de deux échantillons de propolis d'origine Algérienne et Turque que les niveaux de composés phénoliques sont inférieurs à nos résultats, variant de $19,51 \pm 0,86$ à $219,66 \pm 1,23$ mg AGE/g pour les phénols totaux et de $5,27 \pm 0,07$ à $74,57 \pm 1,03$ QE/g pour les flavonoïdes. De même, une étude réalisée sur les effets de différentes concentrations d'éthanol (20, 50, 80%) sur le contenu phénolique total et le contenu total en flavonoïdes dans la propolis Malaisienne montre également des niveaux faibles par rapport à notre étude où les plus hauts TPT et TFT ont été enregistrés à 80% d'éthanol, soit 8,898 mg AGE/ml et 0,034 mg QE/ml respectivement **(Yusof et al., 2020)**.

(Freires et al., 2018) expliquent que les principales catégories de composés présents dans la propolis sont les phénoliques et les flavonoïdes. Cependant, la composition de la propolis varie considérablement en fonction de la région géographique et de la saison de collecte. En outre, l'activité antioxydante de l'extrait de propolis contre le radical DPPH qui est mesurée en suivant la réduction de ce radical, qui s'accompagne du changement de la couleur violette (DPPH-) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurée par un spectrophotomètre à 515 nm montre que l'extrait hydroéthanol de propolis à une capacité significative à piéger le radical DPPH, avec une concentration inhibitrice de $IC_{50} = 2,95$ mg/ml. Ces résultats sont en accord avec ceux de **(Mihai et Mărghițaș, 2010)** qui indiquent une capacité antioxydante de la propolis de Transylvanie qui varie entre 1,67 mg/ml et 3,28 mg/ml. Cependant, nos résultats restent faibles par rapport à une étude menée sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH de la propolis Camerounaise qui a montré une activité de piégeage des radicaux avec des IC_{50} de 5, 6 mg/ml et de 1,07 mg/ml pour l'extrait hexanique et méthanolique respectivement, comparé à l'acide 3β -hydroxylanostan-9,24-dien-21-oïque ($IC_{50} = 1,22$ mg/ml) et à ceux des antioxydants standards à savoir : l'acide gallique ($IC_{50} = 0,30$ mg/ml) et la vitamine C ($IC_{50} = 0,80$ mg/ml) **(Talla et al., 2017)**. Alors que, les résultats des tests d'inhibition effectués par diffusion en puits d'agar ont montré une forte activité antibactérienne de l'extrait de propolis à la concentration de 5000 μ g/ml avec des zones d'inhibition de $22,50 \pm 1,67$ mm et $25,50 \pm 0,50$ mm contre *E. coli* et *S. aureus*, respectivement. Aux deux concentrations de 2500 et 1250 μ g/ml, l'extrait montre la même activité avec des zones d'inhibition de $20,50 \pm 0,33$ mm et $14,50 \pm 0,33$ mm contre *E. coli* et *S. aureus*, respectivement. Alors que pour la

concentration de 625 μ g/ml l'extrait de propolis à eu plus d'effet sur *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 12 \pm 0,00 mm, et une zone d'inhibition de 10,50 \pm 3,00 mm contre *E. coli*. En effet, l'activité antibactérienne obtenue dans nos résultats dépasse celle trouvée dans l'étude réalisée par **(Rahman et al., 2010)** sur l'activité antibactérienne de la propolis contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition modérée de 13,0 \pm 0,09 à 15,0 \pm 0,11 mm contre ces deux bactéries respectivement en utilisant une concentration (5,48 mg/ml) proche de celle utilisée dans notre étude. Ils suggèrent également que *S. aureus* est plus sensible à l'effet de la propolis que *E. coli*. De même, **(Lestari et Permana, 2020)** dans leur étude pour déterminer l'effet de la propolis sur la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* à différentes concentrations (30%, 50%, 70% et 90%) confirme que la propolis à un effet inhibiteur sur la croissance des colonies de *S. aureus* avec la meilleure valeur de concentration de 90%, tandis qu'elle n'a aucun effet sur les colonies de *E. coli*. Ces données sont en désaccord avec nos résultats, car l'extrait utilisé dans notre étude avait un bon effet sur les deux souches bactériennes (gram négatif et positif). De plus, ces résultats ont été comparés à ceux des antibiotiques qui ont montré des zones d'inhibition contre *E. coli*, et *S. aureus*, respectivement exprimées comme suit :

GEN (31 \pm 1,00 mm et 35,50 \pm 0,50 mm), CZ (14,5 \pm 0,33 mm et 24,50 \pm 0,35 mm), CT (10,50 \pm 0,33 mm et 11 \pm 0,67 mm), et PI (06 \pm 0,00 mm et 35 \pm 0,50 mm), où il à été constaté que l'efficacité de l'extrait de propolis dépasse celle des deux ATBs appartenant à la famille des céphalosporines (CZ et CT de la 1ère et 2ème génération respectivement) et à la famille des Quinolones (PI de la 1ère génération).

Conclusion et perspectives

V. Conclusion et perspectives

L'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques de synthèse, ainsi que le risque potentiel de transfert de médicaments par le lait maternel, ont incité la recherche de médicaments antibactériens alternatifs. Cette recherche a montré que la propolis Algérienne peut être un substituant approprié de ces médicaments synthétiques en raison de sa teneur élevée en acide phénolique, qui lui confère un puissant effet antioxydant et surtout antibactérien contre les bactéries gram positives et négatives.

A la lumière des résultats obtenus, et vu l'effet important des produits de la ruche, il serait donc important d'explorer d'autres voies de recherche.

Il serait aussi intéressant d'élargir l'éventail des espèces microbiennes testées, et faire des associations avec les produits de la ruche pour voir d'éventuel effet synergique.

Références Bibliographiques

1. Abdel-Fattah NS et Nadda OH. Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 2007; 37 (2 Suppl): 691-710.
2. Afroz, R., E. Tanvir, et al. (2014). "Potential Antioxidant and Antibacterial Properties of a Popular Jujube Fruit: A ppleKul (*Z izephusmauritiana*)." *Journal of Food Biochemistry*38(6): 592-601.
3. Agra DR, Evangelista A, Marcucci MC et coll. Physicochemical characteristics and antimicrobial activity of the extracts propolis of the Paraiba, Brazil. *Cienc Rural* 2006; 36 (6): 1842-1848.
4. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T et coll. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of korea. *J Agric Food Chem* 2004; 52 (24): 7286-7292.
5. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*. 2011;34(2):148-55.
6. ALMAS K, MAHMOUD A et DAHLAN A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin. A SEM study. *Indian J Dent Res* 2001;12(1):21-27.
7. ALYANE M, KEBSA LB, BOUSSENANE HN et coll. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci* 2008;21(3):201-209.
8. ARVOUET-GRAND A, LEJEUNE B, BASTIDE P et coll. Extrait de propolis. II : étude de la cicatrisation de plaies chez le lapin et chez le rat. *J Pharm Belg* 1993;48(3):171-178.
9. Avci CB, Gunduz C, Baran Y et coll. Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137 (1): 41-47.
10. Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev Psychobiol*. 1999;35(2):146-55.
11. Bankova V, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J*

- Ethnopharmacol 2005; 100 (1/2): 114-117.
12. BANKOVA VS, DE CASTRO SL et MARCUCCI MC. Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000;31:3-15.
 13. Bannister LH, Berry MM, Colins P, Dyson M et Dussek JE (1995). *Gray's anatomy*, 38th ed. New York: Churchill Livingstone 417-24.
 14. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY et coll. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancers cell lines. *J Ethnopharmacol* 2002; 80 (1): 67-73.
 15. Banskota AH, Tezuka Y et Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 161-571.
 16. BANSKOTA AH, TEZUKA Y, ADNYANA IK et coll. Hepatoprotective and anti-helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis.
 17. Barlow J. (2011). Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 16(4): 383-407.
 18. BARROS MP, LEMOS M, MAISTRO EL et coll. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. *J Ethnopharmacol* 2008;120(3):372-377.
 19. BARROS MP, SOUSA JP, BASTOS JK et coll. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol* 2007;110(3):567-571.
 20. Beaudry DM, Chiasson S et Lauzière J (2006). *Biologie de l'allaitement*. Edition: Presse de l'université de Québec.
 21. Beauthier, DJP & Lefèvre P. (1993). *Traité d'anatomie: de la théorie à la pratique palpatoire. Tête et tronc Propédeutique viscérale*. De Boeck Supérieur.
 22. BENGUEDOUAR L, BOUSSENANE HN, WIDED K et coll. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol* 2008;46(2):112-119.
 23. BENKOVIC V, KNEZEVIC AH, DIKIC D et coll. Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma- irradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009;60(2):129-138.
 24. Betzold C. M. (2007). An update on the recognition and management of lactational breast inflammation. *Journal of Midwifery & Women's Health* 52(6): 595-605.

