



*République Algérienne Démocratique et Population*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*  
*Scientifique*



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT : DE BIOLOGIE

**Mémoire**

*Présenté en vue de l'obtention du diplôme de*

**Master académique**

**FILIERE : Biologie**

**OPTION : Biochimie appliquée**

**Thème**

**Investigation physico-chimique et étude du  
pouvoir antioxydant  
des flavonoïdes issus du miel naturel  
de la région de Bouhmama (Khenchela)**

**Présenté par :**

ZEROUALI Hanane

SID Widad

**Encadré par :**

DOUAOUYA Lilia

Setenue le :11/06/2015

**Jury de soutenance :**

Président : M<sup>me</sup> Djemil Randa

(M.A.A) Univ.Abbès Laghrou-Khenchela

Encadreur : M<sup>me</sup> Douaouya Lilia

(M.A.A) Univ.Abbès Laghrou-Khenchela

Examineur : M<sup>elle</sup> Messai Alima

(M.A.B) Univ.Abbès Laghrou-Khenchela

*Promotion : Juin 2015*

Le travail à été réalisé au laboratoire de Biologie à l'Université Abbès Laghrou  
- Khenchela -

Le travail à été réalisé au laboratoire de Biologie à l'Université Abbès Laghrou  
- Khenchela -



## **Remerciements**



*Avant tout, nous remercions en premier lieu **ALLAH** le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les voies du savoir, et pour nous avoir accordé la volonté et le courage pour élaborer ce travail. Car sans lui rien n'est possible.*

*Tout d'abord nous remercions précisément **notre très chers parents** qui ont le droit de recevoir notre chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consentis pendant la durée de notre études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé.*

*Nous tenons à remercier vivement **M<sup>me</sup> DOUAOUYA Lilia** maître assistante à l'université *Abbes Laghrour-Khenchela* pour son encadrement, sa compréhension, son aide et sa très gentillesse durant tout le long de notre mémoire. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

*Sans oublier de remercier le **membre de jury** :*

***M<sup>me</sup> DJEMIL Randa** un grand honneur d'être le président du jury de soutenance, et exprimer notre gratitude d'avoir apporté une attention particulière à ce travail*

***M<sup>elle</sup> MESSAI Alima** qu'elle trouve ici l'expression de profonde reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand merci à **Monsieur SID Ilyas**, responsable du laboratoire d'analyse physico-chimique pour son aide et compréhension. Que Dieu le garde et le préserve pour sa famille.*

*Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail surtout **Mme : BOROBA. L.***

## *Dédicace*

*A l'aide de **dieu** tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie **ma mère** qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité que dieu me la garde*

*A **Mon très cher père** qui est ma source d'espoir, du savoir, son courage et sa patience pendant mes années d'études, avec toute ma gratitude et mon amour. Que dieu leur accorde une longue vie*

*A mes chers sœurs : **Nedjela, Mouna** et son mari **Hakim**.*

*A mes chers frères: **Abderrahmane, Ramzi, Achref***

*A mon oncle: **Nacer** pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.  
A toute la famille **Sid***

*A mon chère amie et ma collègue de travail: **Zerouali Hanane***

*A Toutes mes amies particulièrement: **Ibtisseme, Houria, Hizia, Widad, Fouzia, Zahia** et **Bariza**...*

*A tous mes collègues de la promotion **Master 2 Biochimie** avec qui j'ai partagé les joies et les difficultés durant ces années.*

*A Toutes les personnes qui on contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail ; je leurs dis «Merci»*

