



UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

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 محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

## Thème

**Etude de l'activité antioxydante de quelques variétés de miel locales.**

Présenté par : Ahlem DJAAFRI  
Meriem BOUKEDJAR

Devant le jury :

Président : M<sup>f</sup>. MEKHALFI Hamoudi MAA (Univ de Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Encadrant : M<sup>f</sup>. BELLIK Yuva MCA (Univ de Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Examineur : M<sup>me</sup>. BENOUADAH Zohra MCB (Univ de Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Année universitaire : 2017/2018

## *Remerciements*

*Tout d'abord nous tenons à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la santé, le courage, la volonté et surtout la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*En second lieu nous tenons à remercier infiniment notre promoteur **Mr. Bellik Yuva** pour la confiance qu'il nous a témoigné, ses conseils, ses orientations, ses précieuses remarques constructives, ses encouragements et surtout pour le temps qu'il nous a consacré dans les moments les plus pénibles. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nos vifs remerciements s'adressent également à **Mr. Mekhalfi Hamoudi** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance, à **Mme. Benouadah Zohra** qui a bien voulu accepter d'examiner ce mémoire.*

*Nos chaleureux remerciements s'adressent aussi à **Mr. Dahou Moutassem**, **Mr. Djaafri Louahdi**, **Mr. Mihoub Foued**, **Mr. Rebai Khalil** et **Mr. Dilmi Toufik** pour leur aide précieuse, leur soutien, leur conseil, et leur gentillesse.*

*Nous tenons à remercier aussi l'ensemble du personnel du service de **CTS** et du **service de laboratoire central** de l'Hôpital de Bouzidi lakhdar.*

*Nos remerciements s'adressent également au **Dr. Zaoui** médecin en biologie clinique pour le travail effectué au sein de son laboratoire.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à tous les enseignants et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et qui nous ont encouragé et soutenu à tout moment.*

**MERCI POUR TOUT**



## *Dédicaces*

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

*À*

*Ma très chère mère qui a œuvré pour ma réussite, de part son amour, son soutien,  
son assistance et sa présence dans ma vie ainsi que tous les sacrifices consentis et  
ses précieux conseils, reçois à travers ce travail l'expression de mes sentiments et  
de mon éternelle gratitude.*

*À*

*Mon très cher Père: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le  
dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les  
efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le  
fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation  
le long de ces années.*

*À*

*Mes chers grands parents que dieu les protèges.*

*À*

*Mes frères.*

*À*

*Mes tantes et mes oncles, ainsi que toute ma famille.*

*À*

*À tous mes enseignants depuis mes premières années d'étude.*

*À*

*Mes meilleures amies.*

*À*

*Tous ceux qui j'aime et qui m'aiment.*

*AHLEM*

## *Dédicaces*

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

*A Ma très chère mère qui a œuvré pour ma réussite, de part son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A Mon très cher Père: Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A mes très chères Sœurs*

*A mes très chers Frères*

*A mes très chers amis.*

*A tous les membres de ma promotion.*

*A tous mes enseignants depuis mes premières années d'étude.*

*A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.*

*Meriem*

### Résumé

L'objectif du présent travail est de déterminer les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, ainsi que le potentiel antioxydant et anti-hémolytique de deux variétés de miel récoltées de différentes régions géographiques. La teneur en phénols totaux a montré que le miel de Colla (Miel 2) a une concentration plus élevée que celle de Bir Snab (Miel 1) avec des teneurs de  $1.55 \pm 0.043$  mg EAG/g de miel et de  $0.63 \pm 0.037$  mg EAG/g de miel, respectivement. De même pour les flavonoïdes, le Miel 2 est plus riche que le Miel 1 avec des teneurs de  $0.177 \pm 0.003$  mg EQ/g de miel et de  $0.075 \pm 0.005$  mg EQ/g de miel, respectivement. L'étude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique a été réalisée par la mise en contact des globules rouges humains avec les deux types de miel puis exposés à l' $\text{AlCl}_3$  suivie d'un stress hypo-osmotique. Les résultats obtenus ont montré que le Miel 2 est plus efficace que le Miel 1 en matière de protection des globules rouges et de l'hémoglobine et les deux miels semblent plus efficaces que l'acide ascorbique qui a montré plutôt une activité prooxydante.

**Mots clés :** Miel, Polyphénols, Flavonoïdes, Activité antioxydante, Globules rouges.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد محتويات الفينول والفلافونويد، وكذلك إمكانية مضادات الأكسدة و الانحلال الهبولي للدم لنوعين من العسل التي تم جمعها من مناطق جغرافية مختلفة. أظهر المحتوى الإجمالي للفينولات أن عسل القلة (العسل 2) كان له تركيز أعلى من عسل بئر الصنب (العسل 1) وذلك بمحتويات تقدر ب  $0.043 \pm 1.55$  ملغ مكافئ لحمض الغليك/غرام من العسل على التوالي. و كذلك بالنسبة للفلافونويد ، العسل 2 هو أكثر ثراء من العسل 1 مع محتويات تقدر ب  $0.003 \pm 0.177$  ملغ مكافئ للكيرسيتين/غرام من العسل و  $0.005 \pm 0.075$  ملغ مكافئ للكيرسيتين/غرام من العسل على التوالي. تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة والمضاد لانحلال الدم عن طريق وضع خلايا الدم الحمراء البشرية مع كلا النوعين من العسل ثم تعرضها إلى ثلاثي كلوريد الألومنيوم متبوع بتوتر انخفاض الوسط الخارجي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن العسل 2 أكثر فعالية من العسل 1 في حماية خلايا الدم الحمراء والهيموجلوبين وكلاهما يبدو أكثر فعالية من حمض الأسكوربيك الذي اظهر نشاط مؤيد للأكسدة.

**الكلمات المفتاحية :** العسل، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، كريات الدم الحمراء.

**Abstract**

The present work aims to determine the levels of phenolic and flavonoid compounds, as well as the antioxidant and anti-hemolytic potential of two honey varieties harvested from different geographical regions. The total phenol content showed that Colla honey (Honey 2) had a higher concentration than Bir Snab honey (Honey 1),  $1.55 \pm 0.043$  mg GAE / g vs.  $0.63 \pm 0.037$  mg GAE / g. As same, Honey 2 presented highest content of flavonoids than Honey 1  $0.177 \pm 0.003$  mg EQ/g vs.  $0.075 \pm 0.005$  mg EQ/g. The evaluation of antioxidant and anti-hemolytic activity was performed by incubating human red blood cells with both honeys and then exposed to  $AlCl_3$  followed by hypo-osmotic stress frigidisation. The results showed that Honey 2 is more effective than Honey 1 in protecting of red blood cells and hemoglobin. Both honeys seem to be more effective than ascorbic acid which showed a prooxidant activity.

**Key words:** Honey, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant activity, Red Blood Cells.

# Sommaire

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction générale**.....1

## **Partie Bibliographique**

**Chapitre I : Généralité sur le miel**.....3

I.1. Définition du miel.....3

I.2. Origine du miel.....3

I.2.1. Le miel du nectar.....3

I.2.2. Le miel du miellat.....3

I.3. Composition du miel.....4

I.4. Types de miel.....5

I.4.1. Origine botanique

I.4.1.1. Miels monofloraux

I.4.1.2. Miels polyfloraux.....5

I.4.2. Origine géographique.....5

I.5. Les caractéristiques du miel.....5

I.5.1. Les caractéristiques physico-chimiques.....5

I.5.2. Les caractéristiques nutritionnelles.....6

I.6. Les activités biologiques du miel.....7

I.6.1. Pouvoir antioxydant.....7

I.6.2. Activité antimicrobienne.....	7
I.6.3. Les propriétés antifongiques, antivirales et antiparasitaires.....	8
I.6.4. Propriétés cicatrisantes.....	8
I.6.5. Effets anti tumoraux et antimutagènes.....	8
<b>Chapitre II : Radicaux libres, le stress oxydant et les antioxydants.....</b>	<b>9</b>
II.1. Radicaux libres.....	9
II.2. Le stress oxydant.....	9
II.3. Les antioxydants.....	11
II.3.1. Systèmes de défense.....	11
II.3.1.1. Systèmes enzymatiques.....	11
II.3.1.2. Systèmes non enzymatiques.....	12
II.4. Modèles d'étude du stress oxydant.....	14
II.4.1. Le globule rouge.....	14
II.4.1.1. Définition.....	14
II.4.1.2. La membrane érythrocytaire.....	14
II.4.2. Globules rouges et stress oxydant.....	15

## **Partie Expérimentale**

<b>Chapitre III : Matériels et méthodes.....</b>	<b>16</b>
III.1. Matériels.....	16
III.1.1. Echantillons.....	16
III.1.1.1. Miels.....	16
III.1.1.2. Sang.....	16
III.1.2. Réactifs et standards.....	17
III.2. Méthodes.....	17

III.2.1. Préparation des échantillons de miel.....	17
III.2.2. Dosage des molécules bioactives.....	17
III.2.2.1. Dosage des phénols totaux.....	17
III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	18
III.2.3. Etude de l'activité antioxydante et anti hémolytique des extraits de miel.....	19
III.2.3.1. Préparation du sang isotonique.....	19
III.2.3.2. Mesure de la turbidité cellulaire.....	19
III.2.3.2. Dosage de l'hémoglobine libérée.....	20
III.2.3.3. Etude de la cinétique de dénaturation de l'hémoglobine.....	21
III.2.3.4. Etude microscopique.....	22
III.3. Analyse statistique.....	22
<b>Chapitre IV: Résultats et discussion.....</b>	<b>23</b>
IV.1. Teneur en substances actives.....	23
IV.1.1. Teneur en phénols totaux.....	23
IV.1.2. Teneur en flavonoïdes.....	24
IV.2. Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de miel.....	24
IV.2.1. Turbidité cellulaire.....	24
IV.2.2. Concentration en hémoglobine extracellulaire.....	25
IV.2.3. Etude de la cinétique de dénaturation de l'hémoglobine.....	26
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>29</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexe**

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium ou chlorure d'aluminium.

**ANOVA** : Analyse de la variance.

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**Aw** : Activité de l'eau (représente la pression de vapeur d'eau p d'un produit humide divisée par la pression de vapeur saturante à la même température).

**CAT** : Catalase.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**Cu** : Cuivre.

**ERA** : Espèce réactive d'azote.

**ERO** : Espèce réactive d'oxygène.

**FAO** : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

**F-C** : Folin-Ciocalteu.

**Fe** : Le fer.

**GAE** : Équivalent à l'acide gallique.

**GPx** : Glutathion peroxydase.

**GR** : Globules rouges.

**GSH** : Glutathion réduit.

**GSSG** : Glutathion disulfure.

**Hb** : Hémoglobine.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée.

**LDL** : Low Density Lipoprotein.

**Mn** : Manganèse.

**NaCl** : Chlorure de sodium.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : Anion superoxyde.

**O<sub>2</sub>** : Oxygène.

**QE** : Equivalent de quercétine.

**ROOH** : Hydroperoxydes lipidiques.

**ROO<sup>•</sup>** : Radical peroxyde.

**rpm** : Rotation par minute.

**Se** : Sélénium

**SH** : Le groupement sulfhydryle.

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**Test t** : Test de Student.

**UV** : Ultra violet.

**Zn** : Zinc.

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Intitulé</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Composition du miel (données en g/100)	4
<b>II</b>	Les caractéristiques physico-chimiques du miel	6
<b>III</b>	Les différents types d'espèces réactives	9
<b>IV</b>	Origine géographique des miels	16

## Liste des figures

Figure	Intitulé	Page
1	Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination des radicaux libres	10
2	Sources endogènes et exogènes du stress oxydant	10
3	Vitamine C ( <b>AscH-</b> ) interagissant avec le radical peroxyde ( <b>ROO·</b> ) et régénération de la vitamine E par la vitamine C	12
4	Structure de base des flavonoïdes	13
5	Echantillons de miel	16
6	Echantillons de sang	16
7	Préparation des échantillons de miel	17
8	Préparation du sang isotonique	19
9	Protocole expérimental de l'évaluation de l'activité hémolytique	20
10	Protocole de l'étude de la cinétique de dénaturation de l'hémoglobine	21
11	Teneur en polyphénols totaux des deux échantillons de miel	23
12	Teneur en flavonoïdes des deux échantillons de miel	24
13	Histogrammes montrant la turbidité cellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du trichlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> à 100 mmol/l). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type.	25
14	Histogrammes montrant la concentration en hémoglobine extracellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du trichlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> à 100 mmol/l). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type.	26
15	Cinétique de dénaturation de l'hémoglobine en fonction du temps en présence des échantillons de miels et de l'acide ascorbique et sous l'action du trichlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> à 100 mmol/l). Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type	27
16	Photos des frottis sanguins de chaque essai vus sous microscope électronique (10X100)	27

# **Introduction générale**

### Introduction générale

L'aluminium (Al), le troisième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, est un métal non essentiel et toxique sur les êtres humains (**Schetinger *et al.*, 2002**). Il a un accès à l'organisme via le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires, et peut être trouvé pratiquement dans tous les tissus des mammifères, y compris le cerveau, le foie, les reins, le cœur, le sang et les os (**Domingo *et al.*, 1991 ; Yokel, 2000**).