25. BLANC M. Propriétés et usage médical de produits de la ruche. Thèse : Doctorat Pharmacie, Université de Limoges, 2010.
26. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*. 2015;16(1):191.
27. Borrelli F, Maffia P, Pinto L et coll. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002; 73 (1): 53-63.
28. BOYANOVA L, DEREJIAN S, KOUMANOVA R et coll. Inhibition of helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J Medical Microbiol* 2003;52(5):417-419.
29. Bruschi M. L., Rosseto H. C., de Francisco L. M., de Toledo L. D. A., &Raphaela R. D. A. (2017). Nanostructured propolis as therapeutic systems with antimicrobial activity. *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems*, Elsevier: 377-391.
30. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of the propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36 (4): 347-363.
31. Burke TR JR, Fesen MR, Mazumder A et coll. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem* 1995; 38 (21): 4171-4178.
32. Burnie D. les fleurs de méditerranée: le guide visuel de 500 espèces de fleurs sauvages. Paris: Larousse Borda, 1998.
33. CASTALDO S et CAPASSO F. Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002;73(1):1-6.
34. Castaldo S et Capasso F. propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; 73 (1):1-6.
35. Cavalieri EL et Rogan EG (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation, *Pharmacol. Ther.* 55(2), pp. 183-199.
36. Chai F, Evdokiou A, Young GP, Zalewski PD. Involvement of p21Waf1/Cip1 and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis*. 2000;21(1):7-14.
37. Chan AA, Bashir M, Rivas MN, Duvall K, Sieling PA, Pieber TR, et al. Characterization of the microbiome of nipple aspirate fluid of breast cancer survivors. *Sci Rep*. 2016;6:28061.

38. Chopier J, Salem C, Billière P et Ballaguier C(2003), Variation du sein normal. Aspects mammographiques et échographiques. Encycle Méd Chir (Elsevier, Paris). Radiodiagnostic-Urologie-Gynécologie, 34-800-A-15, 12p.
39. CHOPRA S, PILLAI KK, HUSAIN SZ et coll. Propolis protects against doxorubicin-induced myocardopathy in rats. *Exp Mol Pathol* 1995;62(3):190-198.
40. Chung W, Moon SK, Chang YC et coll. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 2004; 18 (14): 1670-1681.
41. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258-70.
42. Cleneger CV (2003). Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer, *Breast Dis*. 18, pp. 75-86.
43. Coelho LG, Bastos EM, Resende CC et coll. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. A pilot clinical study. *Helicobacter* 2007; 12 (5): 572-574.
44. Colibn C (1996). Guide de Sénologie-ellipses.
45. Cooper AP (18840). Anatomy of the breast. Longman, Orne, Green, Brown and Longmans.
46. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, NY)*. 2009;326(5960):1694-7.
47. Cougnoux A, Dalmaso G, Martinez R, Buc E, Delmas J, Gibold L, et al. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*. 2014;63(12):1932-42.
48. Cowin P, Rowlands TM et Hatsell SJ (2005). Codherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 17-499.
49. Cox DB, Casey TM, Owens RA et Hartmann PE (1999). Breast growth and the urinary excretion of lactose during human pregnancy and early lactation. *Endocrine relationships, EXP Physiol*. 84(2): 241-434.
50. Cushnie TP et Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26 (5): 343-356.
51. De Brux J (1979). Histopathologie du sein. Edition Masson, Paris.

52. De Castro SL et Higashi KO. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 1995; 46 (1): 55-58.
53. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Storia A, Laghi L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*. 2016;65(11):1812-21.
54. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(33):14691-6.
55. De Gruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(5):1137-50.
56. Decastro SL et Higashi KO. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol* 1995; 46 (1): 55-58.
57. Desai C. (2016). Meyler's side effects of drugs: The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. *Indian Journal of Pharmacology* 48(2): 224.
58. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*. 2008;6(11):e280- e.
59. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4554-61.
60. Dobrowski JW, Vohora SB, Sharma K et coll. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35 (1): 77-82.
61. Donadieu Y. *La propolis*. Paris: Dangles, 2008.
62. Donna T et Geddes PhD (2007). *Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research*. American College of Nurs-Midwives. Volume 52, N°6.
63. DURAFFOUD C et LAPARAZ JC. *Traité de Phytothérapie clinique*. Paris : Masson, 2002.
64. El Khawaga OY, Salem AT et El Shal MF. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chimica Acta* 2003; 338 (1/2): 11-16.

65. Ellis H (2007). *Anatomy of breast*. Breast Elsevier Ltd. 25; 6: 251-253.
66. Espié, M., & Gorins, A. (1995). *Le sein*. Edition ESKA, Paris.
67. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352(6285):560-4.
68. Farooqui T et Farooqui A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis a critical review. *Curr Nutr Food Sci* 2010; 6: 186-199.
69. Fernandes Junior A, Balestrin EC, Betoni JE et coll. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (5): 563-566.
70. Ford WW. On the Bacteriology of Normal Organs. *J Hyg (Lond)*. 1901;1(2):277-84.
71. Foxman B., D'Arcy, H., Gillespie, B., Bobo J. K., & Schwartz K (2002). Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *American journal of epidemiology* 155(2): 103-114.
72. Freires I. A., Pinguero J. M., Miranda S. L., & Bueno-Silva B. (2018). Red propolis: Phenolics, polyphenolics, and applications to microbiological health and disease. *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease*, Elsevier: 293-300.
73. Fulbright LE, Ellermann M, Arthur JC. The microbiome and the hallmarks of cancer. *PLoS pathogens*. 2017;13(9):e1006480-e.
74. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science*. 2015;348(6230):80-6.
75. Gekker G, Hu S, Spivak M, Lkensgard JR et coll. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol* 2005; 102 (2): 158-163.
76. Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, Jonas OH, Shental N, Nejman D, et al. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science*. 2017;357(6356):1156-60.
77. GHISALBERTI EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979;60(2):59-84.
78. Golder W. propolis. The bee glue as presented by the graeco-roman literature. *Wurzburg Medizinhist Mitt* 2004 ; 23 :133-145.
79. Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Moreno-Torres R et coll. Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Sep Sci* 2007; 30 (4): 595-603.
80. González-Sarrías A, Tomé-Carneiro J, Bellesia A, Tomás-Barberán FA, Espín JC.

- The ellagic acid-derived gut microbiota metabolite, urolithin A, potentiates the anticancer effects of 5- fluorouracil chemotherapy on human colon cancer cells. *Food Funct.* 2015;6(5):1460-9.
81. Gosiewski T, Ludwig-Galezowska AH, Huminska K, Sroka-Oleksiak A, Radkowski P, Salamon D, et al. Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method - the observation of DNAemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(2):329-36.
 82. Gregoris E et Stevanato R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (1): 76-82.
 83. Group NHW, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23.
 84. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, et al. Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity.* 2015;42(2):344-55.
 85. Hamladji RM.(2006). Précis de sémiologie-Office des publications Universitaires.
 86. Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev.* 2004;9(2):180-97.
 87. Hayouni, E. A., M. Abedrabba, et al. (2007). "The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts." *Food chemistry*105(3): 1126-1134.
 88. Hidden G et Arvy L (1973). Remarques sur le drainage lymphatique de la glande mammaire humaine. *Bull Assoc Anat (Nancy);* 57: 879-86.
 89. Huang WJ, Huang CH, Wu CL et coll. Propolin G. a parnylflavanone, isolated from Taiwanese propolis, induces caspase-de-pendent apoptosis in brain cancer celles. *J Agric Food Chem* 2007; 55 (18): 7366-7376.
 90. Huang Y, Yang W, Liu H, Duan J, Zhang Y, Liu M, et al. Effect of high-dose methotrexate chemotherapy on intestinal Bifidobacteria, Lactobacillus and Escherichia coli in children with acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Biology and Medicine.* 2012;237(3):305-11.
 91. Huleihel M et Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney in urine sarcoma virus. *Arch Viral* 2004; 146 (8): 1517-1526.

92. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z, et al. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLOS ONE*. 2011;6(6):e21313.
93. Hurtado JA, Maldonado-Lobón JA, Díaz-Ropero MP, Flores-Rojas K, Uberos J, Leante JL, et al. Oral Administration to Nursing Women of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Prevents Lactational Mastitis Development: A Randomized Controlled Trial. *Breastfeed Med*. 2017;12(4):202-9.
94. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*. 2013;342(6161):967-70.
95. ISALA MI, NIEVA MORENO MI et SAMPIERTO AR. Antioxydant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 2001;76(2):165-170.
96. Jahanfar S., Ng C. J., & Teng C. L. (2009). Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(1).
97. Jan G, Belzacq AS, Haouzi D, Rouault A, Métivier D, Kroemer G, et al. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2002;9(2):179-88.
98. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.
99. Jdaragic-Ibricevic H. The effects of propolis on the reparative processes of the pulp and histological analysis of the pulp 28 days after artificial exposure and covering with propolis. *Stomatol Vjen* 1983; 12 (3/4): 111-114.
100. Kampa M, Alexaki VI, Notas G et coll. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 2004; 6 (2): R63-R74.
101. Kandaswami C et Middleton JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 351-376.
102. Kateete D. P., Kabugo U., Baluku, H., Nyakarahuka L., Kyobe S., Okee M., ... & Joloba M. L. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PloS one* 8(5): e63413.