**WIDAD**

## *Dédicace*

*Avec l'aide de Dieu, J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à:*

- ❖ **la lumière de mes yeux**, l'ombre de mes pas et le symbole de tendresse *ma mère Hadda*, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, qui m'a pousser à aller toujours en avant qui m'ont donné confiance et courage. Je n'oublierai jamais son amour et je ne pourrai jamais oublier ce que tu restes toujours dans mon cœur, Pour l'esprit que Dieu ait son âme et ses paradis de l'âme.
- ❖ *Mon père Ali* : rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation... Que dieu te gardes et t'accorder santé, longue vie et bonheur.
- ❖ *A mon belle mère Saïda*, toi qui m'as sans cesse soutenue, orientée, à toi qui m'as patiemment, appris les choses de la vie .Je te remercie pour ta patience.
- ❖ *A mon encadreur Mme Douaouia Lilia* : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, son aide et sa compréhension.
- ❖ Mes étoiles qui éclairent ma venir : ma sœur *Widad* et mes frères *Chaker et Fares*.
- ❖ *A mes oncles* : Salleh , Mahmoud et Abd elwahhab.
- ❖ *A mes cousines* : Aida, Abir, Ibtissem, et à toute la famille.
- ❖ Comme je dédie mon œuvre à mon binôme *widad*.
- ❖ A mes amies sans exception et surtout :*Houria ,Zahia, Hizia,Widad ,Fouzia ,Ibtissem ,Bariza*.

A tous mes enseignants et mes collègues de la promotion 2015.

Enfin à tous ceux qui ont été oubliés par mon stylo mais n'ont jamais disparus de mon cœur.

**HANANE**

## **LISTE DES FIGURES**

<b>N° de figure</b>	<b>TITRE</b>	<b>N° de page</b>
<b>N°01</b>	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	<b>P : 06</b>
<b>N°02</b>	Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR	<b>P : 08</b>
<b>N°03</b>	Structures chimiques des antioxydants synthétiques	<b>P : 09</b>
<b>N°04</b>	Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène.	<b>P : 11</b>
<b>N°05</b>	Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes	<b>P : 12</b>
<b>N°06</b>	Une abeille butinant du nectar	<b>P : 14</b>
<b>N°07</b>	Composition moyenne du miel	<b>P : 16</b>
<b>N°08</b>	Brûlure du 2ème degré avant et après traitement par le miel	<b>P : 23</b>
<b>N°09</b>	Structure de base des flavonoïdes	<b>P : 26</b>
<b>N°10</b>	La biosynthèse des flavonoïdes	<b>P : 27</b>
<b>N°11</b>	Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité anti radicalaire des flavonoïdes	<b>P : 31</b>
<b>N°12</b>	Situation géographique de la commune de Bouhmama	<b>P : 35</b>
<b>N°13</b>	Mesure de pH du miel	<b>P : 36</b>
<b>N°14</b>	Mesure de la conductivité électrique du miel	<b>P : 37</b>
<b>N°15</b>	Mesure de l'indice de réfraction	<b>P : 38</b>
<b>N°16</b>	Mesure de la teneur en cendre par une four à moufle	<b>P : 39</b>
<b>N°17</b>	Protocole de préparation des extraits de miel	<b>P : 42</b>
<b>N°18</b>	Forme libre et réduite du DPPH	<b>P : 45</b>
<b>N°19</b>	Comparaison des rendements des quatre extraits	<b>P : 52</b>
<b>N°20</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).	<b>P : 53</b>

<b>N° 21</b>	Teneur en polyphénols totaux (mg Eq AG / g) des quatre extraits de miel	<b>P : 54</b>
<b>N°22</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).	<b>P : 55</b>
<b>N°23</b>	Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE) dans les extraits de miel	<b>P : 56</b>
<b>N°24</b>	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par le système solvant :Acétone/H <sub>2</sub> O	<b>P : 57</b>
<b>N°25</b>	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par le système solvant :Butanol/Acide acétique	<b>P : 58</b>
<b>N°26</b>	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait d'éther de pétrole par Le système solvant : Chloroforme/Méthanol	<b>P : 58</b>
<b>N° 27</b>	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait d'acétate d'éthyle par système solvant : Toluène/Acétate d'éthyle/Méthanol	<b>P : 59</b>
<b>N°28</b>	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait de n-butanol par le système solvant : Chloroforme/Méthanol/Eau distillée	<b>P : 59</b>
<b>N° 29</b>	Activité antioxydante exprimée en pourcentage d'inhibition des extraits du miel et l'acide ascorbique	<b>P : 61</b>
<b>N°30</b>	Changement de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration	<b>P : 61</b>