Les sources particulières d'aluminium incluent les produits alimentaires tels que le maïs, le fromage jaune, le sel, les herbes, les épices, le thé, les produits cosmétiques, les ustensiles et les récipients de cuisine (**El-Demerdash, 2004**). Il est aussi présent dans les médicaments, les additifs alimentaires et les dentifrices (**Ochmanski et Barabasz, 2000 ; Abbasali *et al.*, 2005**). De plus, il est ajouté à l'eau potable pour des fins de purification (**Ochmanski et Barabasz, 2000**).

Jusqu'à aujourd'hui, aucune fonction biologique n'a été affectée à ce métal. Au contraire, l'accumulation de l'aluminium dans les tissus et les organes entraîne leur toxicité et leur dysfonctionnement (**Sandra *et al.*, 2008**). Plusieurs maladies comme la démence par dialyse, les encéphalopathies, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'ostéomalacie et l'anémie microcytaire ont été associées à des niveaux élevés en aluminium (**Jeffery *et al.*, 1996 ; Jaffe *et al.*, 2005 ; Bondy, 2010**).

Les effets toxiques de l'aluminium sur les globules rouges ont été suggérés pour être dus à la génération des radicaux libres et l'induction du stress oxydant (**El-Demerdash *et al.*, 2004**), ce qui entraîne la détérioration oxydative des lipides (peroxydation lipidique), des protéines et des glucides (**El-Demerdash *et al.*, 2004 ; Mansour *et al.*, 2006**). Il peut aussi diminuer le nombre de globules rouges et la concentration en hémoglobine (**Buraimoh *et al.*, 2011, Buraimoh *et al.*, 2012**).

La capacité des substances naturelles à assurer une protection efficace contre les radicaux libres a été maintes fois proposée et démontrée par la communauté scientifique. Le miel est l'un des produits naturels qui a accompagné l'homme depuis la plus haute antiquité. Cet élixir précieux est élaboré par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des fleurs et du miellat (**Azeredo *et al.*, 2003**). Le miel a des propriétés curatives et ceci est dû essentiellement à sa composition chimique (**Arvanitoyannis *et al.*, 2005 ; Nayik et Nanda, 2015**). Il contient des quantités abondantes de polyphénols et de flavonoïdes qui lui confèrent de bonnes propriétés antioxydantes (**Beretta *et al.*, 2005 ; Alzahrani *et al.*, 2012**).

Par ailleurs, plusieurs études scientifiques indiquent une grande variété d'activités pharmacologiques du miel, en particulier des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et antivirales (Al-Waili, 2004 ; Kanatt *et al.*, 2007 ; Shahzad et Cohrs, 2012). Il est utilisé pour le traitement des plaies (Molan, 1999), des brûlures (Molan, 2001), des ulcères de la peau (Lasey et Van Rij, 1997) et pour l'inflammation (Candiracci, 2012). D'ailleurs, la propriété de guérison par le miel est stipulée par le verset coranique "Nahl" : "Puis mangez de toute espèce de fruits et suivez les sentiers de votre Seigneur, rendus faciles pour vous. De leur ventre, sort une liqueur, aux couleurs variées, dans laquelle il y a une guérison pour les gens. Il y a vraiment là une preuve pour des gens qui réfléchissent" (Coran, 16:69).

" ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا ۗ يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ " الآية 69 من سورة النحل.

Dans le cadre du présent travail nous nous proposons d'étudier les propriétés antioxydantes du miel sur le globule rouge humain. Notre démarche consiste, d'une part, en l'extraction des substances actives de deux variétés de miel avec dosage de leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes, et d'autre part, l'étude de l'effet de ces substances sur la résistance des hématies au stress hypotonique sous l'action du chlorure d'aluminium.

# **Partie Bibliographique**

## **Chapitre I**

## I. Généralités sur le miel

### I.1. Définition du miel

Selon la commission du codex alimentarius FAO le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles *Apis mellifera* (Apidæ) à partir du nectar de plantes ou à partir de sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivantes des plantes, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche (**Codex alimentarius, 2001**).

### I.2. Origine du miel

Le miel est élaboré par les abeilles à partir de plantes mellifères, et plus précisément, de leur sève. Cette dernière est extraite de deux manières des vaisseaux qui la contiennent: par les nectaires qui élaborent le **nectar**, ou par les insectes parasites qui excrètent du **miellat** (**Cavelier, 2013**).

#### I.2.1. Le miel du nectar

Le nectar est un liquide sucré plus ou moins doux sécrété par les glandes nectarifères des plantes supérieures (**Hoyet, 2005**). Il est constitué essentiellement des glucides (5 à 75 %), des acides aminés, des protéines, des lipides, des flavonoïdes, des vitamines, des pigments et des enzymes (**Meda et al., 2005**). Sa production dépend de l'âge, la taille et la position de la fleur mais également de l'humidité relative de l'air et du milieu environnant (**Sanz et al., 2008**).

#### I.2.2. Le miel du miellat

Le miellat est une substance sucrée élaborée par divers insectes piqueurs et suceurs (les hémiptères) tels que les pucerons, les psylles et les cochenilles. (**Hoyet, 2005 ; Rodriguez- Flores et al., 2015**). Il est constitué d'azote, d'acides organiques, de minéraux et de sucres complexes et il est plus dense que le nectar (**Desmoulière, 2013**). Les insectes aspirent la sève de divers arbres ou arbustes et excrètent par l'anus l'excès de sucres et d'eau qu'elle contient. Le miellat ainsi produit sur les végétaux est récolté par les abeilles butineuses puis transformé en miel (**Cavelier, 2013**).

### I.3. Composition du miel

Le miel est un aliment complexe qui regroupe environ 200 substances (**Escuredo et al., 2013**). Il est constitué principalement de sucres, d'eau et de divers autres constituants tels que les enzymes, les acides aminés, les acides organiques, les caroténoïdes, les vitamines (à l'exception de la vitamine A), les sels minéraux et les substances aromatiques ainsi que des particules solides dérivées de la récolte du miel (**Pontes et al., 2007 ; Ciulu et al., 2011 ; Alqarni et al., 2012**). Le tableau I représente la composition du miel.

**Tableau I :** Composition du miel (données en g/100) (**Arvanitoyannis et al., 2005 ; Alvarez-Suarez et al., 2010**).

Nutriments	Quantité moyenne par 100 g
Eau	17.1 g
Glucides	82.4 g
Fructose	38.5 g
Glucose	31.0 g
Maltose	7.2 g
Saccharose	1.5 g
Protéines et acides aminés	0.5 g
Vitamines	
Thiamine	<0.01 mg
Riboflavine	<0.3 mg
Niacine	<0.3 mg
Acide Pantothénique	<0.25 mg
Vitamine B6	<0.002 mg
Folate	<0.01 mg
Vitamine C	<0.5 mg
Minéraux	
Calcium	4.8 mg
Fer	0.25 mg
Zinc	0.15 mg
Potassium	50 mg
Phosphore	5 mg
Magnésium	2 mg
Sélénium	0.01 mg
Cuivre	0.05 mg
Chrome	0.02 mg
Manganèse	0.15 mg
Cendre	0.2g

Enzymes	Réaction sur
Invertase	Saccharose
Glucose-Oxydase	Glucose
Diastase (amylase)	Amidon
Catalase	Peroxyde d'hydrogène
Microorganismes	Toxine produite
C.botulinum	A, B, C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , D, E, F, G
C.butiryum	E
C.barati	F

## I.4. Types de miel

Le miel peut être classé essentiellement en fonction de son origine botanique ou géographique:

### I.4.1. Origine botanique

#### I.4.1.1. Miels monofloraux

Les miels monofloraux sont élaborés à partir du nectar et/ou du miellat provenant d'une seule espèce végétale et cela nécessite d'installer les ruches à proximité de la plante recherchée. Par exemple : le miel d'acacia, d'oranger ou de la lavande (**Rossant, 2011**).

#### I.4.1.2. Miels polyfloraux

Les miels polyfloraux sont produits à partir du nectar et/ou du miellat venant de plusieurs espèces végétales. Pour valoriser leur spécificité et permettre au consommateur de reconnaître leur caractère dominant, les apiculteurs indiquent leur origine géographique. Celle-ci indique soit l'aire de production, la région, le département, le massif, etc (**Rossant, 2011**).

### I.4.2. Origine géographique

La réputation particulière de certains miels polyfloraux dépend de leur origine géographique, qu'il s'agisse d'une petite région, d'une province ou d'un continent. (**Emmanuelle et al., 1996**).

## I.5. Les caractéristiques du miel

### I.5.1. Les caractéristiques physico-chimiques

Les différentes caractéristiques physico-chimiques du miel sont représentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II** : Les caractéristiques physico-chimiques du miel (**White 1975 ; Arvanitoyanni et al., 2005**).

Les caractéristiques physico-chimiques	Valeur/Gamme
Chaleur spécifique	0.54-0.60 cal/g/°C (Pour le miel liquide) 0.73 cal/g/°C (Pour le miel cristallisé)
Point de congélation	-1.42 à -1.53 °C (15% Solution de miel) -5.8 °C (68% Solution de miel)
Poids spécifique (à 20 °C)	1.4350 (15% H <sub>2</sub> O) 1.4171 (18% H <sub>2</sub> O)
Indice de réfraction (à 20 °C)	1.4966 (16% H <sub>2</sub> O) 1.4927 (17.5% H <sub>2</sub> O) 1.4900 (18.6% H <sub>2</sub> O)
Activité de l'eau (4-37 °C)	0.5 (16% H <sub>2</sub> O) 0.6 (18.3% H <sub>2</sub> O)
Conductivité thermique	118 to 143x10 Cal/cm <sup>2</sup> /sec/°C
Valeur calorique	1380 cal/lb (304 cal/100 g)
pH	3.9
Arôme et saveur	Doux, Nectar de girofle, Vert, Cannelle épicée, cireux, fleuri, parfum, anis, parfum de mélasse, pointu, citron, chimique/médicinal

### I.5.2. Les caractéristiques nutritionnelles

Le miel, en tant qu'aliment glucidique et au goût agréable, est une source précieuse de glucides et contient des oligo-éléments et apporte une diversité nutritionnelle dans les régimes alimentaires trop pauvres. Il possède de nombreux avantages nutritionnels et énergétiques lui

conférant souvent une place importante dans la préparation des plats traditionnels (**Bradbear, 2005 ; Blanc, 2010**).

## **I.6. Les activités biologiques du miel**

Le miel est très connu dans la consommation humaine comme source d'aliment naturel mais également utilisé comme médicament depuis l'antiquité dans de nombreuses cultures et communautés (**Ojeda de rodríguez *et al.*, 2004 ; Ndife *et al.*, 2014**). Ces vertus thérapeutiques sont attribuées à son activité antioxydante et antibactérienne, il est utilisé pour le traitement des brûlures, des désordres gastro-intestinaux, de l'asthme et des ulcères de peau (**Al-Mamary *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2009**). Administré par voie buccale, le miel peut guérir ou soulager l'insomnie, les maux de gorge et certaines infections gastriques. Il augmente aussi la teneur du sang en hémoglobine et la vigueur musculaire (**Jean-prost, 2005**).

### **I.6.1. Pouvoir antioxydant**

Le miel est une source naturelle en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques tels que la catalase, la glucose-oxydase, l'acide ascorbique, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les caroténoïdes, l'acide gluconique, les acides organiques, les acides aminés et les protéines (**Ferreira *et al.*, 2009 ; Beretta *et al.*, 2005**).

### **I.6.2. Activité antimicrobienne**

Le potentiel antibactérien du miel varie selon l'origine botanique du nectar, du miellat et de la teneur en différents antioxydants (**Al-Mamary *et al.*, 2002**). Le miel a de puissants effets antimicrobiens contre les microorganismes pathogènes et non pathogènes (levures et champignons), même contre ceux qui ont développé une résistance à de nombreux antibiotiques. Les effets antimicrobiens peuvent être bactériostatiques ou bactéricides selon la concentration utilisée (**Manyi-Loh *et al.*, 2011**).

L'osmolarité, l'acidité, les inhibines non-peroxydes, le méthylglyoxal (MGO) et la défensine, sont les facteurs antibactériens du miel. Le principal facteur puissant étant le peroxyde d'hydrogène ou l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) provenant de l'oxydation du glucose en acide gluconique sous l'action de l'enzyme glucose-oxydase sécrétée par les glandes hypopharyngiennes des abeilles (**Avisse, 2014**).