103. Katircioglu H et Mercan N. Antimicrobial activity and chemical composition of Turkish propolis from different regions. *Afri J Biotechnol* 2006; 5: 1151-1153.
104. Kaushik, P., P. Goyal, et al. (2010). "In vitro evaluation of antibacterial potential of dry fruit extracts of *Elettaria cardamomum* Maton (Chhoti Elaichi)." *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 9(3): 287.
105. Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7 (1): 22-31.
106. Khayyal MT, El-Ghazaly MA et El-Khatib AS. Mechanisms involved in the anti-inflammatory response of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res* 1993; 19 (5): 197-203.
107. KHAYYAL MT, EL-GHAZALY MA, EL-KHATIB AS et coll. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam Cli Pharmacol* 2003; 17(1):93-102.
108. Konishi H, Fujiya M, Tanaka H, Ueno N, Moriichi K, Sasajima J, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nat Commun.* 2016; 7(1):12365.
109. Koo H, Gomes BP, Rosaken PL et coll. In vitro antimicrobial activity of propolis and arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45 (2): 141-148.
110. Koo H, Rosalen PL, Cury JA et coll. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agent Chemother* 2002; 46 (5): 1302-1309.
111. Koo H, Vacca smith AM, Bowen WH et coll. Effects of *apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferase in solution and absorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res* 2000; 34 (5): 418-426.
112. Krol W, Scheller S, Shani J et coll. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *staphylococcus aureus*. *Arzeimittelforschung* 1993; 43 (5): 607-609.
113. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y et coll. Antibacterial antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64 (3): 234-240.
114. Kumazawa S, Hamasaka T et Nakayama T. Antioxydant activity of propolis

- of various geographic origins. *Food chemistry* 2004; 84: 329-339.
115. LAHOUEL M et FILLASTRE JP. Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema* 2004;7:313-320.
 116. Larousse médical (2006). Edition Anatomie caron.
 117. Laurent D(2003). Thèse sur : Stimulation autocrine de la croissance des cellules du cancer du sein par le Nerve Growth Factor. Université de Lille I.
 118. Lawrance R.A et Lawrance R.M (2005). Breast feeding : a guide for the medical profession. 6^{ème}. Philadelphie Elsevier Mosby.
 119. Lestari, A. L. D., &Permana, A. (2020). DAYA HAMBAT PROPOLIS TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*. *Jurnal Pro-Life* 7(3): 237-250.
 120. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):11070-5.
 121. Liberto SA, Pereira AL, Araujo MJ et coll. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol* 2009; 125 (1): 1-9.
 122. Liu Al, Wang HD, Lee SM et coll. Structure-activity relation ship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg Med Chem* 2008; 16 (15): 7141-7147.
 123. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):51.
 124. Lu LC, Chen YW et Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 2005; 102 (2); 312-220.
 125. Machado GM, Leon LL et Decastro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 (1): 73-77.
 126. Maichuk IF, Orlovskaja LE et Andreev VP. The use of ocular drugs films of propolis in the sequelae of ophthalmic herpes. *Voen Med Zh* 1995; 80 (12): 36-39.
 127. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; 26:83-99.
 128. Marron M, Giordano A, Zingaretti M, Bioanic C, De Mat-teis R, Kahn BR,

- Nisoli Mtaallah M, Makhoul R, Chebbi A, Boussen H, Héchiche M and Rahal K (2005). Mammary tuberculosis: a retrospective study of 65 cases. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* Volume 33, Tissue 11, Pages 870-876.
129. MASSIGNANI JJ, LEMOS M, MAISTRO EL et coll. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytother Res* 2009;23(10):1355-1360.
130. Mathelin C, Youssef C, Brethes JP et Rio MC (May 2007). Grossesse: ref de l'article: Paradoxial interactions between pregnancy and breast cancer. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* volume 35, Issue 6, pages 449-456.
131. Mathew, J. (2004). Effect of maternal antibiotics on breast feeding infants. *Postgraduate medical journal* 80(942): 196-200.
132. MEGRAUD F. Strategies to treat patients with antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16(4):507-509.
133. Menezes H et Almeida EC. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J Venom Anim Toxins* 2002; 8 (2): 191-212.
134. Metzner J, Bekemeier H et Weber FG. Influence of flavonoids on capillary permeability, carrageenin edema and histamine and PGE₂ spasms. *Agents Actions Suppl* 1982; 10: 129-134.
135. Mihai C. M., & Mărghitaș L. A. (2010). Antioxidant Capacity of Transylvanian Propolis. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies* 67.
136. Mirzoeva OK et Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid product during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 55 (6): 441-449.
137. Mitchell K. B. and H. M. Johnson (2022). Breast Conditions in the Breastfeeding Mother. *Breastfeeding*, Elsevier: 572-593.
138. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamed M et coll. Chemical composition oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry* 2007; 103 (4): 1097-1103.
139. Mohammadzadeh, S., M. Shariatpanahi, et al. (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food chemistry* 103(4): 1097-1103.

140. Mohdaly, A. A., A. A. Mahmoud, et al. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Biochemistry* 39(5): 538-547.
141. MONTORO A, BARQUINERO JF, ALMONACID M et coll. Concentration-dependent protection by ethanol extract of propolis against gamma-ray- induced chromosome damage in human blood lymphocytes. *Evid Based Complement Altern Med* 2011;2011:174853.
142. Moossavi S, Azad MB. Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes*. 2019:1-10.
143. Murad JM, Calvi SA, Soares AM et coll. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79 (3): 331-334.
144. Njoya, E. M. (2021). Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. *Cancer, Elsevier*: 349-357.
145. Nogacka A. M., Salazar N., Arboleya S., Suárez M., Fernández N., Solís G., &Gueimonde M. (2018). Early microbiota, antibiotics and health. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(1): 83-91.
146. Nougayrède J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, et al. *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science*. 2006;313(5788):848-51.
147. O'Connor H, MacSharry J, Bueso YF, Lindsay S, Kavanagh EL, Tangney M, et al. Resident bacteria in breast cancer tissue: pathogenic agents or harmless commensals? *Discov Med*. 2018;26(142):93-102.
148. Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz HR et coll. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* 2005; 38 (2): 191-196.
149. Oliveira CP, Shinobu SC, Longhini R et coll. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 (5):493-497.
150. Oliviera JB, Verhaeghe JL, Butrellib M, Marchala F et Houvenaeghelb G(2006). Functional anatomy of the lymphatic drainage of the breast: contribution of sentinel lymph node biopsy. *Annales de chirurgie* 131 608-615.
151. Olivier-Bosquet M (2006). Les cellules mammaires du développement

- normal à la transformation tumorale. *Journal de la société de Biologie*, 200 (2), 179-180.
152. Ollivier-Bousquet M et Devinoy E (2005). *Liv. Prod. Sic.*, 98, 163-173.
153. Onlen Y, Tamer C, Oksuz H et coll. Comparative trial of different antibacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas Keratitis* in rabbits. *Microbial Res* 2007; 162v(1): 62-68.
154. ORSATTI CL, MISSIMA F, PAGLIARONE AC et coll. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J Ethnopharmacol* 2010;129(3):314-318.
155. ORSI ROF, SOARES SRC, CALVI A et coll. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000;6(2):205-219.
156. PARK JH, LEE JK, KIM HS et coll. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 2004;4(3):429-436.
157. Park YK, Alencar SM et Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (9): 2502-2506.
158. Parolia A, Kundabala M, Rao NN et coll. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J* 2010; 55 (1): 59-64.
159. Pascoal A., Feás X., Dias T., Dias L. G., &Estevinho L. M (2014). The role of honey and propolis in the treatment of infected wounds. *Microbiology for Surgical Infections*, Elsevier: 221-234.
160. Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L et coll. Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Medicina (Kaunas)* 2008; 44 (12): 977-983.
161. Peltier E, Guinebretière JM (1998). *Anatomie du sein normal et pathologique. Echographie mammaire: de l'image à la thérapeutique*. Masson; 6-14.
162. Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*. 2007;119(3):e724-32.
163. Philippe JM. *Le guide de l'apiculture*. Paris: episud, 1994.
- Phytomedicine* 2001;8(1):16-23.
164. Pietta PG, Gardana C et Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 2002; 73 (Suppl 1): S7-S20.