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>N° de Tableau</b>	<b>TITRE</b>	<b>N° de page</b>
<b>N°01</b>	Les principales espèces oxygénées réactives	<b>P : 05</b>
<b>N°02</b>	Les principales sources des ROS	<b>P : 08</b>
<b>N°03</b>	Principaux composants du miel en pourcentage (%)	<b>P : 19</b>
<b>N°04</b>	Les principales classes des flavonoïdes	<b>P : 28</b>
<b>N°05</b>	Le taux de sucres dans le miel	<b>P : 48</b>
<b>N°06</b>	Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique brute de miel	<b>P : 50</b>
<b>N°07</b>	Le rendement des différents extraits: méthanol, l'éther de pétrole, acétate d'éthyle, et n-butanol	<b>P : 51</b>
<b>N°08</b>	Teneur en polyphénols des extraits organiques du miel	<b>P : 53</b>
<b>N°09</b>	Teneur en flavonoïdes dans les extraits de miel	<b>P : 56</b>
<b>N°10</b>	Résultat de la CCM de la fraction des extraits de miel	<b>P : 60</b>

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

- ❖ **ADN** : Acide désoxyribo nucléique
- ❖ **BHA** : Butylhydroxyanisole
- ❖ **BHT** : Butylhydroxytoluène
- ❖ **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- ❖ **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- ❖ **EAE** : Extrait d'acétate d'éthyle
- ❖ **EEP** : Extrait d'éther de pétrole
- ❖ **EMB** : Extrait méthanolique brute
- ❖ **En-B** : Extrait de n-Butanole
- ❖ **ERN** : Espèce réactive de l'azote
- ❖ **G6PD** : Glucose-6-phosphate-déshydrogénase
- ❖ **GP<sub>x</sub>** : Glutathion peroxydases
- ❖ **GR** : Glutathion réductase
- ❖ **GS°** : Radical thiyle
- ❖ **GSH** : Thiol glutathion
- ❖ **GSHPX** : Glutathion peroxydase et réductase
- ❖ **GSSG** : Glutathion-dissulfure
- ❖ **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Le peroxyde d'hydrogène
- ❖ **HMF** : Hydroxyméthyl furfural
- ❖ **LDL** : Lipoprotéines de faible densité
- ❖ **L'O<sub>2</sub>** : l'Oxygène singulet
- ❖ **NADPH** : Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
- ❖ **NO°** : Oxyde nitrique
- ❖ **O<sub>2</sub>°** : Le radical superoxide
- ❖ **OH°** : Radical hydroxyl
- ❖ **ONOOH** : Acide du peroxydinitrite
- ❖ **PG** : Gallate propylée
- ❖ **pH** : Potentiel d'hydrogène
- ❖ **R<sub>f</sub>** : Rapport frontale
- ❖ **RNS** : Radicaux libres azotés
- ❖ **RO°** : Alcoxyles
- ❖ **ROO•** : Peroxyle

- ❖ **ROOH** : Hydroperoxydes
- ❖ **ROS** : Espèces réactives oxygénées
- ❖ **RSNO** : S-nitroso thiols
- ❖ **SOD** : Superoxyde dismutase
- ❖ **TBHQ** : Tétrabutylhydroquinone
- ❖ **UV** : Ultra Violet

# SOMMAIRE

Remerciements .....	I
Résumés .....	II
Liste des figures .....	III
Liste des tableaux .....	IV
Liste des abréviations .....	V
Introduction .....	01

## Partie I : Etude bibliographique

### Chapitre I : Stress oxydant et les antioxydants

1 / Définition du stress oxydant .....	03
2 / Les radicaux libres .....	03
2.1 / Différentes formes des radicaux libres .....	03
2.2 / Principales sources d'espèces réactives (ROS) .....	07
3 / Les conséquences moléculaires du stress oxydatif .....	08
4 / Les antioxydants .....	09
4.1 / Définition .....	09
4.2 / Les sources d'antioxydants .....	09

### Chapitre II : Le miel

1 / Définition de miel .....	13
2 / L'origine de miel .....	13
2.1 / Nectar .....	13
2.2 / Miellat .....	14
3 / Les types de miels .....	14
3.1 / Miels monofloraux (unifloraux) .....	14
3.2 / Miels multifloraux (polyfloraux) .....	15