### **I.6.3. Les propriétés antifongiques, antivirales et antiparasitaires**

A l'instar des bactéries, parasites et virus, les champignons microscopiques sont des microbes qui s'attaquent aux êtres vivants.

Le miel s'avère efficace contre les champignons filamenteux tels que les dermatophytes à l'origine des mycoses très communes chez l'homme. Il possède un pouvoir antiviral inhibant in vitro les virus de *Rebella* (ou Rubivirus : virus de la rubéole) et de l'*Herpes* (maladie responsable d'affections de la peau et des muqueuses).

Le miel présente également des propriétés antiparasitaires. Il inhibe les différentes espèces du parasite *Leishmania* qui provoquent des affections cutanées ou viscérales invalidantes, voire mortelles si elles ne sont pas soignées (**Avisse, 2014**).

### **I.6.4. Propriétés cicatrisantes**

La propriété cicatrisante du miel fait l'objet de nombreuses études cliniques à travers le monde quelque soit leurs origines: plaies post opératoires, brûlures, ulcères et escarres (**Couquet et al., 2013**). Le miel favorise une guérison plus rapide des plaies grâce à ses effets régénératifs sur la croissance tissulaire et épithéliale, avec peu ou pas de formation de cicatrices (**Misirlioglu et al.,2003 ; Al-Waili et al., 2011**). Il stimule également la formation dans la couche profonde de la peau de nouveaux vaisseaux capillaires et la croissance des fibroblastes, et des cellules productrices de collagène permettant une bonne cicatrisation (**Knox, 2004**).

### **I.6.5. Effets anti tumoraux et antimutagènes**

Le miel a des propriétés anticancéreuses lui permettant de limiter la prolifération des cellules tumorales mais également leur propagation par voie sanguine ou lymphatique. Il lutte aussi efficacement contre le cancer de la vessie (**Anso, 2012**).

# Chapitre II

## II. Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants

### II.1. Radicaux libres

Un radical libre est toute espèce chimique, atome ou molécule, ayant un ou plusieurs électron (s) non apparié (s) dans leur orbital externe, leur attribuant une réactivité vis-à-vis d'autres molécules, soit à capter un autre électron ; c'est alors un radical oxydant, soit à le céder ; on dit que c'est un radical réducteur (**Favier, 2003 ; Fontaine, 2007**). Ces espèces peuvent être dérivées de l'oxygène (Espèce réactive d'oxygène : ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (Espèce réactive d'azote : ERA) (**Afanas'ev, 2009**) (**Tableau III**).

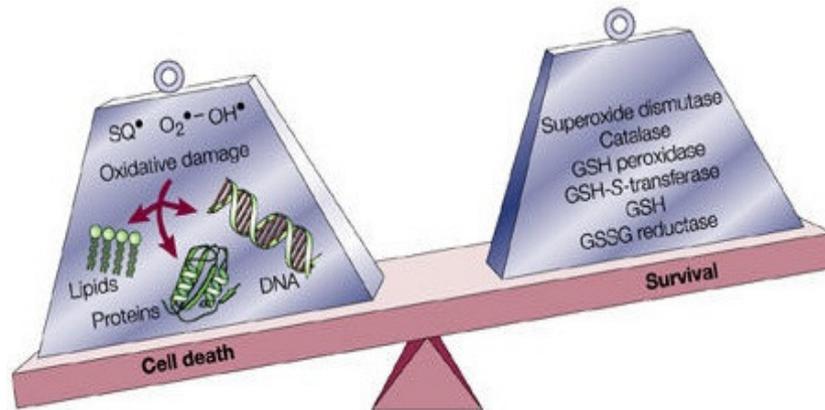
Dans les circonstances normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme médiateurs tissulaires ou résidus des réactions énergétiques ou de défense, cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense mais leur production peut devenir excessive ou résulter des phénomènes toxiques exogènes et/ou endogènes provoquant ainsi un phénomène appelé "le stress oxydant".

**Tableau III** : Les différents types d'espèces réactives (**Fontaine, 2007**).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^-$	Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Radical hydroxyle	$OH^\cdot$	Peroxyde organique	$ROOH$
Radical peroxyde	$ROO^\cdot$	Acide hypochlorique	$HOCl$
Radical alkoxyde	$RO^\cdot$	Oxygène singulet	$^1O_2$
Monoxyde d'azote	$NO^\cdot$	Peroxynitrite	$ONOO^\cdot$

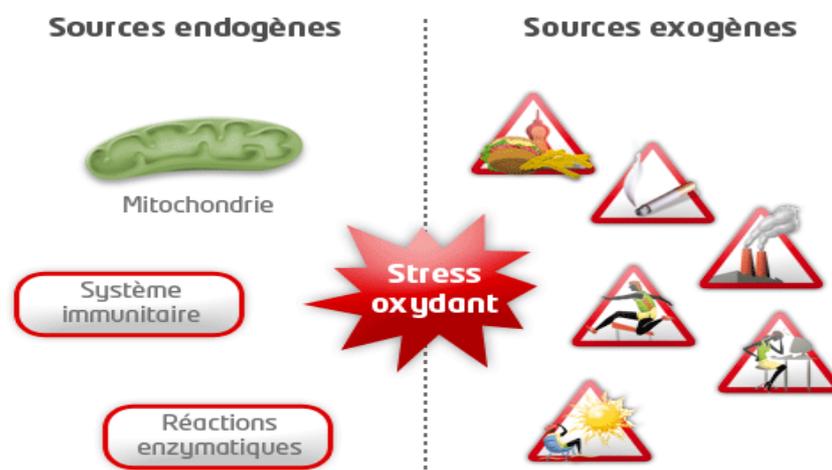
### II.2. Le stress oxydant

Le stress oxydant également appelé stress oxydatif est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre la formation des ERO (caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs et à réguler leur production (**Figure 1**) (**Zweier et al., 2006**).



**Figure 1** : Stress oxydant induit par une rupture d'équilibre entre la production et l'élimination des radicaux libres (Lotharius et Brundin, 2002).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines que ce soit endogènes ou exogènes tels que la surproduction des ERO d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants comme le tabac, l'alcool, les médicaments, les rayons gamma et ultraviolet, les herbicides, l'ozone, l'amiante et les métaux toxiques (Figure 2) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Koehlin-Ramonatxo, 2006).



**Figure 2** : Sources endogènes et exogènes du stress oxydant ([http://www.fbdistribution.ca/Causes\\_stress\\_ox.gif](http://www.fbdistribution.ca/Causes_stress_ox.gif)).

Le stress oxydatif est à l'origine de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'œdème pulmonaire, les maladies dégénératives comme l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la dystrophie musculaire et plus encore (Atawodi, 2005 ; Lobo *et al.*, 2010).

### II.3. Les antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme toute molécule qui, à concentration relativement faible, inhibe l'oxydation des substrats (**Adil *et al.*, 2007 ; Nagababu *et al.*, 2010**). Ce terme englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (**Park *et al.*, 2001**).

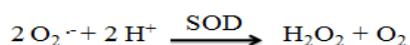
#### II.3.1. Systèmes de défense

Pour piéger les ERO, la cellule dispose d'un arsenal de défenses antioxydants, à la fois endogène par le biais des systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase,...) et exogène en utilisant des composés alimentaires (vitamine C, vitamine E, flavonoïdes, caroténoïdes,...etc.) (**Friguet, 2003**).

##### II.3.1.1. Systèmes enzymatiques

Trois principales enzymes ont un rôle essentiel dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (**Ichai *et al.*, 2011**). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du  $O_2^{\bullet-}$  et du  $H_2O_2$ , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel *et al.*, 2001**).

**La superoxyde dismutase :** La SOD est une métalloprotéine la plus importante dans toutes les cellules, elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (**Afonso *et al.*, 2007 ; El-Beshbishy *et al.*, 2011**).

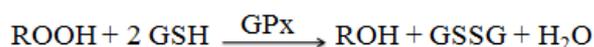
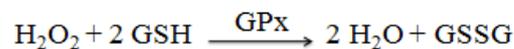


Cette enzyme existe en trois isoformes selon sa localisation et son cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD, SOD1), une forme mitochondriale à manganèse (Mn-SOD, SOD2) et une forme extracellulaire (EC-SOD, SOD3) (**Comhair et Erzurum, 2002 ; Bartosz, 2005**).

**La catalase :** La CAT est une enzyme présente essentiellement dans les érythrocytes et les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (**Kohen et Nyska, 2002 ; Sorg, 2004**). Elle agit en synergie avec la superoxyde dismutase en éliminant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le transformant en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) (**El-Beshbishy *et al.*, 2011**).



**La glutathion peroxydase :** La GPx est une enzyme ubiquitaire à sélénium qui agit en synergie avec la SOD. Son rôle est d'accélérer la décomposition du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  et la réduction de divers hydroperoxydes lipidiques (ROOH). Au cours de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (Sastre *et al.*, 2005 ; Ichai *et al.*, 2011 ; Jacquot, 2013).

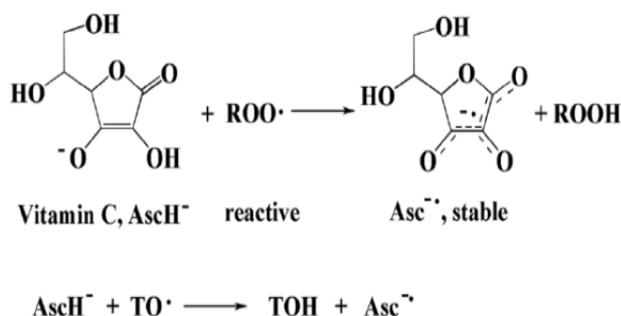


### II.3.1.2. Systèmes non enzymatiques

Ce système de défense est composé de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamine C ou acide ascorbique, vitamines E ou tocophérols, coenzymes (coenzyme Q10 ou ubiquinone), glutathion, acide urique, bilirubine...) et de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif empêchant ainsi la formation des radicaux libres (Pincemail *et al.*, 2002).

Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Se-GPx). Le zinc est également un inducteur des métallothionéines (Coyle *et al.*, 2002), protéines à activité antioxydante et un inhibiteur des réactions de production des radicaux libres induites par le cuivre.

La figure ci-après illustre le mécanisme d'action de la vitamine C à l'égard du radical peroxyde et la régénération de la vitamine E par la vitamine C.



**Figure 3 :** Vitamine C ( $\text{AscH}^-$ ) interagissant avec le radical peroxyde ( $\text{ROO}\cdot$ ) et régénération de la vitamine E par la vitamine C (Lü *et al.*, 2010).

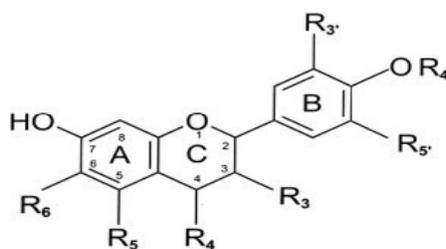
Les composés phénoliques également appelés les polyphénols sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal (**Charles, 2013**). Ils sont caractérisés comme l'indique leur nom, par la présence d'au moins un cycle aromatique à six carbones (phénol) lui-même porteur d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH) (**Macheix et al., 2006**). Ils constituent un des groupes les plus abondants dans le royaume végétal avec plus de 8000 structures, allant de simples molécules comme les acides phénoliques aux substances hautement polymérisées comme les tanins.

Les polyphénols sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement UV ou d'agressions par des agents pathogènes, des parasites et des prédateurs (**Dai et Mumper, 2010**). Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes et sont aussi capables de piéger les ions métalliques vu leurs propriétés chélatrices (**Delattre et al., 2005**). Ils sont ainsi utilisés en thérapie comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires (**Epifano et al., 2007**).

Les polyphénols sont communément subdivisés en plusieurs classes dont la plus importante étant la classe des flavonoïdes.

- **Les flavonoïdes** : Du latin *flavus*, jaune, sont des substances quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fruits et des feuilles (**Vania et al., 2014**).

Actuellement, plus de 6000 différentes molécules ont été répertoriées et identifiées (**Ferrer et al., 2008**), ils ont tous la même structure de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés en une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (**Figure 4**) (**Yao et al., 2004**).



**Figure 4:** Structure de base des flavonoïdes (**Vania et al., 2014**).

## II.4. Modèles d'étude du stress oxydant

Les scientifiques n'ont cessé de développer de nouvelles approches expérimentales afin de mieux comprendre le processus pathologique du stress oxydatif chez l'homme. Ces modèles sont aussi divers que variés et impliquent généralement des animaux, des cultures cellulaires, l'utilisation d'organes isolés ou d'organites ou encore de cellules isolées voire le recours aux primates et même aux humains dans certaines circonstances. Dans le présent travail, on s'intéresse à un modèle cellulaire, unique en son genre, il s'agit du globule rouge en raison de sa particularité constitutionnelle (composé d'une membrane cytoplasmique et d'hémoglobine) et fonctionnelle.