165. Popolo A, Piccinelli AL, Morello S et coll. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. *Can J Physiol Phamacol* 2011; 89 (1): 50-57.
166. Prost PJ. *Apiculture*. Paris: Baillière JB, 1979.
167. Puddu, M., & Tafforeau, J. (2005). Opportunité de dépistage du cancer du sein chez les femmes de 40 à 49 ans. *Nr*, 1, 1-267.
168. Raghukumar R, Vali L, Watson D et coll. Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavanones. *Phytother Res* 2010; 24 (8): 1181-1187.
169. Rahman M. M., Richardson A., & Sofian-Azirun M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research* 4(18): 1872-1878.
170. Rao CV, Desai D, Simi B et coll. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res* 1993; 53 (18): 1482-1488.
171. Raskov H, Burcharth J, Pommegaard H-C. Linking Gut Microbiota to Colorectal Cancer. *J Cancer*. 2017;8(17):3378-95.
172. Rhee K-J, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, et al. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2009;77(4):1708-18.
173. Riquelme E, Zhang Y, Zhang L, Montiel M, Zoltan M, Dong W, et al. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell*. 2019;178(4):795-806 e12.
174. Rojo D, Méndez-García C, Raczowska BA, Bargiela R, Moya A, Ferrer M, et al. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(4):453-78.
175. Rossi A, Lgresti A, Longo R et coll. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J 774 macrophages. *Phytomedicine* 2002; 9 (6): 530-535.
176. Rouvière H et Dalmas A (2002). *Anatomie Humaine descriptive, topographique et fonctionnelle*. Tome 3. Masson, Paris.
177. Russo A, Cardile V, Sanchez F et coll. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* 2004; 76: 545-558.
178. Russo J et Russo I (2004). The breast as a developing organ. *Molecular*

- Basis of Breast Cancer. Prevention and treatment, Springer, Heidelberg, Germany.
179. Samet N, Laurent C, Susarla SM et coll. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Clin Oral Invest* 2007; 11 (2): 143-147.
 180. Santos VR, Gomes RT, De mesquita RA et coll. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res* 2008; 22 (11): 1544-1547.
 181. Sappey C (1885). Description et iconographie des vaisseaux lymphatiques. Paris.
 182. Scazzocchio F, D'auria FD, Alessandrini D et coll. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006; 161 (4): 327-333.
 183. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S et coll. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother Res* 2010; 24 (Suppl 1): S20-S28.
 184. Segueni N., Keskin Ş., Kadour B., Kolaylı S., & Salah A. (2021). Comparison between phenolic content, antioxidant, and antibacterial activity of Algerian and Turkish propolis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 24(10): 1679-1687.
 185. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*. 2016;14(8):e1002533.
 186. Sforcin JM et Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 2011;133 (2): 253-260.
 187. SFORCIN JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007;113(1):1-14.
 188. Shinohara R, Ohta Y, Hayashi T et coll. Evaluation of antilipid peroxidative action of propolis ethanol extract. *Phytother Res* 2002; 16 (4): 340-347.
 189. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350(6264):1084-9.
 190. SOBOCANEC S, SVERKO V, BALOG T et coll. Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *J Agric Food Chem* 2006;54(21): 8018-8026.
 191. Socha R., Gałkowska D., Bugaj M., & Juszczak L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland.

- Natural Product Research 29(5): 416-422.
192. Speciale A, Costanzo R, Puglisi S et coll. Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. *J Chemother* 2006; 18 (2): 164-171.
 193. Steliou K, Boosalis MS, Perrine SP, Sangerman J, Faller DV. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access*. 2012;1(4):192-8.
 194. Stepanvic S, Antic N, Dakic I et coll. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 2003; 158 (4): 353-357.
 195. Suzuki I, Hayashi I, Takaki T et coll. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17 (5): 553-562.
 196. Sylvain J (2004). Thèse sur: L'antigène Sialyl-Tn dans le cancer du sein: Etude de la O-glycosylation et de son influence sur la croissance de lignées cellulaires sialyl-Tn positive. Lille 1(pdf 50736).
 197. Szliszka E, Czuba ZP, Domino M et coll. Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules* 2009; 14 (2): 738-754.
 198. Talla E., Tamfu A. N., Gade I. S., Yanda L., Mbafor J. T., Laurent S., & Bankova V. (2017) New mono-ether of glycerol and triterpenes with DPPH radical scavenging activity from Cameroonian propolis. *Natural Product Research* 31(12): 1379-1389.
 199. Tuchmann-Duplessis, H. (1979). *Embryologie: travaux pratiques et enseignement dirigé*. Masson.
 200. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
 201. Underwood W. J., Blauwiekel R., Delano M. L., Gillesby R., Mischler S. A., & Schoell A. (2015). *Biology and diseases of ruminants (sheep, goats, and cattle)*. *Laboratory animal medicine*, Elsevier: 623-694.
 202. Urbaniak C, Burton JP, Reid G. Breast, Milk and Microbes: A Complex Relationship that Does Not End with Lactation. *Women's Health*. 2012;8(4):385-98.
 203. Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban

- CK, et al. Microbiota of human breast tissue. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(10):3007-14.
204. Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M, Reid G. The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(16):5039-48.
205. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70 Suppl 1(Suppl 1):S38-S44.
206. Uzel A, Sorkun K, Oncag O et coll. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Microbial Res* 2005; 160 (2): 189-195.
207. Vandermoere F(2005). Thèse sur : Protéomique fonctionnelle de la signalisation de la Kinase AKT dans le cancer du sein. Université de Lille 1.
208. Velikova M, Bankova V, Sorkun K et coll. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch C* 2000; 55(9/10): 790-793.
209. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015;350(6264):1079- 84.
210. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013;342(6161):971-6.
211. Viel C et Dore JC. History and uses of honey, mead and hive products *Rev Hist Pharm (Paris)* 2003; 51(337):7-20.
212. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J et coll. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73 (9): R117-R124.
213. Vivarelli S, Salemi R, Candido S, Falzone L, Santagati M, Stefani S, et al. Gut Microbiota and Cancer: From Pathogenesis to Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1):38.
214. VOLPERT R et ELSTNER F. Biochemical activities of propolis extracts. Part I: standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Z Naturforsch C* 1993;48(11/12):851-857.
215. Vynograd N, Vynograd I et sosnowski Z. A comparative multi-centre study

- of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* 2000; 7 (1): 1-6.
216. Wambach, K. A. (2003). Lactation mastitis: a descriptive study of the experience. *Journal of Human Lactation* 19(1): 24-34.
217. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
218. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiology*. 2013;13(1):116.
219. Watabe M, Hishikawa K, Takayanagi A et coll. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; 279 (7): 6017-6026.
220. Weng MS, Liao CH, Chen CN et coll. Propolin H from Taiwanese propolis induces G1 arrest in human lung carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2007; 55 (13): 5289-5298.
221. Wheater PR, Brukitt HG et Daniels VG (1982). *Histologie Fonctionnelle: manuel et atlas*. MEDSI. Paris.
222. Wilson, E., S. L. Woodd, et al. (2020). "Incidence of and risk factors for lactational mastitis: A systematic review." *Journal of Human Lactation* 36(4): 673-686.
223. Wright W et Philipson JD. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 1990; 4: 127-139.
224. Xu BH et Shi MZ. An in vitro test of propolis against *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006; 24 (6): 477-478.
225. Xuan C, Shamonki JM, Chung A, Dinome ML, Chung M, Sieling PA, et al. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(1):e83744.
226. Yang HY, Chang CM, Chen YW et coll. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *J Sci Food Agric* 2006; 86: 937-943.
227. Yang, C., Liu, P., Wang, S., Zhao, G., Zhang, T., Guo, S., ... & Deng, G. (2018). Shikonin exerce des effets anti-inflammatoires dans la mammites induite par le LPS en inhibant la voie de signalisation NF-κB. *Communications sur la recherche*

- biochimique et biophysique, 505(1), 1-6.
228. Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-7.
229. Yusof N., Munaim M. A., &Kutty R. V. (2020).The effects of different ethanol concentration on total phenolic and total flavonoid content in Malaysian propolis. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, IOP Publishing.
230. Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, et al. The Gut Microbiome Modulates Colon Tumorigenesis. *mBio*. 2013;4(6):e00692-13.
231. Zhan Y, Chen P-J, Sadler WD, Wang F, Poe S, Núñez G, et al. Gut Microbiota Protects against Gastrointestinal Tumorigenesis Caused by Epithelial Injury. *Cancer Research*. 2013;73(24):7199- 210.

Production Scientifique

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ALGERIAN HYDRO-ETHANOLIC PROPOLIS EXTRACT AGAINST *ESCHERICHIA COLI* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* -INDUCED BREASTFEEDING WOMEN MASTITIS

Chebli K¹, Boudou F^{1,2*}, Berroukche A^{1,3}

¹Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Dr MOULAY Taher University of Saida, Algeria.

²Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University of Sidi-Bel-Abbes, Sidi-Bel-Abbes, Algeria.

³Research Laboratory of Water Resources and Environment, Biology Department, Faculty of Sciences, Tahar-Moulay University of Saida, Algeria.