---

4 / Formation de miel .....	15
4.1 / Transformation chimique du miel .....	15
4.2 / Transformation physique du miel .....	15
5 / Composition du miel .....	16
5.1 / Les composés majeurs.....	16
5.2 / Les composés mineurs.....	17
6 / Propriétés de miel.....	20
6.1 / Propriétés physiques .....	20
6.2 / Propriétés chimiques.....	22
6.3 / Les propriétés biologiques .....	22

### **Chapitre III : Les flavonoïdes**

1 / Définition.....	25
2 / Structure chimique.....	25
3 / Biosynthèse.....	26
4 / Classification.....	27
5 / Distribution et localisation .....	29
5.1 / Distribution.....	29
5.2 / Localisation.....	29
6 / Biodisponibilité des flavonoïdes .....	29
7 / Activités biologiques des flavonoïdes.....	30
7.1 / Activité antioxydante .....	30
7.2 / Effets antiallergiques .....	33
7.3 / Activités anti-inflammatoires et immunologiques.....	33
7.4 / Propriétés antibactériennes.....	33
7.5 / Activité antivirale .....	33
7.6 / Propriétés anticancéreuses .....	33
8 / D'autres effets biologiques .....	33

## Partie II : Etude expérimentale

### Chapitre IV : Matériel et Méthodes

<b>1 / Echantillon du miel .....</b>	<b>34</b>
<b>1.1 / Choix du miel de la région de Bouhmama .....</b>	<b>34</b>
<b>2 / Méthodologie .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 / Réactifs chimiques et instrumentations .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 / Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.1 / Le pH .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.2 / La conductivité électrique .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.3 / Teneur en eau et l'indice de réfraction .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.4 / La teneur en sucres .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.5 / Teneur en cendre .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.6 / la teneur en HMF .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2.7 / Pouvoir rotatoire .....</b>	<b>39</b>
<b>3 / Tests chimiques préliminaires.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 / Les saponosides.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2 / Les flavonoïdes .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 / Les tanins .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 / Cardénolides .....</b>	<b>40</b>
<b>4 / Préparation des extraits.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 / Préparation de l'extrait méthanolique brut .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 / Fractionnement de l'extrait brut .....</b>	<b>41</b>
<b>5 / Dosage des polyphénols.....</b>	<b>43</b>
<b>6 / Teneur en flavonoïdes .....</b>	<b>43</b>
<b>7 / Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par CCM .....</b>	<b>44</b>
<b>8 / Etude de l'activité anti-oxydante par test au DPPH .....</b>	<b>45</b>

## **Chapitre V : Résultats et Discussion**

<b>1 / Analyses physico-chimiques .....</b>	<b>47</b>
<b>1.1 / Le pH.....</b>	<b>47</b>
<b>1.2 / La conductivité électrique .....</b>	<b>47</b>
<b>1.3 / Teneur en eau et l'indice de réfraction .....</b>	<b>48</b>
<b>1.4 / La teneur en sucres .....</b>	<b>48</b>
<b>1.5 / Teneur en cendre.....</b>	<b>49</b>
<b>1.6 / Teneur en HMF .....</b>	<b>49</b>
<b>1.7 / Pouvoir rotatoire .....</b>	<b>49</b>
<b>2 / Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques .....</b>	<b>50</b>
<b>3 / Le rendement des l'extraits .....</b>	<b>50</b>
<b>4 / Teneur en polyphénols.....</b>	<b>52</b>
<b>5 / Dosage des flavonoïdes.....</b>	<b>55</b>
<b>6 / Chromatographie analytique sur couche mince .....</b>	<b>57</b>
<b>7 / Activité anti-oxydante .....</b>	<b>60</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>62</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>VI</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>VII</b>

## **Introduction**

Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles mellifères *Apis mellifera* à partir du nectar des fleurs ou des exsudats d'arbres et des plantes donnant des miels de nectar ou de miellat respectivement (Guerzou et Nadji, 2002).