### II.4.1. Le globule rouge

#### II.4.1.1. Définition

Les globules rouges, aussi appelés érythrocytes ou hématies, sont l'une des cellules les plus spécialisées et les plus abondantes dans le corps. Environ 25 trillions de globules rouges passent dans le système circulatoire des organismes humains (**Volpe, 1993**). Leur rôle principal est le transport des gazes respiratoires, O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>, entre les tissus et les poumons à travers la protéine de transport, l'hémoglobine (**Siems *et al.*, 2000**). Durant leur maturation, les érythrocytes émergent de la moelle osseuse et perdent leur noyau, les ribosomes et les mitochondries et donc toute capacité de division cellulaire, de synthèse des protéines et des réactions de phosphorylation oxydative au niveau mitochondriale (**Bunn, 1991 ; Volpe, 1993**).

#### II.4.1.2. La membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire est constituée d'une bicouche lipidique composée de 50% de protéines, de 40% de lipides et de 10% de glucides. Plus de 95% de la protéine cytoplasmique est l'hémoglobine (Hb) (**Telen et Kaufman, 1999**). Elle permet la liaison réversible de l'O<sub>2</sub> à l'hème tout en maintenant le fer dans l'état d'oxydation et facilite également l'échange du CO<sub>2</sub> produit dans les tissus avec les poumons (**Nohl et Stolze, 1998 ; Telen et Kaufman, 1999**).

Tous les lipides dans les érythrocytes matures se trouvent dans la bicouche membranaire et se composent de phospholipide et du cholestérol dont la moitié des acides gras sont insaturés (**Telen et Kaufman, 1999**). La structure de la bicouche lipidique est essentielle à l'organisation du réseau squelettique au sein des globules rouges (**Smith *et al.*, 2005**).

### II.4.2. Globules rouges et stress oxydant

Dans la plupart des cellules, les mitochondries sont la principale source des radicaux libres (**Johnson *et al.*, 2005**). Malgré l'absence de mitochondries dans les globules rouges, les radicaux libres sont produits en continu et cela étant dû à la tension élevée d'O<sub>2</sub> dans le sang artériel, ainsi que sa teneur abondante en fer hémique (**Baynes, 2005**). L'une des principales sources des radicaux libres dans les érythrocytes est l'Hb qui subit une autooxydation pour produire de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de la méthémoglobine (metHb). Cette protéine devient incapable de lier ou de transporter l'O<sub>2</sub> (**Johnson *et al.*, 2005**). En raison de son rôle de transporteur d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, l'érythrocyte humain est constamment exposé aux radicaux libres et au stress oxydatif (**Al-Omar *et al.*, 2004**).

La capacité antioxydante extracellulaire et la réduction des oxydants extracellulaires permettent aux érythrocytes de répondre au stress. Ainsi, leur mobilité peut être un antioxydant idéal non seulement pour sa propre membrane et environnement local, mais aussi comme un piègeur d'oxydant dans toute la circulation (**Kennett et Kuchel, 2003**).

Bien que le stress oxydatif puisse endommager les globules rouges elles-mêmes, l'effet de masse de grandes quantités des radicaux libres qui quittent les globules ont un énorme potentiel d'endommager d'autres composants de la circulation (**Johnson *et al.*, 2005**). La richesse de la membrane cellulaire en acides gras polyinsaturés la rend cible à l'attaque des radicaux oxydants. Ainsi, l'oxydation enzymatique spécifique de ces acides gras conduit à la formation des composés importants tels que les prostaglandines et les leucotriènes. En revanche, leur oxydation non spécifique peut conduire à une peroxydation lipidique (**Cheesman et Slater, 1993 ; Al-Omar *et al.*, 2004**). Celle-ci entraîne la perte d'intégrité de la membrane et la mort cellulaire (**Baynes, 2005**).

# **Partie Expérimentale**

## **Chapitre III**

### III. Matériels et méthodes

#### III.1. Matériels

##### III.1.1. Echantillons

##### III.1.1.1. Miels

Deux échantillons de miel de type Multiflorale ont été utilisés dans cette étude (**Figure 5**). Les échantillons du miel ont été procurés auprès des apiculteurs de la région de Bordj Bou Arréridj durant la période du mois de Mars 2018.



**Figure 5** : Echantillons de miel.

Le tableau IV reprend la description géographique des deux échantillons de miel étudiés.

**Tableau IV** : Origine géographique des miels.

Echantillons de miel	Origine géographique	Etat	Couleur
Miel 1	Bir Snab	Liquide	Jaune clair
Miel 2	Colla	Cristallisé	Noirci

##### III.1.1.2. Sang

Les expériences ont été réalisées sur du sang humain frais. Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur héparinate de lithium par un personnel médical de l'hôpital de Bouzidi Lakhdar de la Wilaya de Bordj Bou Arréridj.



**Figure 6** : Echantillons de sang.

### III.1.2. Réactifs et standards

Les produits chimiques utilisés sont les suivants : Folin-Ciocalteu (FC), carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), acide gallique, quercétine, acide ascorbique, chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ), méthanol, formol.

## III.2. Méthodes

### III.2.1. Préparation des échantillons de miel

Les échantillons de miel ont été étudiés à une concentration de 100 mg/ml ; 1 g de chaque miel est reconstitué dans 10 ml d'eau distillée pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes et dans 10 ml de  $\text{NaCl}$  à 0.9% pour le test d'hémolyse. Chaque solution est agitée pendant 30 min à l'obscurité puis filtrée en utilisant un papier filtre. Les filtrats ainsi récupérés sont conservés à basse température dans un réfrigérateur (**Figure 7**).



**Figure 7** : Préparation des échantillons de miel.

### III.2.2. Dosage des molécules bioactives

#### III.2.2.1. Dosage des phénols totaux

##### *Principe de la méthode*

La teneur en phénols totaux dans les extraits des deux miels a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu avec quelques modifications (**Beretta et al., 2005**).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). L'intensité de la couleur produite, dont l'absorbance maximale est à 760 nm, est

proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits (**Ghazi et Sahraoui, 2005**).

#### *Mode opératoire*

Un aliquote de 200 µl de chaque extrait de miel est introduit dans un tube à essai, auquel un volume de 500 µl du réactif de Folin (à 10%) est ajouté. L'ensemble est soigneusement mélangé et incubé à l'abri de la lumière pendant 5 min à température ambiante. Un volume de 1500 µl de carbonate de sodium (7.5%) est additionné au mélange. Le mélange réactionnel est ensuite agité puis incubé pendant 30 min et l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique (0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,1 mg/ml).

Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait en utilisant l'équation de la régression linéaire de la droite d'étalonnage du standard ( $y=ax+b$ ).

#### **III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes**

##### *Principe de la méthode*

La quantification des flavonoïdes est estimée selon la méthode colorimétrique de trichlorure décrite par **Bahorun et al. (1996)** avec quelques modifications. Le principe de cette technique repose sur les propriétés chélatrices des flavonoïdes à l'égard des ions aluminium. Les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes forment une liaison covalente avec le trichlorure d'aluminium produisant ainsi un complexe de couleur jaunâtre ayant une absorbance maximale à 430 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des complexes formés.

##### *Mode opératoire*

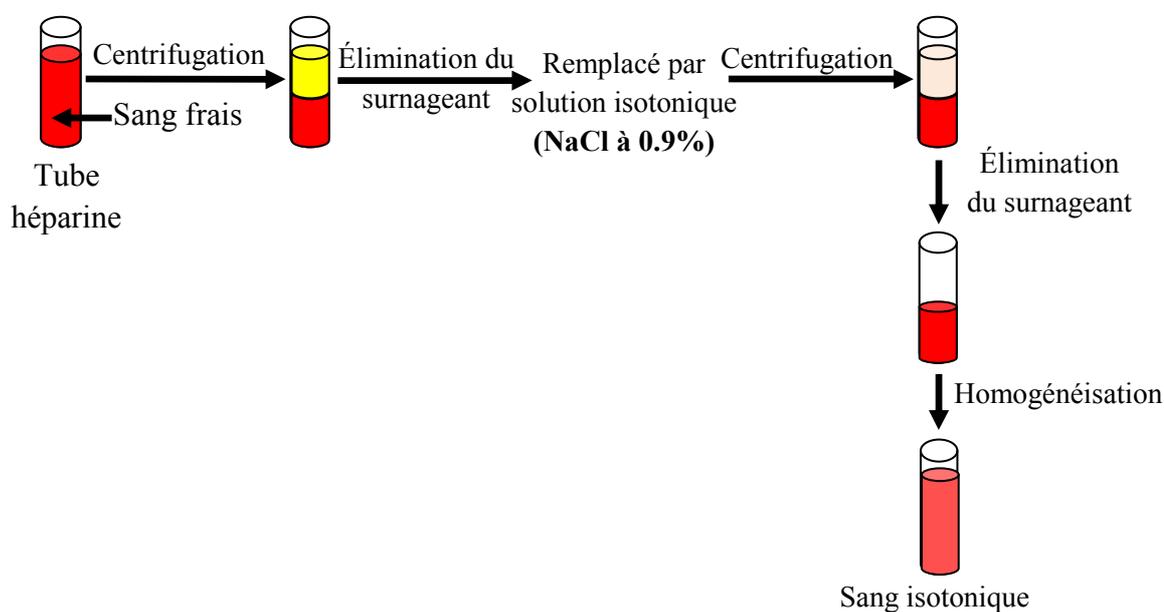
1 ml de chaque extrait de miel est mélangé avec 1 ml de trichlorure d'aluminium (à 2% dans le méthanol). Après incubation à température ambiante pendant 1 heure, l'absorbance du mélange est mesurée à 420 nm contre un blanc contenant les réactifs sauf l'extrait. Dans les mêmes conditions et de la même façon sont mesurées les absorbances de la série des solutions standards de la quercétine (0,005 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 mg/ml).

La concentration en flavonoïdes totaux, exprimée en mg équivalent de quercétine (EQ)/g d'extrait, est calculée à partir de la droite d'étalonnage  $y=ax+b$ .

### III.2.3. Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de miel

#### III.2.3.1. Préparation du sang isotonique

Le sang recueilli est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min pour éliminer le surnageant (contenant du plasma, des plaquettes et des leucocytes) puis le culot récupéré est lavé trois fois par la solution isotonique de NaCl à 0,9 %. La suspension est soigneusement homogénéisée par un simple retournement pendant chaque lavage (**Figure 8**).



**Figure 8** : Préparation du sang isotonique.

#### III.2.3.2. Mesure de la turbidité cellulaire

Les différents échantillons à analyser sont préparés à partir du sang isotonique (sang centrifugé et dont le plasma est remplacé par une solution isotonique (NaCl à 0.9%)) (**Figure 8**).

- Le tube A contient du sang isotonique et une solution isotonique (Témoin négatif : non oxydé par le  $AlCl_3$ ).
- Le tube B contient 50% de sang isotonique et une solution isotonique (Témoin positif : oxydé par le  $AlCl_3$ ).
- Le tube C renferme du sang isotonique et un antioxydant de référence (Vit C à 50 mmol/l).
- Le tube D contient du sang isotonique et l'extrait du Miel 1 (100 mg/ml).
- Le tube E contient du sang isotonique et l'extrait du Miel 2 (100 mg/ml).