*Author for Correspondence: farouk.boudou@yahoo.fr

ABSTRACT

Mastitis, caused by *Escherichiacoli* and *Staphylococcus aureus*, is a common infection in nursing mothers. Antibiotics (ATBs) are the mainstay of treatment for mastitis. However, given the potential for transfer of antibiotics from mother to infant, as well as the problem of bacterial resistance to synthetic ATBs, it is critical to develop new natural compounds with antibacterial properties. Thus, the aim of this work is to determine the phytochemical content, antioxidant capacity, and in vitro antibacterial activity of the hydroethanol extract of an Algerian propolis against the two above-mentioned bacterial strains, in comparison with four ATBs namely: Gentamicin (GEN), Cefazolin (CZ), Cefotaxime (CT), and Pipemidic acid (PI). Estimates of total polyphenol and total flavonoids revealed levels of 113.65±2.41 mg AGE/g DR, and 0.072±0.039 mg EC/g DR respectively. Evaluation of antioxidant activity revealed a significant ability to scavenge 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (IC₅₀=2.95±0.70 mg/mL). Bacterial inhibition tests performed by the agar well diffusion method showed at the concentration of 5000 µg/mL a strong antibacterial activity with inhibition zones of 22.5±1.67 mm and 25.5±0.50 mm against *E. coli*, and *S. aureus* respectively, compared to GEN (31±1.00 mm and 35±0.50 mm), CZ (14.5±0.33 mm and 24.50±0.35 mm), CT (10.50±0.33 mm and 11±0.67 mm), and PI (06±0.00 mm and 35±0.50 mm) against *E. coli*, and *S. aureus* respectively. These results show that the efficacy of propolis extract exceeds that of the two ATBs belonging to the cephalosporin family (CZ and CT of the 1st and 2nd generation respectively) and the Quinolones family (PI of the 1st generation).

Keywords: Antibiotics; antioxidant; *Escherichia coli*; propolis; *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

Mastitis is a common condition in lactating women (Wilson et al. 2020). It affects between 3% and 20% of all nursing women. Primiparity, breast-pump use, nipple-shield use, previous history of mastitis, and nipple trauma are all risk factors (Mitchell et Johnson 2022). Mastitis is characterized by unilateral discomfort, redness, and swelling of the breast, and may be accompanied by flu-like symptoms (fever, chills and aches) (Wambach 2003). Erythema, oedema, and unilateral tenderness of the afflicted breast are commonly seen on examination. In cases of breast abscess, a fluctuating, painful, hard breast mass and overlying erythema is seen. In order to distinguish infected mastitis from non-infectious

mastitis, tests such as milk leukocyte count, bacterial colony count and culture may be useful (Betzold 2007; Barlow 2011). *Staphylococcus aureus*, which includes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. epidermidis*, streptococci, and gram-negative rods, are the most prevalent bacterium associated with mastitis (Kateete et al. 2013). *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* have also been found to cause acute mastitis (Underwood et al. 2015). Supportive treatment, efficient milk extraction, symptomatic treatment (pain medication, use of anti-inflammatory medications), probiotic treatment, and antibiotic therapy are all principles of mastitis treatment (Jahanfar et al. 2009). For staphylococcal and

streptococcal infections, penicillin, dicloxacillin and cephalosporins are recommended; while for gram-negative organisms, cephalexin or amoxicillin can be used (Yang et al. 2018). A prospective study of a sample of 840 women in the United States found that 86% of women with mastitis received antibiotics, with the majority receiving cephalexin (46%), while, the remainder received amoxicillin, ampicillin and amdinocillin-clavulanate (Foxman et al. 2002). There is a high risk of transmission of antibiotics used by breastfeeding mothers to newborns through breast milk. While the majority of medicines used by breastfeeding women have no adverse effects on their newborns, they can sometimes have serious consequences (Mathew 2004). Exposure to antibiotics in early childhood has been linked to an increased risk of non-communicable disorders, including allergies and obesity. Furthermore, the influence of antibiotics on the creation of the neonatal gut resistome, as well as the role of the microbiota as a reservoir of resistance genes, are linked to the increasing number of antibiotic-resistant pathogens (Nogacka et al. 2018). However, faced with this dual constraint of transferring antibiotics from mother to infant, as well as the problem of bacterial resistance to synthetic antibiotics, it is essential to develop new natural compounds with bactericidal properties. Propolis, sometimes known as bee-glue, commonly referred as a "natural antibiotic" is a resinous compound produced and utilized by bees (*Apis mellifera L.*) to seal hive walls and strengthen the comb and hive entrance borders, which is already being used by humans since ancient times for its pharmaceutical properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities (Bruschi et al. 2017). It is relatively nontoxic and safe, and it's used in cosmetics and "natural products" for self-treatment because of its antiseptic, antimycotic, and bacteriostatic characteristics (Desai, 2016). The main compound categories present in propolis are phenolics and flavonoids. However, the composition of propolis varies greatly depending on geographical region and collection season (Freires et al. 2018). All types of propolis possess significant antimicrobial activity against various types of microorganisms, including bacteria, fungi, and virus (Mohammadzadeh et al. 2007).

Anti-inflammatory and antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (among others) have been demonstrated (Freires et al. 2018). Propolis is gaining popularity in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries as a result of its medical characteristics, and it is now being used in products for human consumption, such as drinks and food additives (Pascoal et al. 2014). Indeed, the objective of this work is to determine the phytochemical content, the antioxidant capacity and the in vitro bactericidal activity of the hydroethanolic extract of propolis against mastitis induced by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in breastfeeding women in comparison with four antibiotics namely: Gentamicin (GEN), Cefazolin (CZ), Cefotaxime (CT), and Pipemidic acid (PI).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of propolis hydroethanolic extract

The hydroalcoholic of a propolis from the region of Saida in Algeria was prepared according to the method described by Mohdaly et al. (2015) (Mohdaly et al. 2015). 10 g of propolis powder samples were extracted overnight at room temperature with 100 ml of hydroethanolic solution (70%). The extract was filtered through a Whatman filter paper (No. 1), and the solvent was evaporated using a rotary vacuum evaporator and the dry residue was stored at 4°C for further analysis.

The yield (R%) was calculated according to the following formula:

$$R (\%) = \frac{\text{Mass of dry residue obtained (g)}}{\text{Mass of raw material used (g)}} \times 100$$

Total Phenolic Content (TPC)

The total phenolic content of the samples was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, as reported by Serairi-Beji et al. (2018) (Serairi-Beji et al. 2018). 0.5 mL distilled water and 0.125 mL Folin-Ciocalteu reagent were mixed with an aliquot of diluted sample fraction. Before adding 1.25 mL Na_2CO_3 , the mixture was mixed and incubated for 6 minutes (7 percent). The solution was then diluted to a final volume

of 3 mL with distilled water and properly mixed. The absorbance was measured at 760 nm against a prepared blank after incubation in the dark. Through the calibration curve with Gallic acid, TPC was represented as milligrams Gallic acid equivalents per gram dry weight (mg GAE/g d.w.). The range of the calibration curve was 0–100 g/mL. Three replications of each sample were performed.

Total Flavonoid Content (TFC)

The colorimetric method described by Kim et al. (2003) was used to determine the total flavonoid content of the extracts. 100 µL extract was combined with 0.4 mL distilled water, then 0.03 mL sodium nitrite solution (5 percent NaNO₂) was added. After 5 minutes, 0.02 mL of a 10% AlCl₃ solution was added. After 5 minutes, add 0.2 mL of 1 M Na₂CO₃ solution and 0.25 mL of distilled water. A vortex was used to agitate the mixture, and absorbance was measured at 510 nm. TFC was calculated as mg catechin equivalent per gram dry weight (mg CE/g d.w.) using the catechin 0–500 g/mL calibration curve (R² = 0.99). Triplicate samples were tested.

DPPH Radical-Scavenging Activity

The method of Sanchez-Moreno et al. (1998) was used to measure DPPH radical-scavenging activity. Rapidly, 50 µL of each extract at various concentrations (from 0.078 to 5 mg/mL) were added to 1.95 mL of DPPH (0.025 g/L) methanolic solution. Simultaneously, a negative control is made by combining 50 liters of methanol with 1.95 mL of DPPH methanolic solution. The mixture was briskly shook before being allowed to stand at room temperature for 30 minutes in the dark. At 515 nm, the absorbance of the resultant solution was measured. The scavenging activity was represented as IC₅₀ (mg/mL), which is the dose necessary to inhibit DPPH by 50%. Plant extracts with a lower IC₅₀ value have stronger antioxidant activity. The percentage of radical-scavenging is calculated according to the following equation:

$$1\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

where:

A₀ is the absorbance of the control (DPPH solution without extract).

A is the absorbance in the presence of extract.