Le miel a des caractéristiques physico-chimiques très variables (pH, conductivité électrique teneur en eau, indice de réfraction...) dues aux conditions climatiques et environnementales et à la diversité des origines des plantes à partir desquelles elles sont récoltées (Pyrzynska et Biesaga, 2009). Ces paramètres physico-chimiques sont utilisés comme critères de qualité du miel.

Le miel contient au moins 200 substances, principalement des hydrates de carbone et de l'eau. Il contient également les minéraux, les protéines, des acides aminés libres, les enzymes, les vitamines, les acides organiques, les flavonoïdes, les acides phénoliques et d'autres composés phytochimiques. La composition du miel dépend essentiellement des sources florales et certains facteurs externes comme les facteurs environnementaux et les méthodes de traitement (Terrab *et al.*, 2003).

Les antioxydants sont des substances endogènes ou exogènes capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Le corps produit des antioxydants, et on en trouve également dans plusieurs aliments (Hadbaoui, 2007).

L'activité antioxydante est la capacité et le potentiel du miel pour réduire les réactions oxydatives ainsi pour le traitement des brûlures, des troubles gastro-intestinaux, de l'asthme, des blessures et des ulcères de peau et bien d'autres usages thérapeutiques (AL-Mamary *et al.*, 2002 ; Lobreau *et al.*, 1999)

Le miel est connu pour être riche en antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques, notamment la glucose-oxydase, la catalase, l'acide ascorbique, les acides organiques, les acides aminés, et les protéines (Dimitrova *et al.*, 2007 ; paramas *et al.*, 2006).

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules.

En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles (Al-Mamary *et al.*, 2002).

Notre travail est subdivisé en deux parties essentielles; initié par une synthèse bibliographique dans laquelle nous résumons l'essentiel des connaissances sur le stress oxydatif et généralités sur le profil physicochimique et biologique du miel ainsi que l'étude des flavonoïdes.

La partie pratique consiste à l'investigation des caractéristiques physico-chimiques du miel de la région de Bouhmama et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction des flavonoïdes, leur identification par CCM, étude de leurs teneurs en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes et l'évaluation *in vitro* du pouvoir piégeur des différents extraits du miel vis-à-vis un radical libre relativement stable (DPPH).

## **I - Stress oxydatif et les antioxydants**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant la matière organique (Meziti, 2007).

Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques (Lesgards, 2000). Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques, par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (ROS) (Gutteridge, 1993). Ces derniers sont des espèces fortement toxiques et leur excès non neutralisés par les systèmes de défense est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules, entraînant des anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération à la mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse, dépôts de protéines dans les tissus (Favier, 2006).

Les défenses antioxydantes, dont une partie est dépendante de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres de l'oxygène (Valko *et al.*, 2007).

### **1 / Définition du stress oxydatif :**

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons UV, herbicides, ozone, métaux toxiques) (Favier, 1997).

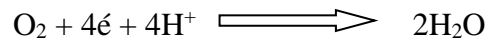
### **2 / Les radicaux libres :**

Un radical libre est un atome, une molécule ou une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés (Allen and Tresini, 2000). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN) (Bonfont *et al.*, 2003).

#### **2-1 / Différentes formes des radicaux libres :**

##### **2-1-1 / Radicaux libres oxygénés (ROS) :**

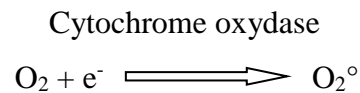
Le passage d'une molécule d'oxygène à deux molécules d'eau nécessite l'action de quatre électrons selon l'équation :



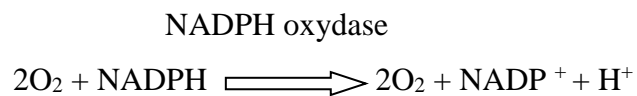
Cependant, et jusqu'à 5 % des cas, on peut assister à une réduction incomplète de l'oxygène en eau. Cette réduction incomplète aboutit à la production de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) mais surtout de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ). La dismutation de  $\text{O}_2^{\circ-}$  va donner naissance au peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) puis indirectement au radical hydroxyl ( $\text{OH}^\circ$ ) (Pincemail, 2002 ; Valko *et al.*, 2006).