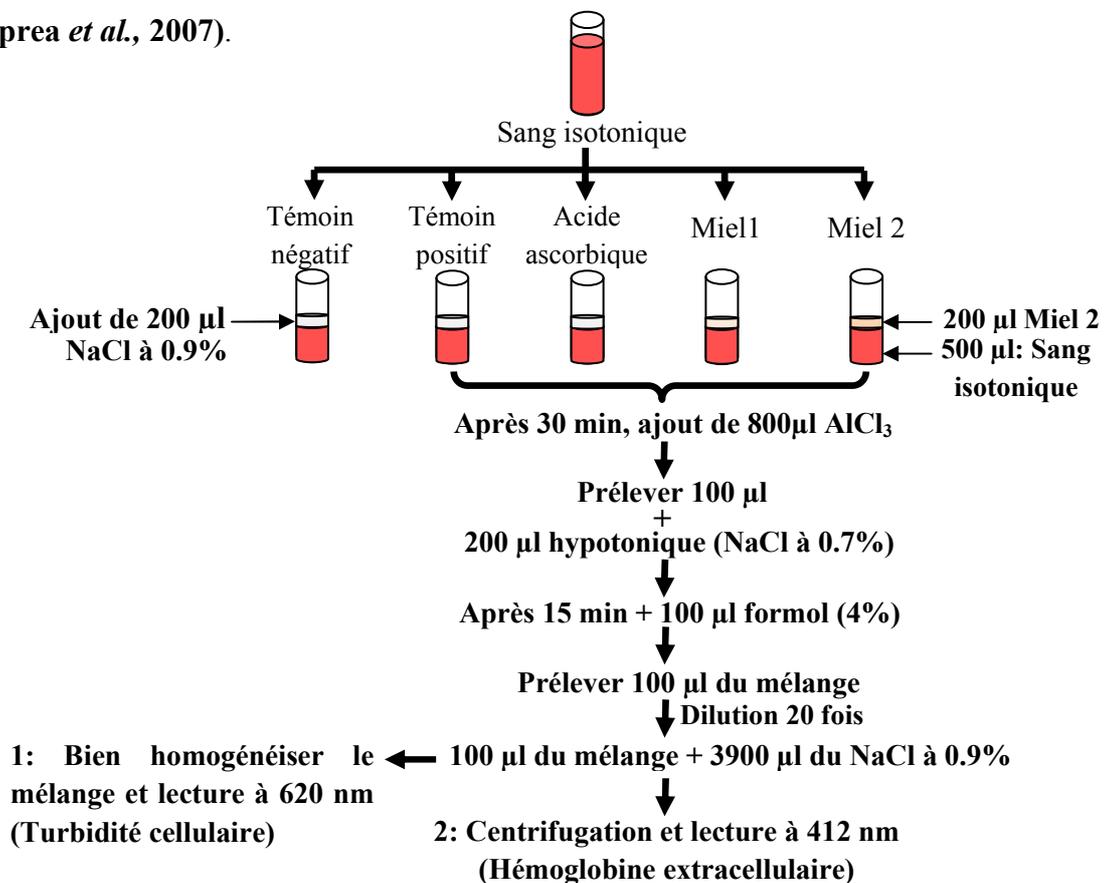
Les érythrocytes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 30 min. Puis un volume de 800µl d'AlCl<sub>3</sub> est ajouté comme un initiateur de stress oxydatif à l'exception du témoin négatif auquel on a ajouté une solution isotonique (NaCl à 0.9%) (**Figure 9**).

### Mode opératoire

Un volume de 100 µl est prélevé de chaque tube auquel sont ajoutés 200 µl d'une solution hypotonique, après 15 min on ajoute 100 µl de formol (4%) pour fixer les hématies, ensuite on prélève 100 µl du mélange qu'on dilue 20 fois pour faire la lecture à 620 nm. Chaque échantillon est ensuite centrifugé (3000 rpm/10 min) pour récupérer le surnageant et doser son hémoglobine libérée.

#### II.2.3.2. Dosage de l'hémoglobine libérée

L'hémoglobine libérée a été dosée par spectrophotométrie à 412 nm (bande de Soret). Le dosage de l'hémoglobine après incubation dans un milieu hypotonique permet de déterminer d'une manière indirecte la proportion d'hématies lysées. Ce procédé simple, rapide et très sensible remplace la méthode lourde, longue et peu sensible de Drabkin (**Mitrofan-Oprea et al., 2007**).



**Figure 9** : Protocole expérimental de l'évaluation de l'activité hémolytique.

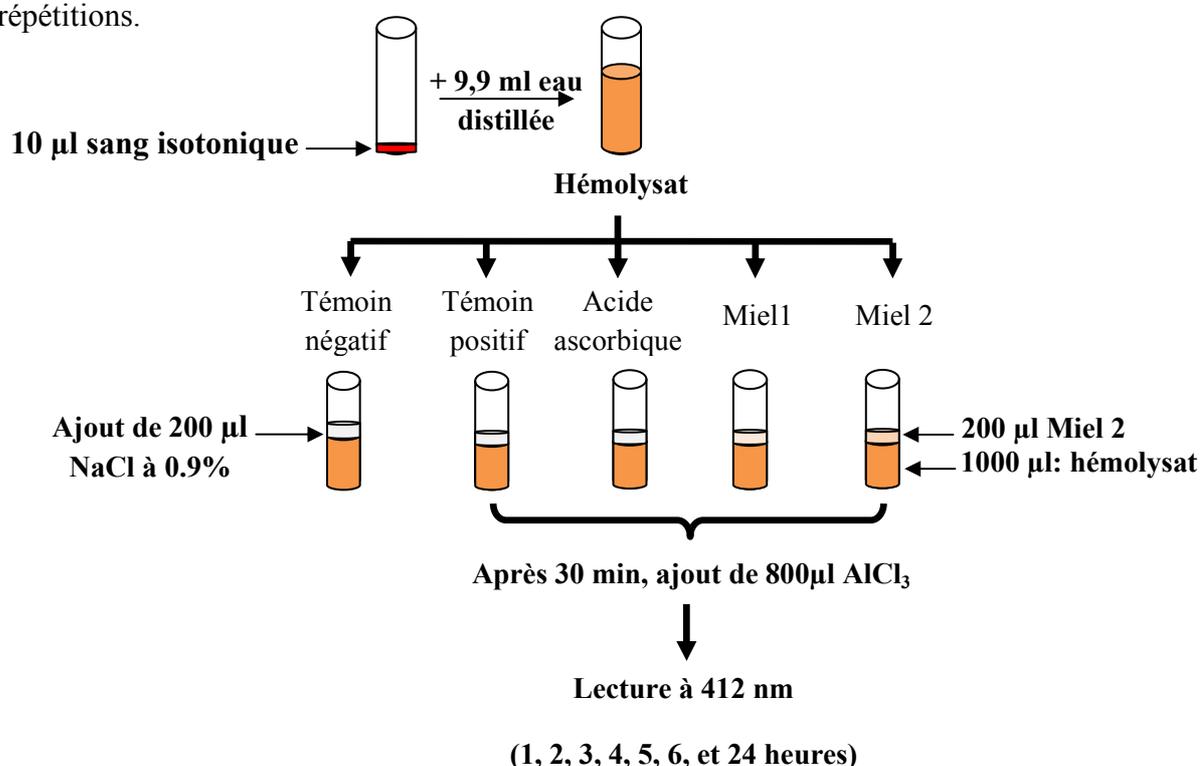
### III.2.3.3. Etude de la cinétique de dénaturation de l'hémoglobine

La cinétique de dénaturation de l'hémoglobine a été examinée par spectrophotomètre à 412 nm. La diminution de l'intensité à 412 nm représente le degré de dénaturation de l'hémoglobine.

#### Mode opératoire

Dans un tube à essai, un volume de 9990  $\mu\text{l}$  d'eau distillée est ajouté à un volume de 10  $\mu\text{l}$  du sang isotonique (l'entrée massive de l'eau distillée va provoquer le gonflement des cellules puis leur explosion). Une série de cinq tubes (Tube 1 : témoin négatif, Tube 2 : témoin positif, Tube 3 : traité par un standard soit l'acide ascorbique, Tube 4 : traité par le Miel 1, et Tube 5 : traité par le Miel 2) est réalisée contenant chacune un volume de 1000  $\mu\text{l}$  d'hémolysat auquel on a ajouté 200  $\mu\text{l}$  de la solution isotonique (NaCl à 0.9%) pour les témoins négatif et positif ou l'acide ascorbique ou encore l'extrait du miel 1 ou 2. Après incubation de 30 min, un volume de 800  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$  est ajouté à l'exception du témoin négatif auquel on a ajouté une solution isotonique (NaCl à 0.9%), puis la cinétique de dénaturation est enregistrée chaque heure jusqu'à 6 heures et 24 heure (**Figure 10**).

Dans le présent travail, toutes les manipulations ont été réalisées en quatre répétitions.



**Figure 10** : Protocole de l'étude de la cinétique de dénaturation de l'hémoglobine.

**III.2.3.4. Etude microscopique**

Dans le but d'avoir des précisions sur l'état (forme) des hématies, la mesure de la turbidité cellulaire est suivie directement par l'observation sous microscope au grossissement (10X100) avec prise de photos numériques.

**III.3. Analyse statistique**

L'étude statistique est faite dans le but de comparer les moyennes des résultats obtenus par l'analyse de la variance (ANOVA, test T) en utilisant le logiciel STATVIEW version 5.5. Le seuil de signification est pris à  $p < 0,05$ .

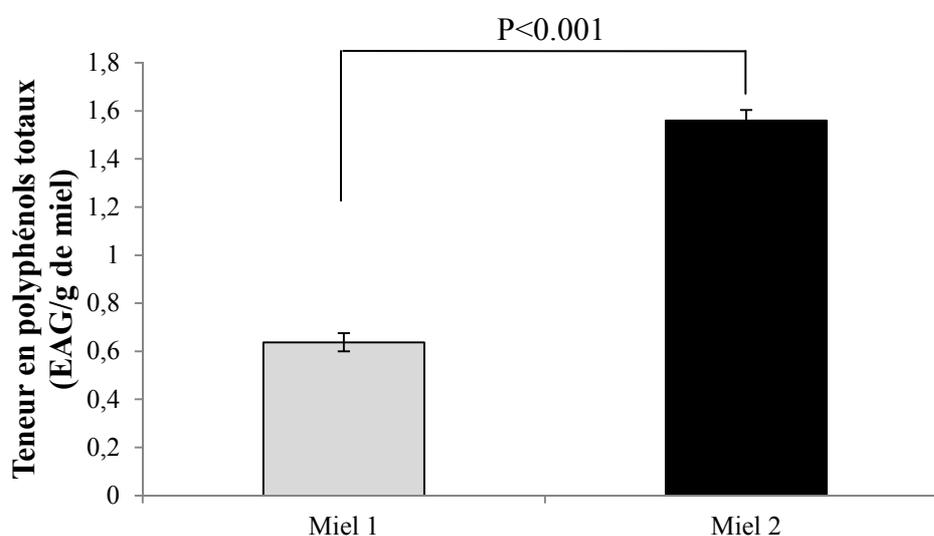
# Chapitre IV

## IV. Résultats et discussion

### IV.1. Teneur en substances actives

#### IV.1.1. Teneur en phénols totaux

La teneur en composés phénoliques est évaluée selon la méthode décrite par **Beretta et al. (2005)** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en phénols totaux des deux miels analysés sont représentées dans la **Figure 11**, elles sont exprimées en milligrammes équivalent d'acide gallique/g de miel (mg EAG/g de miel) en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions.

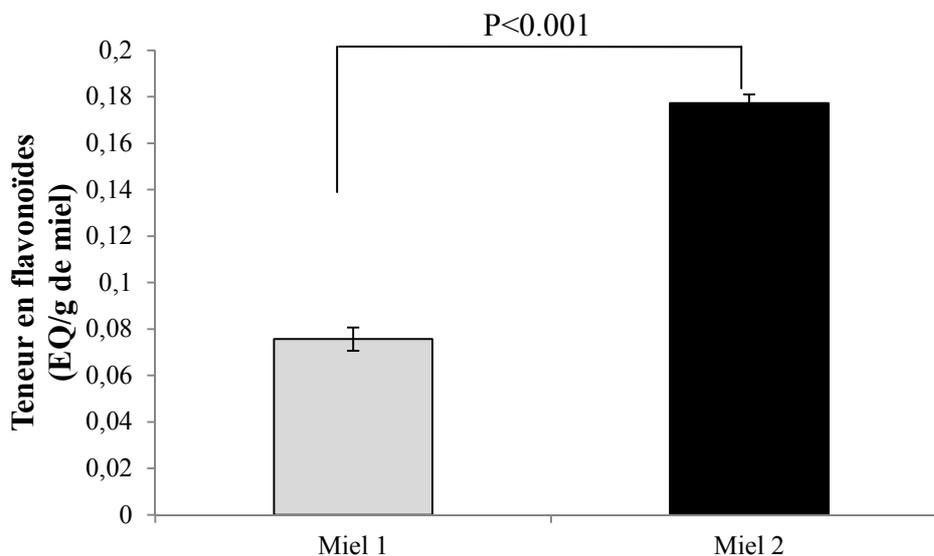


**Figure 11** : Teneur en polyphénols totaux des deux échantillons de miel.

Il apparaît clairement que le Miel 2 a une teneur plus élevée en polyphénol ( $1.559481276 \pm 0.043$  mg EAG/g de miel) que le Miel 1 ( $0.637157602 \pm 0.037$  mg EAG/g de miel) ( $P < 0.001$ ). Les teneurs moyennes des polyphénols des miels étudiés sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (**Beretta et al., 2005** ; **Moniruzzaman et al., 2013** ; **Bellik et Selles, 2016**). Cependant les variations observées entre le Miel 1 et le Miel 2 peuvent être attribuées à l'origine botanique et géographique, l'année de récolte, l'environnement,... (**Blasa et al., 2006**). D'après **Blasa et al. (2006)**, les miels foncés sont plus riches en composés phénoliques que les miels clairs, ce qui est confirmé dans la présente étude ; le miel provenant de la région de Colla (Miel 2) de couleur presque noircie a montré une forte teneur en composés phénoliques comparé au miel provenant de la région de Bir Snab qui est de couleur jaune claire avec une faible teneur en polyphénols.

### IV.1.2. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation du trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (**Bahorun et al., 1996**). Les résultats sont représentés dans la **Figure 12** et sont exprimés en mg équivalent de quercétine/g de miel (mg EQ/g de miel), en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions.