Antibacterial Activity

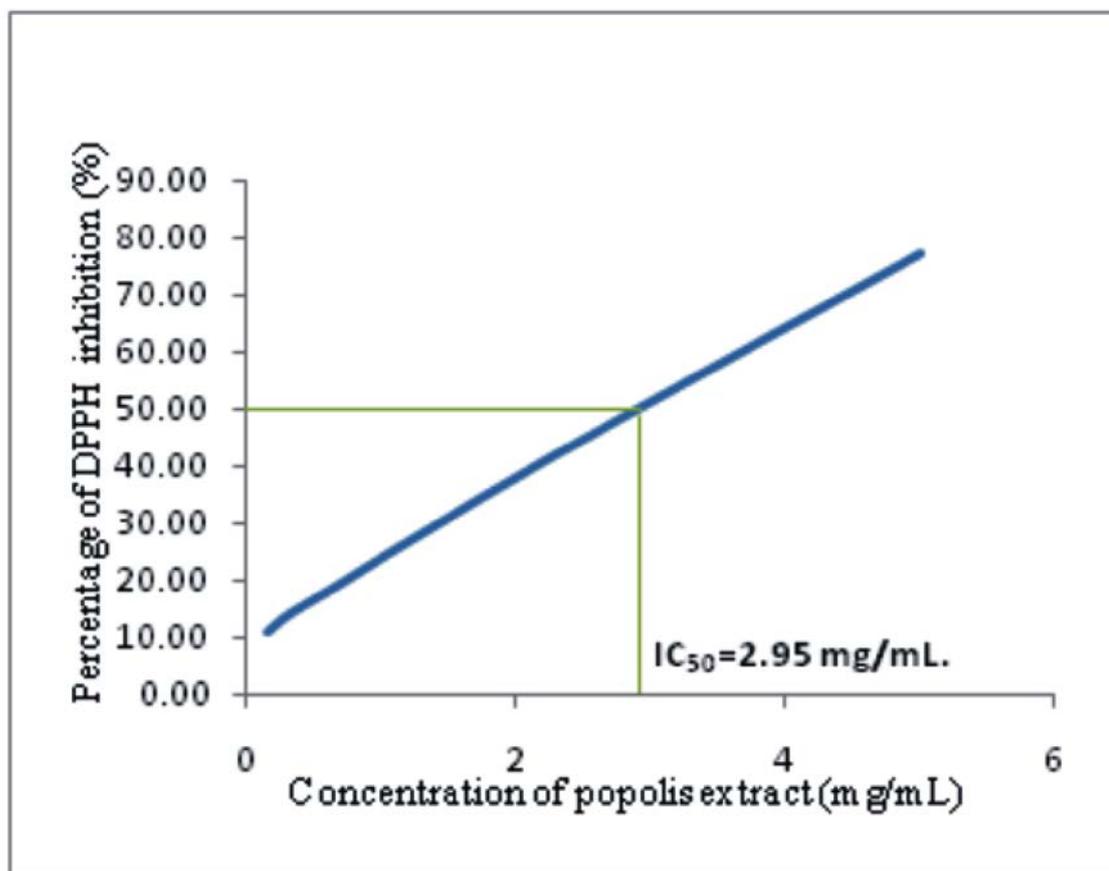
The inoculum was prepared by culturing the microorganisms in nutrient broth at 37°C for 12 hours and a concentration of approximately 1.5 x 10⁸ colony forming units (CFU/ml) used for the antimicrobial analysis (Hayouni et al. 2007). The Agar-well diffusion method was performed by spreading each bacterial suspension over the surface of Mueller-Hinton agar plates containing four wells of 6 mm diameter. Wells were filled with approximately 30 µL of each of the extract concentrations used (625, 1250, 2500, 5000 ug/mL). Ethanol was used as a control test. While the antibiogram were performed by the disc diffusion method using commercial antibiotic discs (Gentamicin, Cefazolin, Cefotaxime, and Pipemidic acid) of 6 mm diameter deposited in the previously prepared Petri dishes. The plates were incubated at 37°C for overnight. The results were expressed in terms of the diameter of the inhibition zone and sterile water used as control (Kaushik et al. 2010).

RESULTS

As shown in Table 1, the hydroalcoholic extraction of propolis using maceration method allows us to calculate the extraction yields (18.2%) expressed in percentages relative to the initial weight. The total phenol content was determined as Gallic acid equivalent in milligram per gram dry residue (113.65±2.41 mg GAE/mg DS.), while total flavonoid was calculated as catechin equivalent in milligram per gram dry residue (0.072±0.039 mg CE/g DS.). In addition, the antioxidant activity of the propolis extract against the DPPH radical was measured by tracking the reduction of this radical, which is accompanied by the passing of the purple color (DPPH-) to the yellow color (DPPH-H) at 515 nm. Thus, the hydroethanol extract of propolis has a significant capacity to trap the DPPH radical, as shown in Figure 1, with an inhibitory concentration of IC₅₀=2.95 mg/mL.

Table 1. Results extraction yield, total phenol, and total Flavonoid.

Parameters	Extraction yield (%)	Polyphenols (mg GAE/g RS)	Flavonoids (mg CE/g RS)
Propolis hydroalcoholic extract	18.2%	113.65±2.41	0.072±0.039

**Figure 1. Results of DPPH radical-scavenging activity**

Figures 2, 3 and 4 reflect the results of the inhibition tests carried out by agar well diffusion and antibiotics disk diffusion methods and showed a strong antibacterial activity of propolis extract at the concentration of 5000 $\mu\text{g/mL}$ with inhibition zones of 22.5 ± 1.67 mm and 25.5 ± 0.50 mm against *S. aureus*, and *E. coli* respectively. At the two concentrations of 2500 and 1250 $\mu\text{g/mL}$ the extract exhibit the same activity with inhibition zones of 20.5 ± 0.33 mm and 14.5 ± 0.33 mm against *S. aureus*, and *E. coli* respectively. While for the concentration of 625 $\mu\text{g/mL}$ the propolis extract had more effect on *S. aureus* with an inhibition zone of 12 ± 0.00 mm, and an inhibition zone of 10.5 ± 3.00 mm

against *E. coli*. These results were compared to those of antibiotics which showed inhibition zones against *E. coli*, and *S. aureus* respectively expressed as follows: GEN (31 ± 1.00 mm and 35 ± 0.50 mm), CZ (14.5 ± 0.33 mm and 24.50 ± 0.35 mm), CT (10.50 ± 0.33 mm and 11 ± 0.67 mm), and PI (06 ± 0.00 mm and 35 ± 0.50 mm), where it has been found that the efficacy of propolis extract exceeds that of the two ATBs belonging to the cephalosporin family (CZ and CT of the 1st and 2nd generation respectively) and the Quinolones family (PI of the 1st generation).

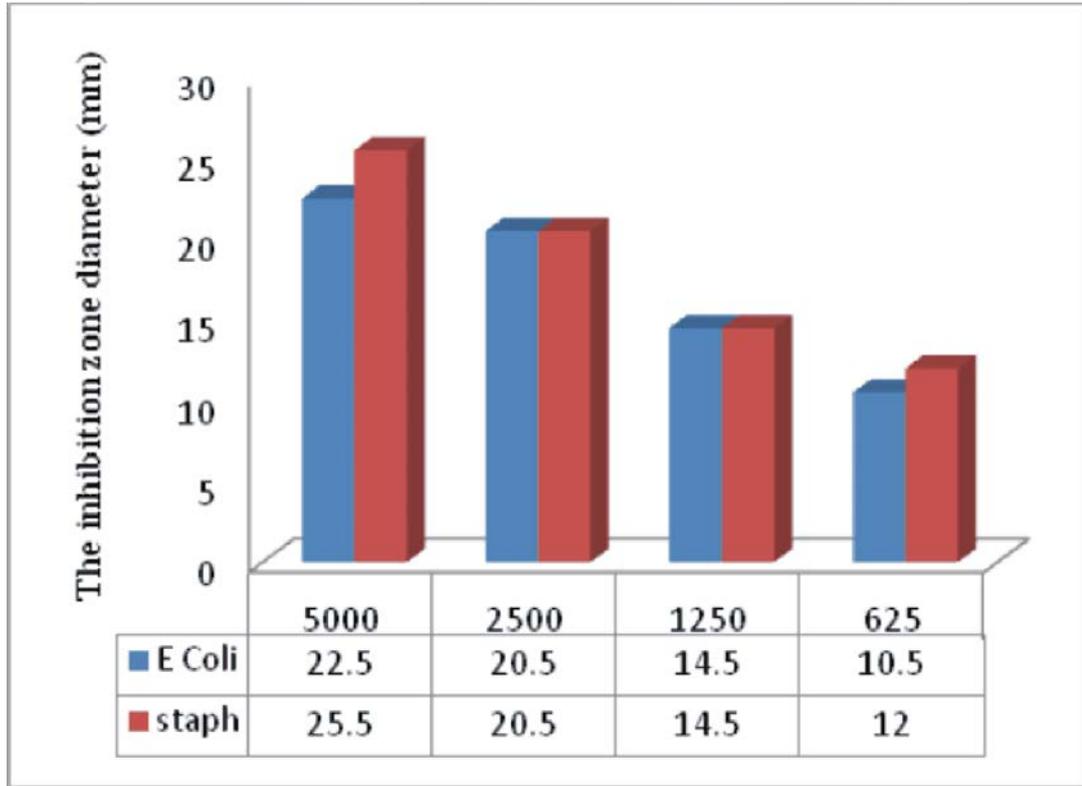


Figure 2. Results of the antibacterial activity of propolis extract.