#### a/ Le radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) :

L'origine principale du radical superoxyde est sans conteste la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial :



Le radical superoxyde peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



Une autre source possible est la xanthine oxydase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique .

#### Xanthine oxydase

$\text{Xanthine} + 2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Acide urique} + 2\text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+$  (Marfak, 2003 ; Antwerpen, 2006).

#### b/ Le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ) :

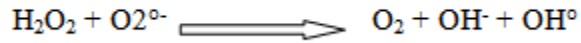
Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre ou leur forme réduite, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires in vitro: ils transforment l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$ . La formation du radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ) à partir du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en présence de fer ferreux est dite réaction de Fenton. Il est le radical libre le plus réactif



L'anion superoxyde permet aussi de reformer le fer ferreux à partir du fer ferrique :



Globalement, cette suite de réactions est appelée cycle d'HABER-WEISS : (Ahmad, 1995)



### c/ Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :

Le peroxyde d'hydrogène est produit à partir du radical superoxyde en solution aqueuse. Cette réaction provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène et du dioxygène (Halliwell *et al.*, 1984) catalysée par la superoxyde dismutase (SOD).



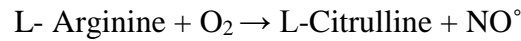
Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante (Jacques et André, 2004).

**Tableau 1:** Les principales espèces oxygénées réactives (Bartosz, 2003).

Radical	Formule
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Anion superoxydes	O <sub>2</sub> <sup>°-</sup>
Hydroxyle	OH <sup>°</sup>
Peroxyle	ROO <sup>°</sup>
Hydroperoxydes	ROOH
Alcoxyles	RO <sup>°</sup>
Oxygen singulet	1'O <sub>2</sub>
Oxyde nitrique	NO <sup>°</sup>

**2-1-2 / Radicaux libres azotés (RNS) :**

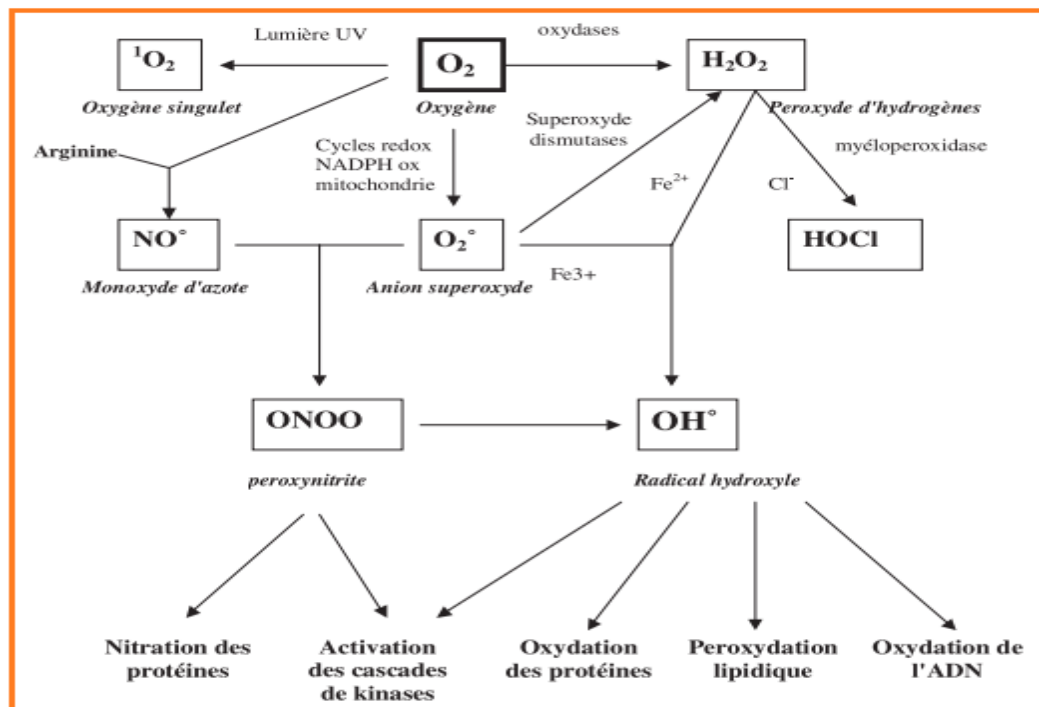
L'oxyde azotique NO° est principalement produit par un système enzymatique, la NO synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH.