**Figure 12:** Teneur en flavonoïdes des deux échantillons de miel.

Il apparaît là aussi que de la même manière pour les teneurs en polyphénols totaux, le Miel 2 est plus riche en flavonoïdes ( $0.177273341 \pm 0.003$  mg EQ/g de miel) que le Miel 1 ( $0.075665451 \pm 0.005$  mg EQ/g de miel) ( $P < 0.001$ ). Ces résultats corroborent les aboutissements d'études précédentes (**Beretta et al., 2005 ; Moniruzzaman et al., 2013 ; Bellik et Selles, 2016**).

Selon **Mouhoubi et al. (2016)**, la variation de la teneur en flavonoïdes dépend également de la source, la région, la saison et le lieu de collecte.

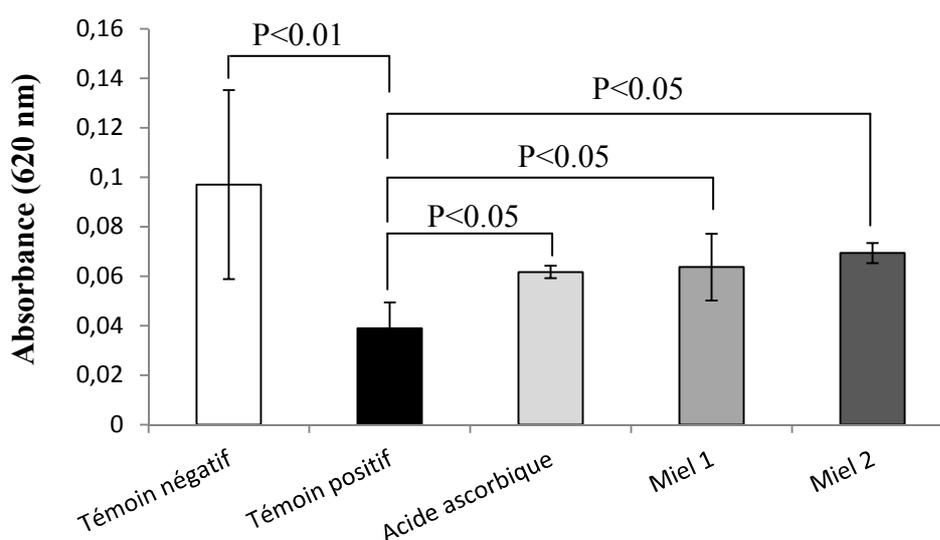
## V.2. Etude de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de miel

### IV.2.1. Turbidité cellulaire

La **Figure 13** montre les densités optiques (DO) des globules rouges des échantillons témoins (témoin négatif et témoin positif) et les échantillons traités (acide ascorbique, Miel 1 et Miel 2).

Les valeurs de la concentration cellulaire du sang témoin négatif (n'ayant pas subi d'oxydation par l' $\text{AlCl}_3$ ) restent largement supérieures par rapport aux différents échantillons étudiés ( $P < 0.01$ ). Toutefois, le sang traité par le Miel 1 et, en particulier, le Miel 2 présente les valeurs de concentration cellulaire les plus élevées par rapport à celle du témoin positif ( $P < 0.05$ ).

Le sang du témoin positif ainsi que le sang traité à l'acide ascorbique sont les plus fragiles au milieu hypo-osmotique que ceux traités par les échantillons de miel.

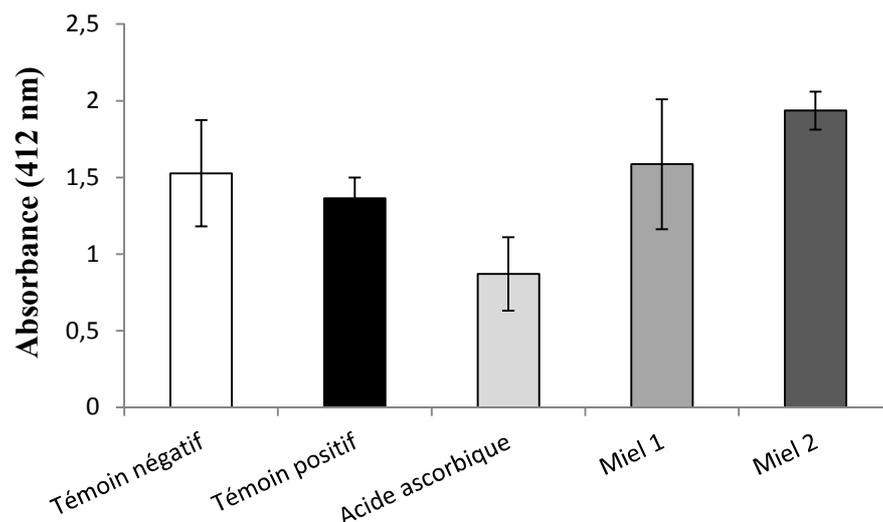


**Figure 13** : Histogrammes montrant la turbidité cellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique ( $\text{NaCl}$  à 0.7%) et sous l'action du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  à 100 mmol/l). Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type.

#### IV.2.2. Concentration en hémoglobine extracellulaire

Les densités optiques de l'hémoglobine (Hb) libérée sont représentées dans la **Figure 14**.

Les valeurs de l'hémoglobine libérée vont dans le même sens que celles observées pour la cellule. Les concentrations de l'Hb traitée par le Miel 1 et le Miel 2 sont supérieures par rapport à celles traitées par l'acide ascorbique et du témoin positif. Ces résultats suggèrent par conséquent, un effet protecteur du miel aussi bien sur l'intégrité cellulaire que sur la composante intracytoplasmique du globule rouge représenté par l'Hb.

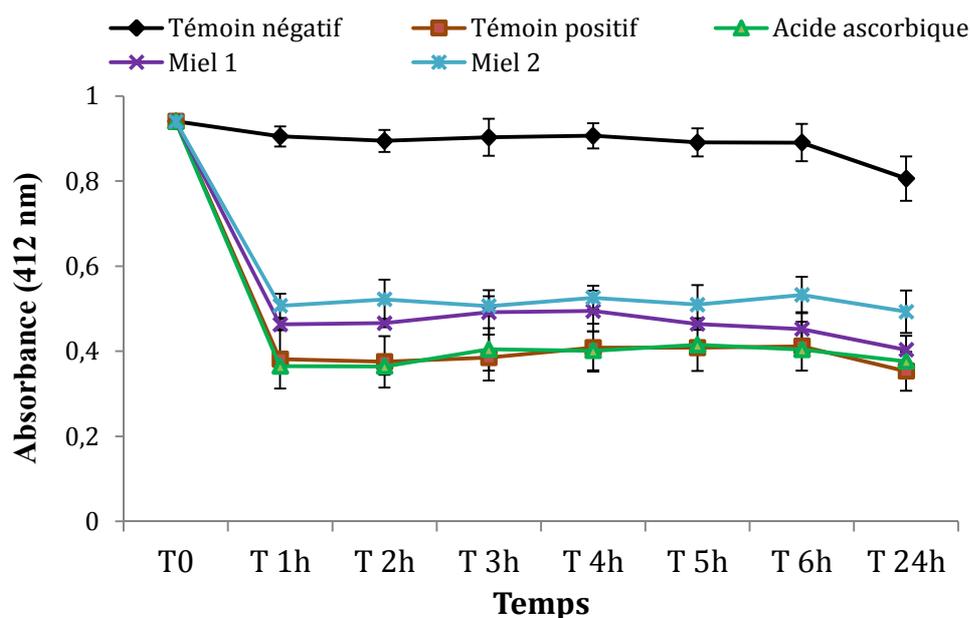


**Figure 14 :** Histogrammes montrant la concentration en hémoglobine extracellulaire des différents échantillons étudiés sous l'effet de la solution hypotonique (NaCl à 0.7%) et sous l'action du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  à 100 mmol/l). Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type.

#### IV.2.3. Etude de la cinétique de dénaturation de l'hémoglobine

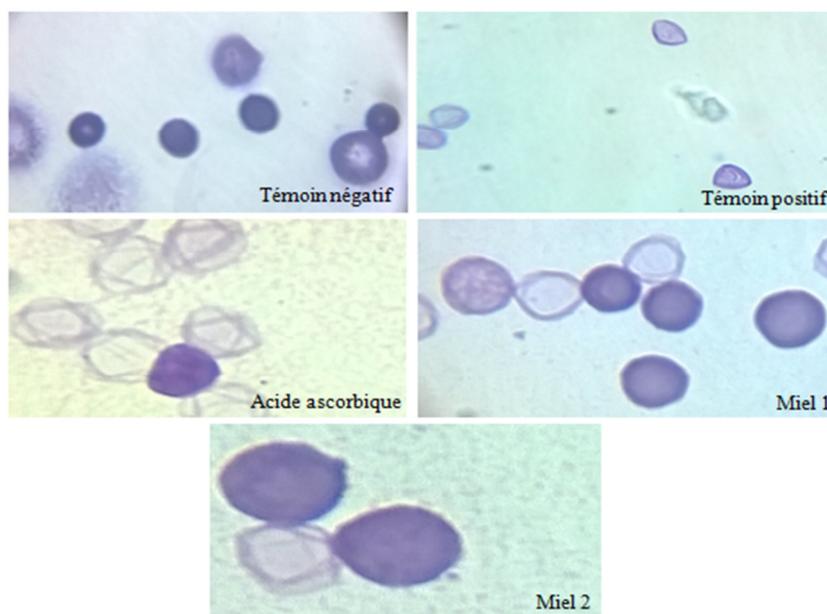
Après avoir noté que l'hémoglobine libérée suite à une lyse cellulaire se dégraderait dans des conditions oxydantes et au contraire reste conservée dans des conditions antioxydantes. Nous nous sommes alors intéressées à étudier le comportement de l'Hb seule dans ces conditions.

Il apparaît très clairement que la concentration initiale de l'hémoglobine est significativement réduite après 1 heure d'incubation ( $P < 0.001$ ) (**Figure 15**). Toutefois, cette diminution varie en fonction des échantillons étudiés. En effet, le Miel 2 semble mieux protéger l'Hb par rapport au Miel 1. En revanche, l'acide ascorbique semble accélérer la dénaturation de l'Hb du fait de la réduction importante de la concentration dès la première heure d'incubation et persiste jusqu'à la fin de l'essai. Ce résultat démontre l'effet pro-oxydant de l'acide ascorbique reconnu dans la littérature (**Lovstad, 1984 ; Halliwell et Whiteman, 1997 ; Chen et al., 2008**).



**Figure 15:** Cinétique de dénaturation de l'hémoglobine en fonction du temps en présence des échantillons de miels et de l'acide ascorbique et sous l'action du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  à 100 mmol/l). Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  Ecart type.

Pour ce qui est de l'état des cellules dans les différents échantillons, nous pouvons voir sur la **Figure 16**, que les globules rouges des échantillons vitamine C et du contrôle positif sont ceux qui présentent des déformations de la membrane cytoplasmique. Les cellules du sang traité par les miels 1 et 2 et celles du témoin négatif paraissent avoir un contour cellulaire plus régulier.



**Figure 16 :** Photos des frottis sanguins de chaque essai vus sous microscope électronique (10X100).

Au cours de cette étude, nous avons constaté que les échantillons de miel exercent un effet protecteur à la fois sur l'intégrité cellulaire que sur la dénaturation de l'Hb. Cette protection passerait notamment par l'augmentation de la fluidité membranaire, en effet plusieurs auteurs ont souligné l'importance de la fluidité membranaire dans la stabilité des cellules érythrocytaires (**Araki et Rifkind, 1981 ; De Oliveira et Saldanha, 2010**).

Il a été démontré récemment que le peroxyde d'hydrogène augmente significativement les niveaux d'oxydation de l'Hb purifiée ou non purifiée après traitement (**Xiang *et al.*, 2013 ; Bellik et Iguer-Ouada, 2016**). Ainsi, l'oxydation de l'hémoglobine provoque sa dénaturation. Cette dénaturation de l'hémoglobine s'accompagne par la perte de sa configuration spatiale et du détachement de l'hème des globines. L'hème libre s'intercale dans les lipides des membranes cellulaires et induit la peroxydation de ces lipides et l'altération membranaire avec comme conséquence l'augmentation de la perméabilité cellulaire menant à l'hémolyse (destruction des globules rouges) (**Bellik et Selles, 2016**).

# **Conclusion générale**

### Conclusion générale

Parmi les récoltes les plus prisées de l'homme, l'histoire du miel serait sans doute l'une des plus aventureuses, fascinantes et romantiques. Des preuves de l'utilisation du miel comme aliment et/ou comme remède existent dans les civilisations les plus anciennes (**Bellik et Boukraâ, 2013**).