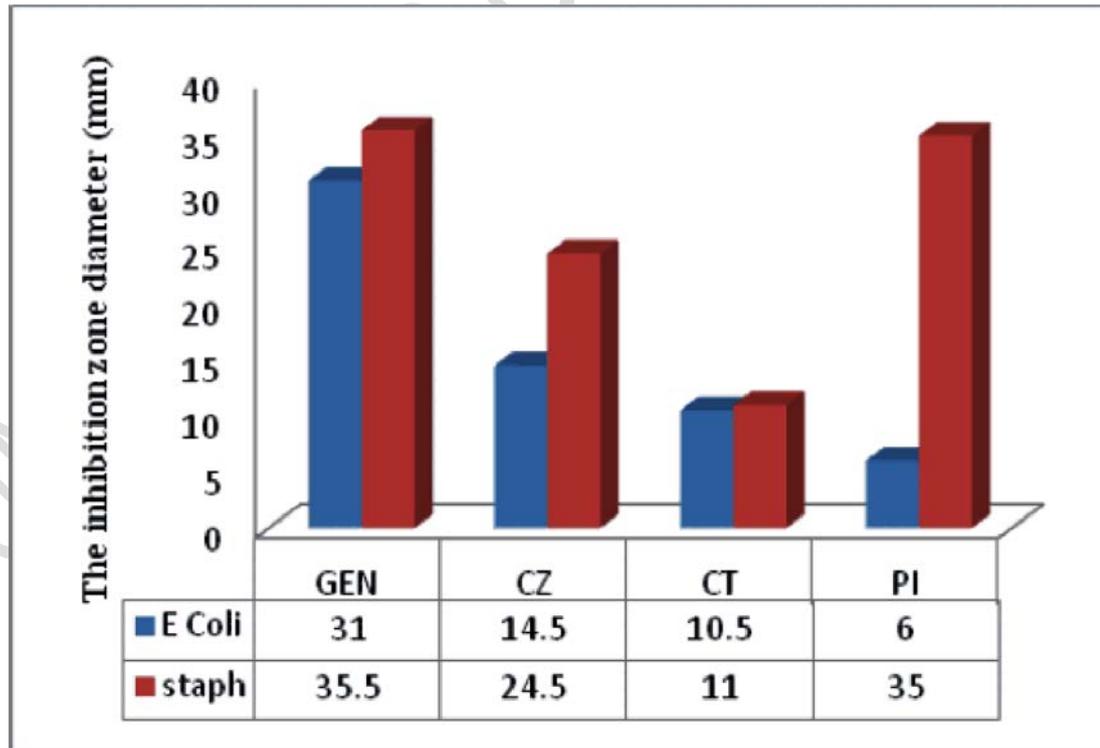


Figure 3. Results of the antibacterial activity of the tested antibiotics: Gentamicin (GEN), Cefazolin (CZ), Cefotaxime (CT), and Pipemidic acid (PI).

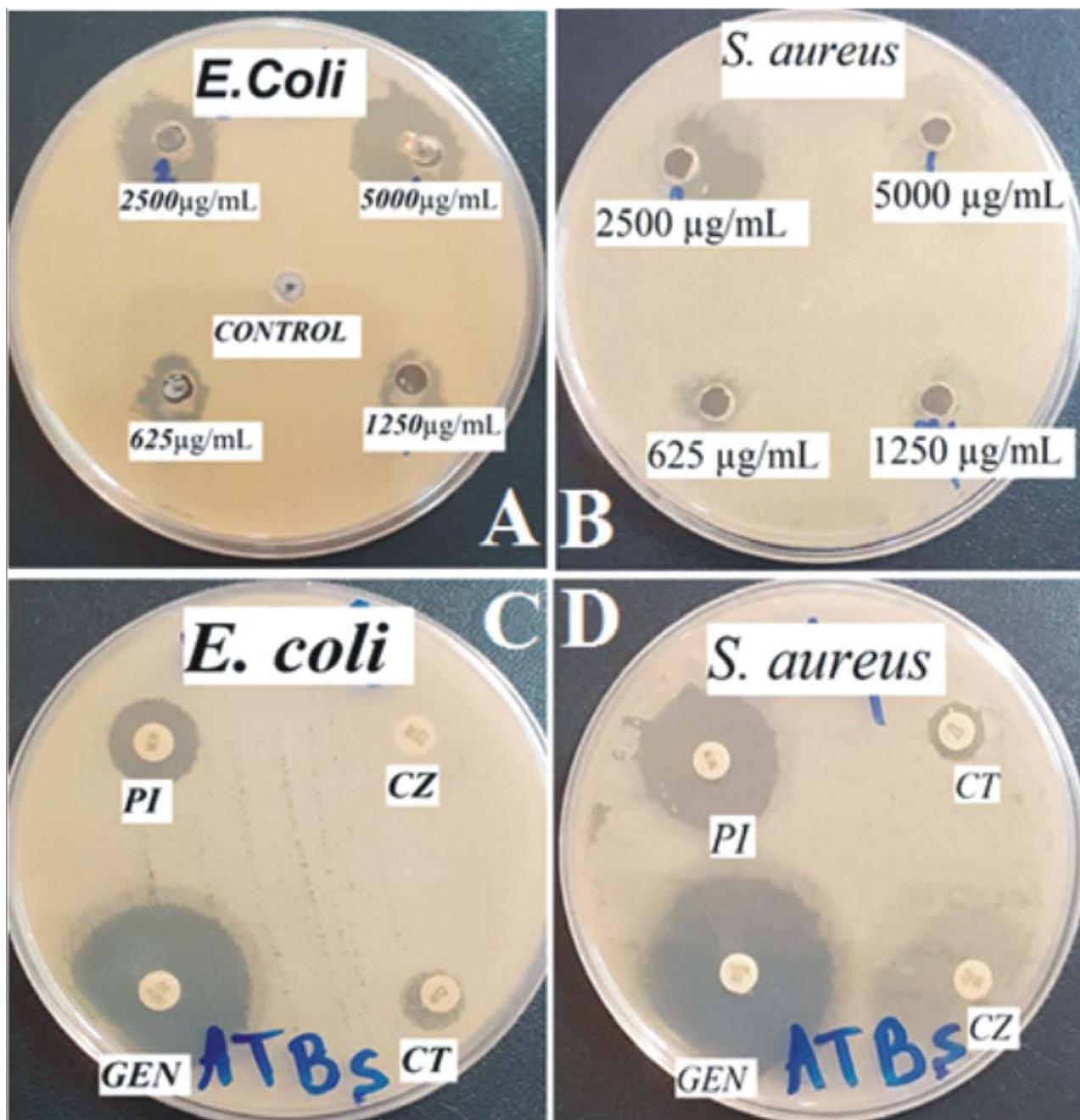


Figure 4. The antibacterial activity by Agar-well diffusion, and antibiotics disk methods.

A and B: Propolis antibacterial activity against *E. coli*, and *S. aureus* respectively.

C and D: Antibiotics antibacterial activity against *E. coli*, and *S. aureus* respectively.

DISCUSSION

The results of this study revealed that the hydroethanol extraction of propolis obtained by maceration during a period of 24 hours resulted in an important extraction yield evaluated to 18% and that the dry residue obtained contained a significant amount of total phenols estimated at 113.65 ± 2.41 mg GAE/g DR, with a negligible

flavonoid content of 0.072 ± 0.039 mg CE/g DR. Indeed, our results are in agreement with those of Socha et al. (2015) who showed in their study conducted to estimate the phenolic composition and the antioxidant activity of propolis from various regions of Poland that the total phenolic content of propolis samples ranged from 150.05 to 197.14 mgGAE/g, while the total flavonoid content was 35.64-62.04 mgQE/g. They add that

the dominant phenolic acid was p-coumaric acid, and ferulic acid. While, among the flavonoids, chrysin, naringin and galangin were dominant. On the other hand, the study of Segueni et al. (2021) shows after the analysis of two samples of propolis of Algerian and Turkish origin that the levels of phenolic compounds are lower than ours findings, varying from 19.51 ± 0.86 to 219.66 ± 1.23 mg GAE/g for total phenols and from 5.27 ± 0.07 to 74.57 ± 1.03 QE/g for flavonoids. Similarly, a study carried out on the effects of different ethanol concentrations (20, 50, 80%) on the total phenolic content and total flavonoid content in Malaysian propolis also shows low levels compared to our study where the highest TPC and TFC were recorded at 80% ethanol, i.e. 8.898 mg GAE/ml and 0.034 mg QE/ml respectively (Yusof et al. 2020). Freires et al. (2018) explain that the main compound categories present in propolis are phenolics and flavonoids. However, propolis composition varies significantly depending on geographical region and collecting season. Furthermore, the antioxidant activity of propolis extract against the DPPH radical which is measured by following the reduction of this radical, which is accompanied by the change from purple colour (DPPH-) to yellow colour (DPPH-H) measured by a spectrophotometer at 515 nm shows that the hydroethanol extract of propolis has a significant capacity to scavenge the DPPH radical, with an inhibitory concentration of $IC_{50} = 2.95$ mg/mL. These findings are in agreement with those of Mihai and Mărghitaş (2010) which indicate an antioxidant capacity of Transylvanian propolis that varies between 1.67mg/ml and 3.28mg/ml. However, our results remain low compared to a study conducted on the DPPH radical scavenging activity of Cameroonian propolis which showed that the radical scavenging activity varied from the Hexane extract of Fouban propolis ($IC_{50} = 5.6$ mg/mL) to the Methanol extract of Fouban propolis ($IC_{50} = 1.07$ mg/mL) for the extracts and from 3 β -hydroxy lanostan-9,24-dien-21-oic acid ($IC_{50} = 1.22$ mg/mL) compared to those of the standard antioxidants gallic acid ($IC_{50} = 0.30$ mg/mL) and vitamin C ($IC_{50} = 0.80$ mg/mL) (Talla et al. 2017). Whereas, the results of the inhibition tests carried out by agar well diffusion showed a strong antibacterial activity of propolis extract at the concentration of 5000 μ g/mL with