Dans cette étude, nous avons démontré qu'une forte concentration en hémoglobine dans le test d'hémolyse n'est pas forcément liée à une hémolyse importante mais plutôt à un effet protecteur contre la dénaturation de cette molécule. L'ensemble des résultats montrent que les extraits de miel assurent un double effet protecteur aussi bien sur l'intégrité cellulaire (hémolyse des globules rouges) que sur la dégradation de l'hémoglobine.

Les résultats de ce travail, ouvrent des perspectives intéressantes aussi bien sur la caractérisation moléculaire des miels étudiés mais surtout dans le test de ces molécules ou même des extraits bruts sur le globule rouge. Il serait ainsi intéressant d'évaluer le statut oxydatif des hématies à l'échelle moléculaire, notamment par le :

- Dosage des sous produits de la peroxydation lipidique tels que : MDA, TBARS, 4-HNE,
- Dosage du statut antioxydant intracytoplasmique,
- Dosage des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques,
- Dosage des agents réducteurs tel que le GSH.

# **Références bibliographiques**

# Références Bibliographiques

## A

**Abbasali K. M., Zhila T. & Farshad N., 2005.** Developmental toxicity of aluminum from high doses of AlCl<sub>3</sub> in mice. *J. Applied Res* **5**, 575-579.

**Adil H. I., Cetin I. H., Yener M. & Bayindirli A., 2007.** Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts, *Jrnl of Sup Flu* **43**, 55-63.

**Afanas'ev I. B., 2009.** Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals. *CPC Press*, 1-71.

**Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutase  $\mu$  rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* **74**, 636-643.

**Al-Mamary M., Al-Meeri A., Al-Habori M., 2002.** Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Research* **22**, 1041-1047.

**Al-Omar M. A., Beedham C., Alsarra I. A., 2004.** Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. *Saudi Pharm J* **12**, 1-18.

**Alqarni A. S., Owayss A. A., & Mahmoud A. A., 2012.** Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society* **5**, 618-625.

**Alvarez-Suarez J. M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli E. & Battino M., 2010.** Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* **3**, 15-23.

**Al-Waili N. S., 2004.** Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food* **7**, 210-222.

**Al-Waili N., Salom K., Al-Ghamdi A. A., 2011.** Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *6cLient Lfc: world-journal* **11**, 766-787.

**Alzahrani H. A., Alsabehi R., Boukraâ L., Abdellah F., Bellik Y., Bakhotmah B. A., 2012.** Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules* **17**, 10540-10549.

**Anso J., 2012.** Du miel à volonté. 1 éd, Dur à Avaler, 24 p.

**Araki K. & Rifkind J. M., 1981.** The rate of osmotic hemolysis: A relationship with membrane bilayer fluidity. *Biochimica et Biophysica Acta* **645**, 81-90.

**Arvanitoyannis I. S., Chalhoub C., Gotsiou P., Lydakis-Simantiris P., Kefalas., 2005.** Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (Multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* **45**, 193-203.

**Atawodi S. E., 2005.** Antioxidant potential of African plant. *African journal of biotic* **4 (2)**, 128-133.

**Avisse I., 2014.** Grand traité des miels, *Editions Le Sureau*, 293-80-111-113.

**Azeredo L. D. C., Azeredo M. A. A., De Souza S. R. & Dutra V. M. L., 2003.** Protein content and physicochemical properties in honey samples of *Apis Mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry* **80**, 249-254.

## B

**Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J. C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* **46**, 1086-1089.

**Bartosz G., 2005.** Superoxide Dismutases and Catalase. *The Handbook of Environmental Chemistry. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* **2**, 109-149.

**Baynes J. W., 2005.** Oxygen and life. In: Baynes JW, Domoniczak MH, *Medical Biochemistry. Philadelphia: Elsevier*, 497-506.

**Bellik Y. & Boukraâ L., 2013.** Honey an Ethnomedicine, in: Boukraâ, L., (Eds.), *Honey in Traditional and Modern Medicine. CRC Press, New York*, 1-10.

**Bellik Y. & Iguer-Ouada M., 2016.** Concurrent measurement of cellular turbidity and hemoglobin to evaluate the antioxidant activity of plants. *Food Chemistry* **190**, 486-473.

**Bellik Y. & Selles S. M. A., 2016.** In vitro synergistic antioxidant activity of honey-Mentha spicata combination. *Springer Science. Business Media : Food Measure*, New York, 8 p.

**Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino RM., 2005.** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **533**, 185-191.

**Blanc M., 2010.** Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de doctorat, Univ. Limoges, 142 p.

**Blasa M., Candiracci M., Accorsi A., Piacentini M. P., Albertini M. C. & Piatti E., 2006.** Raw *Milleriori* honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* **97**, 217-222.

**Bondy S. C., 2010.** The neurotoxicity of environmental aluminium is still an issue. *Neurotoxicology* **31**, 81-575.

**Bradbear N., 2005.** Apiculture et moyens d'existence durables. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. *ISSN 1813-6001*, Rome, 64 p.

**Bunn H. F., 1991.** Pathophysiology of the anemias. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, *Harrison's Principle of Internal Medicine*, New York: McGraw-Hill Inc, 8-1514.

**Buraimoh A. A., Ojo S. A., Hambolu J. O. & Adebisi S. S., 2011.** Effects of oral administration of Aluminum chloride on the histology of the hippocampus of wistar rats. *Curr. Res. J. Biol. Sci* **3**, 509-515.

**Buraimoh A. A., Ojo S. A., Hambolu J. O. & Adebisi S. S., 2012.** Effects of Aluminum chloride exposure on the histology of the liver adult wistar rats. IOSR , *Journal of Pharmacy* **2 (3)**, 525-533.

## C

**Candiracci M., Piatti E., Dominguez-Barragán M., GarcíaAntrás D., Morgado B., Ruano D., Gutiérrez J. F., Parrado J., Castaño A., 2012.** Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J. Agric. Food Chem* **19**, 12304-12311.

**Cavelier E., 2013.** Composition et techniques de production. Mémoire de master de traduction italien-français, ESIT, Université Sorbonne Nouvelle, Paris 3, 99 p.

**Charles D. J., 2013.** Natural Antioxidants. Chapitre 3. Dans: Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. *Springer Science, Business Media*, New York, 39-64.

**Cheesman K. H, Slater T. F., 1993.** An introduction to free radical biochemistry. In: Cheesman KH, Slater TF, *Free Radical in Medicine*. New York: Chrchill Livingstone, 93-481.

**Chen Q., Espey M. G., Sun A. Y., Pooput C., Kirk K. L., Krishna M. C., Khosh D. B., Drisko J. & Levine M., 2008.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 11105-11109.

**Ciulu M., Solinas S., Floris I., Panzanellia A., Pilo M. I., Piu P. C., et al., 2011.** RPHPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta* **83**, 924-929.

**Codex alimentarius., 2001.** Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Commission du Codex Alimentarius. *ALINORM 01/25*, 1-31.

**Comhair S. A. A., Erzurum S. C., 2002.** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, *American Journal Physiology Lung Cell. Molecular Physiology* **283**, 246-255.

**Couquet Y., Desmoulière A. & Rigal M. L., 2013.** Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités Pharmaceutiques* **52**, 22-25.

**Coyle J. E., et al., 2002.** Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA (A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33(1)**, 63-74.

## D

**Dai J., Mumper R. J., 2010.** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **15(10)**, 52-7313.

**De Oliveira S. & Saldanha C., 2010.** An overview aboute erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc* **44(1)**, 63-74.

**Delattre J., Beaudoux J. L., Bonnefont-Rousselot., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC, *éditions médicales internationales*, Paris, 1-405.

**Desmoulière A., 2013.** Le miel, de remarquables propriétés cicatrisantes. *Actualités pharmaceutiques* **531**, 17.

**Distribution** (Page consultée le 25/04/2018) Reserve.

[http://www.fbdistribution.ca/Causes\\_stress\\_ox.gif](http://www.fbdistribution.ca/Causes_stress_ox.gif)

**Domingo J. L., Gmez M., Llobet M. T. and Corbella J., 1991.** Influence of some dietary constituents on aluminum absorption and retention in rats. *Kidney Int* **39**, 598-601.

## E

**El-Beshbishy H., Ola M., Tork M. & El-Bab M., 2011.** Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. *Path* **18**, 125-135.

**El-Demerdash, F. M., 2004.** Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminum. *J. Trace Elem. Med. Biol* **18**, 113-121.

**El-Demerdash F. M., Yousef M. I., Kedwany F. S. & Baghdadi H. H., 2004.** Role of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hematobiochemical parameters and semen quality of male rats. *J. Environ. Sci. Health Bull* **39**, 443-459.

**Emmanuelle H., Julie C. & Laurent G., 1996.** Les Constituants Chimiques du Miel. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. APISERVICES, Galerie Virtuelle apicole.

**Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M., 2007.** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* **68**, 939-953.

**Escuredo O., Míguez M., Fernández-González M. & Seijo M. C., 2013.** Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry* **138**, 851-856.

## F

**Favier A., 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-115.

**Ferreira I. C. F. R., Aires E., Barreira J. C. M., Estevinho L. M., 2009.** Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry* **114**, 1438-1443.

**Ferrer J., Austin M., Stewart C. J. & Noel J., 2008.** Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 356-70.

**Fontaine E., 2007.** Radicaux libres. Dans: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Springer-Verlag*, France, 251-257.

**Friguet B., 2003.** Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique*, 103-107.

## G

**Ghazi F. & Sahraoui S., 2005.** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, Mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach.

## H

**Halliwell B. & Whiteman M., 1997.** In Antioxidant and Prooxidant Properties of Vitamin C, ed. L. Packer and J. Fuchs, *Marcel Dekker*, New York.

**Hoyet C., 2005.** Le miel: De la source à la thérapeutique. Thèse en vue d'obtention de docteur en pharmacie, Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy-I, 87 p.

## I

**Ichai C., Quintard H., Orban J. C., 2011.** Desordres Métaboliques et Réanimation: De La Physiopathologie Au Traitement, *Springer-Verlag*, France, 427-429.

## J

**Jacquot J. P., Dietz K. J., Rouhier N., Meux E., Lallement P. A., Selles B., Hecker A., 2013.** Chapitre 8, Redox Regulation in Plants: Glutathione and "Redoxin" Related Families. Dans: *Oxidative Stress and Redox Regulation*, *Springer Science Business Media Dordrecht*, 213-291.

**Jaffe J. A., Liftman C., Glickman J. D., 2005.** Frequency of elevated serum aluminium levels in adult dialysis patients. *Am J Kidney Dis* **46**, 316-9.

**Jean-prost P. & Medori P., 2005.** Matière première. In *Apiculture*. Lavoisier: Yves Le Conte. Paris, 161-183.

**Jeffery E. H., Abreo K., Burgess E., Cannata J., Greger J. L., 1996.** Systemic aluminum toxicity: effect on bone, hematopoietic tissue and kidney. *J Toxicol Environ Health* **4**, 649-65.

**Johnson R. M., Goyette Jr. G., Ravindranath Y., Ho Y.S., 2005.** Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med* **39**, 17-1407.

## K

**Kanatt S. R., Chander R., Sharma A., 2007.** Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem* **100**, 451-458.

**Kennett E. C., Ogawa E., Agar N. S., Godwin I. R., Bubb W. A., Kuchel P. W., 2005.** Investigation of methaemoglobin reduction by extracellular NADH in mammalian erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 45-1438.

**Knox A.** (page consultée le 28/05/2018) Harnessing honey's healing power 2004.

<http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/3787867.stm>

**Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique* **20**, 165-177.

**Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of Biological Systems. Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology* **30(6)**, 620-650.

## L

**Lasey G., Van Rij A., 1997.** Manuka honey and leg ulcers. *New Zealand Med. J* **13**, 216.

**Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale* **30**, 1076-1081.

**Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N., 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* **4(8)**, 118-126.

**Lotharius J. & Brundin P., 2002.** Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat.Rev.Neurosci* **3**, pp. 932-942.

**Lovstad R. A., 1984.** Ascorbate (vitamin C) and dehydroascorbate stimulation of copper induced hemolysis. Protective action of ceruloplasmin, albumin and apotransferrin. *International Journal of Biochemistry* **16**, 155-159.

**Lü Jian-Ming P., Qizhi Yaoa L. B. & Chen C., 2010.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* **14(4)**, 840-860.

## M

**Manyi-Loh C.E., Ndip R. N., Clarke A. M., 2011.** Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *Int J Mol Sci* **12**, 9514-9532.

**Macheix J. J., Fleuriet A. & Sarni-Manchado P., 2006.** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. *Tec et doc*, Paris, P : **398** : ISBN : 2-7430-0805-9.

**Mansour S., Alan S. & Norman B. R., 2006.** Aluminum-induced injury to kidney proximal effects on markers of oxidative damage. *J. Trace Elem. Med. Biol* **19**, 267-273.

**Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J. & Nacoulma O.G., 2005.** Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* **91**, 571-577.

**Misirlioglu A., Eroglu S., Karacaoglan N., Akan M., Akoz T., et al., 2003.** Use of honey as an adjunct in the healing of split-thickness skin graft donor site. *Dermatol Surg* **29**, 168-172.

**Mitrofan-Oprea L., Pali C., Tissier J. P., Héron A., Verpoort T., Behague M., Smaghe E., Schooneman F., Huart J. J., Goudaliez F., Montreuil J., & Bratosin D., 2007.** Nouveaux critères d'évaluation de la viabilité des hématies destinées à la transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique* **14**, 393-401.

**Molan P. C., 1999.** The role of honey in the management of wounds. *J. Wound Care* **8**, 415-418.

**Molan P. C., 2001.** Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am. J. Clin. Dermatol* **2**, 9-13.

**Moniruzzaman M., Sulaiman S. A., Mohd S. A. Azlan S., Hua Gan., 2013.** Two-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in Acacia honey. *Molecules* **18**, 14694-14710.

**Mouhoubi Z. T., Ouchemoukh S., Tamendjari A., 2016.** Antioxidant activity of some Algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*.

## N

**Nagababu E., Rifkind J., Sesikeran B. & Lakshmaiah N., 2010.** Assessment of Antioxidant Activities of Eugenol by *in vitro* and *in vivo* Methods. *Met Mol Biol* **610**, 165-180.

**Nayik G. A. & Nanda V., 2015.** Physico-chemical, enzymatic, mineral and color characterization of three different varieties of honeys from Kashmir valley of India with a multivariate approach. *Pol. J. Food Nutr. Sci* **65**, 101-108.

**Ndife J., Abioye L., Dandago M., 2014.** Quality Assessment of Nigerian Honey Sourced from Different Floral Locations, *Official Journal of Nigerian Institute of Food Science and Technology* **32 (2)**, 48-55.

**Nohl H., Stolze K., 1998.** The effects of xenobiotics on erythrocytes. *Gen Pharmacol* **31**, 7-343.

## O

**Ochmanski W. & Barabasz W., 2000.** Aluminum-occurrence and toxicity for organisms. *Przegl. Lek* **57**, 665-668.

**Ojeda de rodríguez G, Sulbarán de Ferrer B, Ferrer A, Rodríguez B., 2004.** Characterization of Honey produced in Venezuela, *Food Chemistry* **84**, 499-502.

## P

**Park P. J., Jung W. K., Nam K.S., Shahidi F. & Kim S. K., 2001.** Purification and characterization of antioxidative peptides from proteinhydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American oil Chemists Society* **78 (6)**, 651-656.

**Pincemail J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolism* **16**, 233-239.

**Pontes M., Marques J. C. & Câmara J. S., 2007.** Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta* **74**, 91-103.

## R

**Rodriguez-Flores M. S. Escuredo O. & Carmen Seijo M., 2015.** Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. *Food Chemistry*, 101-106.

**Rossant A., 2011.** Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse de Doctorat, Pharmacie. Université de Limoges, 136 p.

## S

**Sandra V. V., Lucia A. & Patricia I. O., 2008.** Aluminium and lead: molecular mechanism of brain toxicity. *Archives of Toxicology* **82**, 789-802.

**Sanz M. L., Gonzalez M., De Lorezo C., Sanz J. & Martinez-Castro I., 2008.** A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry* **91**, 313-317.

**Sastre J., Federico V., Pallardo J. V., 2005.** Glutathione. *The Handbook of Environmental Chemistry, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* **2**, 91-108.

**Schetinger M. R. C., V. M. Morsch. & D. Bohrer., 2002.** Aluminum: Interaction with nucleotides and nucleotidases and analytical aspects of 1<sup>st</sup> determination. *Struct Bond* **104**, 99-138.

**Shahzad A. Cohrs R. J., 2012.** In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): a translational medicine study for potential remedy for shingles. *Transl. Biomed* **3**, 2.

**Siems WG., Sommerburg O., Grune T., 2000.** Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol* **53**, S9-S17.

**Smith C., Marks A. D., Lieberman M., 2005.** Mark's Basic Medical Biochemistry. 2<sup>ed</sup>, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

**Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* **327**, 649-662.

## T

**Tanumihardjo S. A., 2013.** Carotenoids and Human Health. Humana Press, *Springer*, USA.

**Telen M. J, Kaufman R. E., 1999.** The mature erythrocyte. In: Greer JP, Foerster J, *Wintrobe's Clinical Hematology*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 47-217.

## V

**Vania M., Nakajima G., Abriela A., Julianaalves M., 2014.** Citrus bioactive phenolic: role in the obesity treatment **59(2)**, 2.

**Volpe E. P., 1993.** Blood and circulation. In: Dubuque WmC, *Biology and Human Concerns*. 65-253.

## W

**White J. W., 1975.** Physical characteristics of honey. In *Honey, a Comprehensive survey*, Crane, E (ed) Heinemann Edition, London, 207-239.

## X

**Xiang W., Weisbach V., Sticht H., Seebahn A., Bussmann J., Zimmermann R., Becker C. M., 2013.** Oxidative stress-induced posttranslational modifications of human hemoglobin in erythrocytes.

## Y

**Yao N., Eisfelder B., Marvin J. & Greenberg J. T., 2004.** The mitochondrion-An organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **40**, 96-610.

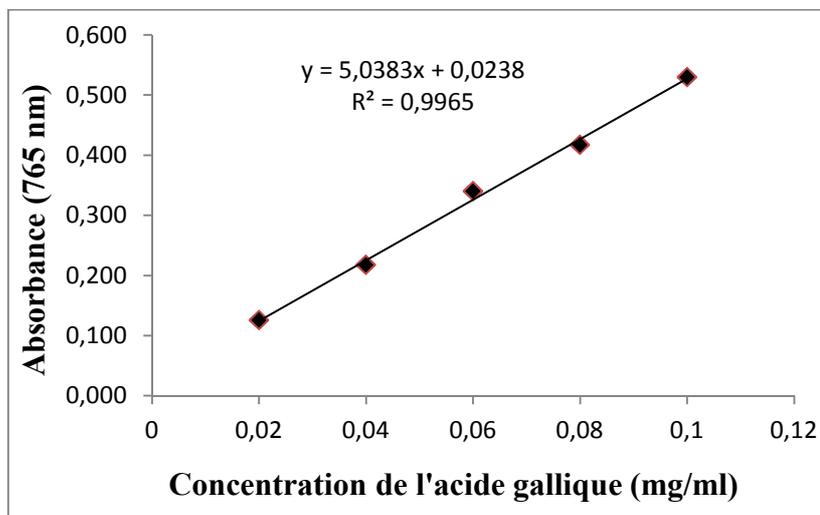
**Yokel R. A., 2000.** The toxicology of Aluminum in brain: Review, *Neurotoxicology* **21 (5)**, 813-828.

## Z

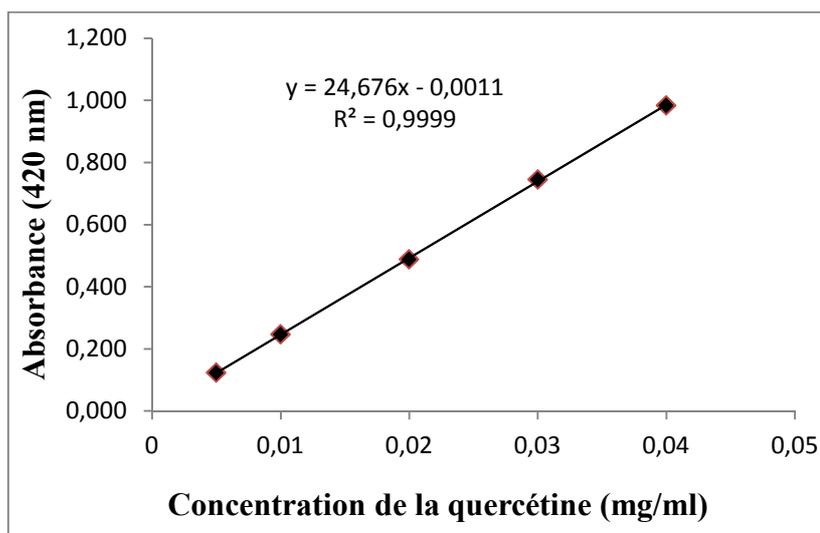
**Zweier J. L, Hassan., Talukder M. A., 2006.** The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* **70(2)**, 181-190.

# **Annexe**

## Annexe



**Figure 1** : La courbe d'étalonnage des phénols totaux.



**Figure 2** : La courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

**Tableau I** : Représentation du seuil de signification entre les deux types de miel en composés phénoliques.

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Miel 1, Miel 2	-,922	,093	<,0001	S

**Tableau II :** Représentation du seuil de signification entre les deux types de miel en flavonoïdes.

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Miel 1, Miel 2	-,465	,047	<,0001	S

**Tableau III :** Représentation du seuil de signification entre les deux types de miel en globules rouges.

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,002	,027	,8691	
Acide ascorbique, Miel 2	-,008	,027	,5319	
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,035	,030	,0252	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,023	,027	,0868	
Miel 1, Miel 2	-,006	,027	,6424	
Miel 1, Témoin négatif	-,033	,030	,0324	S
Miel 1, Témoin positif	,025	,027	,0660	
Miel 2, Témoin négatif	-,028	,030	,0653	
Miel 2, Témoin positif	,030	,027	,0301	S
Témoin négatif, Témoin positif	,058	,030	,0017	S

**Tableau IV :** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 1).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,098	,054	,0015	S
Acide ascorbique, Miel 2	-,142	,054	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,540	,054	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	-,017	,054	,5239	
Miel 1, Miel 2	-,044	,054	,1041	
Miel 1, Témoin négatif	-,442	,054	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,082	,054	,0056	S
Miel 2, Témoin négatif	-,398	,054	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,125	,054	,0002	S
Témoin négatif, Témoin positif	,523	,054	<,0001	S

**Tableau V :** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 2).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,102	,056	,0016	S
Acide ascorbique, Miel 2	-,158	,056	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,530	,056	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	-,011	,056	,6900	
Miel 1, Miel 2	-,056	,056	,0503	
Miel 1, Témoin négatif	-,428	,056	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,091	,056	,0037	S
Miel 2, Témoin négatif	-,372	,056	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,147	,056	<,0001	S
Témoin négatif, Témoin positif	,519	,056	<,0001	S

**Tableau VI :** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 3).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,087	,072	,0207	S
Acide ascorbique, Miel 2	-,102	,077	,0135	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,499	,072	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,019	,072	,5731	
Miel 1, Miel 2	-,015	,077	,6885	
Miel 1, Témoin négatif	-,412	,072	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,106	,072	,0066	S
Miel 2, Témoin négatif	-,397	,077	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,121	,077	,0047	S
Témoin négatif, Témoin positif	,518	,072	<,0001	S

**Tableau VII :** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 4).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,093	,065	,0077	S
Acide ascorbique, Miel 2	-,125	,065	,0009	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,505	,065	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	-,007	,065	,8142	
Miel 1, Miel 2	-,031	,065	,3190	
Miel 1, Témoin négatif	-,412	,065	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,086	,065	,0125	S
Miel 2, Témoin négatif	-,381	,065	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,117	,065	,0015	S
Témoin négatif, Témoin positif	,498	,065	<,0001	S

**Tableau VIII :** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 5).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,049	,066	,1350	
Acide ascorbique, Miel 2	-,094	,066	,0086	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,476	,072	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,007	,066	,8302	
Miel 1, Miel 2	-,045	,066	,1651	
Miel 1, Témoin négatif	-,427	,072	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,056	,066	,0927	
Miel 2, Témoin négatif	-,381	,072	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,101	,066	,0056	S
Témoin négatif, Témoin positif	,482	,072	<,0001	S

**Tableau IX :** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 6).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,048	,065	,1315	
Acide ascorbique, Miel 2	-,129	,070	,0016	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,487	,070	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	-,008	,065	,7948	
Miel 1, Miel 2	-,080	,070	,0282	S
Miel 1, Témoin négatif	-,438	,070	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,040	,065	,2019	
Miel 2, Témoin négatif	-,358	,075	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,121	,070	,0026	S
Témoin négatif, Témoin positif	,479	,070	<,0001	S

**Tableau X:** Représentation du seuil de signification en Hb (T = 24).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
Acide ascorbique, Miel 1	-,027	,064	,3781	
Acide ascorbique, Miel 2	-,117	,069	,0029	S
Acide ascorbique, Témoin négatif	-,429	,069	<,0001	S
Acide ascorbique, Témoin positif	,023	,064	,4461	
Miel 1, Miel 2	-,090	,069	,0148	S
Miel 1, Témoin négatif	-,402	,069	<,0001	S
Miel 1, Témoin positif	,050	,064	,1132	
Miel 2, Témoin négatif	-,313	,074	<,0001	S
Miel 2, Témoin positif	,140	,069	,0007	S
Témoin négatif, Témoin positif	,453	,069	<,0001	S