inhibition zones of 22.5 ± 1.67 mm and 25.5 ± 0.50 mm against *E. coli*, and *S. aureus* respectively. At the two concentrations of 2500 and 1250 μ g/mL the extract exhibit the same activity with inhibition zones of 20.5 ± 0.33 mm and 14.5 ± 0.33 mm against *S. aureus*, and *E. coli* respectively. While for the concentration of 625 μ g/mL the propolis extract had more effect on *S. aureus* with an inhibition zone of 12 ± 0.00 mm, and an inhibition zone of 10.5 ± 3.00 mm against *E. coli*. Indeed, the antibacterial activity obtained in our results exceeds that found in the study carried out by Motior and Co (Rahman et al. 2010) on the antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with moderate zone inhibition of 13.0 ± 0.09 to 15.0 ± 0.11 mm against these two bacteria respectively using a concentration (5.48 mg ml⁻¹) close to the one used in our study. They also suggest that *S. aureus* is more sensitive to the effect of propolis than its Gram-negative counterpart *E. coli*. Similarly, Arum et al (2020)(Lestari et Permana, 2020) in their study to determine the effect of propolis on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria at different concentrations (30%, 50%, 70% and 90%) confirms that propolis has an inhibitory effect on the growth of *S. aureus* colonies with the best concentration value of 90%, while it has no effect on *E. coli* colonies. These findings are in disagreement with our results, as the extract used in our study had a good effect on both bacterial strains (gram negative and positive). In addition, these results were compared to those of antibiotics which showed inhibition zones against *E. coli*, and *S. aureus* respectively expressed as follows: GEN (31 ± 1.00 mm and 35 ± 0.50 mm), CZ (14.5 ± 0.33 mm and 24.50 ± 0.35 mm), CT (10.50 ± 0.33 mm and 11 ± 0.67 mm), and PI (06 ± 0.00 mm and 35 ± 0.50 mm), where it has been found that the efficacy of propolis extract exceeds that of the two ATBs belonging to the cephalosporin family (CZ and CT of the 1st and 2nd generation respectively) and the Quinolones family (PI of the 1st generation).

CONCLUSION

The increase in bacterial resistance to synthetic antibiotics, as well as the potential risk of drug transfer via breast milk, has prompted

the search for alternative antibacterial drugs. This research has shown that Algerian propolis may be an appropriate substitute of these synthetic drugs due to its high phenolic acid content, which gives it a powerful antioxidant and especially antibacterial effect against gram positive and negative bacteria.

Conflicts of Interest

Authors have declared that they have no competing interests.

REFERENCES

- Barlow J. (2011). Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 16(4): 383-407.
- Betzold CM. (2007). An update on the recognition and management of lactational breast inflammation. *Journal of Midwifery & Women's Health* 52(6): 595-605.
- Bruschi ML, Rosseto HC, de Francisco LM., de Toledo LDA, Raphaela RDA. (2017). Nanostructured propolis as therapeutic systems with antimicrobial activity. *Nano-and Microscale Drug Delivery Systems*, Elsevier: 377-391.
- Desai C. (2016). Meyler's side effects of drugs: The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. *Indian Journal of Pharmacology* 48(2): 224.
- Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K. (2002). Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *American journal of epidemiology* 155(2): 103-114.
- Freires IA, Pinguero JM, Miranda SL, Bueno-Silva B. (2018). Red propolis: Phenolics, polyphenolics, and applications to microbiological health and disease. *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease*, Elsevier: 293-300.
- Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chemistry* 105(3): 1126-1134.
- Jahanfar S, Ng CJ, Teng CL. (2009). Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (1): 1-15.
- Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Joloba ML. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PloS one* 8(5): e63413.
- Kaushik P, Goyal P, Chauhan A, Chauhan G. (2010). In vitro evaluation of antibacterial potential of dry fruit extracts of *Elettaria cardamomum* Maton (Chhoti Elaichi). *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 9(3): 287.
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(22): 6509-6515.
- Lestari ALD, Permana A. (2020). DAYA HAMBAT PROPOLIS TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*. *Jurnal Pro-Life* 7(3): 237-250.
- Mathew J. (2004). Effect of maternal antibiotics on breast feeding infants. *Postgraduate medical journal* 80(942): 196-200.
- Mihai CM, Mărghitaş LA. (2010). Antioxidant Capacity of Transylvanian Propolis. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies* 67.
- Mitchell KB, HM. Johnson (2022). Breast Conditions in the Breastfeeding Mother. *Breastfeeding*, Elsevier: 572-593.
- Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamed M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food chemistry* 103(4): 1097-1103.
- Mohdaly AA, Mahmoud AA, Roby MH, Smetanska I, Ramadan MF. (2015). Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Biochemistry* 39(5): 538-547.
- Nogacka AM, Salazar N, Arbolea S, Suárez M, Fernández N, Solís G, Gueimonde M. (2018). Early microbiota, antibiotics and health. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(1): 83-91.
- Pascoal A, Feás X, Dias T, Dias LG, Estevinho LM. (2014). The role of honey and propolis in the treatment of infected wounds. *Microbiology for Surgical Infections*, Elsevier: 221-234.
- Rahman MM, Richardson A, Sofian-Azirun M. (2010).

- Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research* 4(18): 1872-1878.
- Sánchez- Moreno C, Larrauri JA, Saura- Calixto F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76(2): 270-276.
- Segueni N, Keskin Ş, Kadour B, Kolaylı S, Salah A. (2021). Comparison between phenolic content, antioxidant, and antibacterial activity of Algerian and Turkish propolis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 24(10): 1679-1687.
- Serairi- Beji R, Aidi Wannes W, Hamdi A, Tej R, Ksouri R, Saidani- Tounsi M, Karray- Bouraoui N. (2018). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Asparagus albus* leaves in carbon tetrachloride- induced liver injury rats. *Journal of Food Biochemistry* 42(1): e12433.
- Socha R, Gałkowska D, Bugaj M, Juszcak L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research* 29(5): 416-422.
- Talla E, Tamfu AN, Gade IS, Yanda L, Mbafor JT, Laurent S, Bankova V. (2017). New mono-ether of glycerol and triterpenes with DPPH radical scavenging activity from Cameroonian propolis. *Natural Product Research* 31(12): 1379-1389.
- Underwood WJ, Blauwiel R, Delano ML, Gillesby R, Mischler SA, Schoell A. (2015). *Biology and diseases of ruminants (sheep, goats, and cattle)*. Laboratory animal medicine, Elsevier: 623-694.
- Wambach KA. (2003). Lactation mastitis: a descriptive study of the experience. *Journal of Human Lactation* 19(1): 24-34.
- Wilson E, Woodd SL, Benova L. (2020). Incidence of and risk factors for lactational mastitis: A systematic review. *Journal of Human Lactation* 36(4): 673-686.
- Yang C, Liu, P, Wang S, Zhao G, Zhang T, Guo S, Deng G. (2018). Shikonin exerts anti-inflammatory effects in LPS-induced mastitis by inhibiting NF-κB signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 505(1): 1-6.
- Yusof N, Munaim MA, Kutty RV. (2020). The effects of different ethanol concentration on total phenolic and total flavonoid content in Malaysian propolis. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, IOP Publishing 991(1): 012033.



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE TAHAR MOULAY SAÏDA



FACULTÉ DES SCIENCES
LABORATOIRE DES RESSOURCES HYDRIQUES ET ENVIRONNEMENT
LA PREMIERE JOURNÉE SCIENTIFIQUE NATIONALE
PHYTODIVERSITÉ ET VALORISATION

26 MARS 2022



Attestation

La présidente de la première journée scientifique Nationale « Phytodiversité et valorisation », atteste que :

Melle/Mme/Mr CHEBLI Kadda

UNIVERSITE SAÏDA

A présenté (e) une communication affichée intitulée : ACTIVITE ANTIBACTERIENNE D'UN EXTRAIT HYDRO-ETHANOLIQUE DE PROPOLIS CONTRE LA MASTITE INDUITE PAR ESCHERICHIA COLI ET STAPHYLOCOCCUS AUREUS CHEZ LES FEMMES ALLAITANTES

Co-auteurs : FAROUK BOUDOU , ABDELKRIM BERROUKCHE

Présidente de la journée



Directeur du laboratoire