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide d'enzyme (Radi, 2004).

**2-1-3 / Radicaux libres soufrés :**

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/ dithiol de protéines ou de petits peptides. Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tri peptide. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS°) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG°) (Houée ,2005).



**Figure 1:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

**2-2 / Principales sources d'espèces réactives (ROS) :**

Les ROS sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. On parle donc de sources endogènes et de sources exogènes.

**2-2-1 / Sources exogènes de ROS :**

Les radiations X ou gamma peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les rayonnements UV sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation des Photosensibilisants. Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des ROS qui se forment comme un des produits de leur métabolisme (Valko *et al.*, 2007).

**2-2-2 / Sources endogènes de ROS :****a/ La mitochondrie :**

C'est la source de production majeure d' $O_2^{\cdot-}$  dans la cellule intacte. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et par là même à l'intensité d'oxygénation. Cette production peut également s'intensifier lorsque interviennent des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels (carence en ubiquinone) (Favier, 2003).

**b/ Les NADPH oxydases :**

Il s'agit d'un complexe multimérique regroupant sept enzymes, présent dans de nombreux types cellulaires tels que les phagocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses. (Jungbluth, 2008).

**c/ Le Réticulum endoplasmique :**

Le Réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Turrens, 2003). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P<sub>450</sub> qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisent ainsi des ROS (Morel et Barouki, 1999).

**d/ La xanthine-oxydase :**

Elle joue un rôle important dans la production des ROS (particulièrement  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$ ), lors de l'ischémie/reperfusion. (Valko *et al.*, 2007).

**e/ Les peroxysomes :**

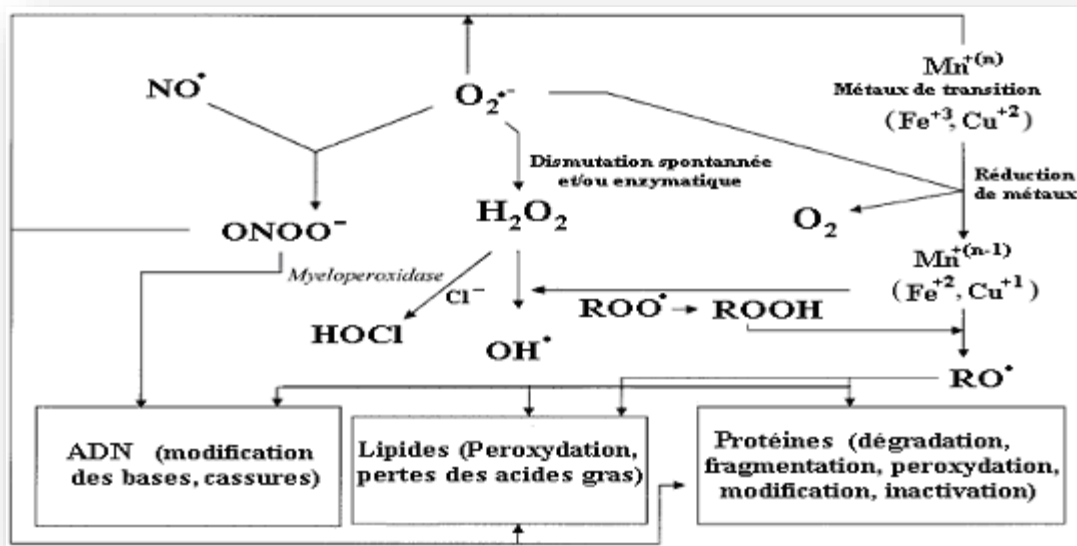
Les peroxysomes sont importante source de production  $H_2O_2$  cellulaire (Boveris *et al.*, 1972). Toutefois, l' $H_2O$  est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats (Balaban *et al.*, 2005).

**Tableau 2 :** Les principales sources des ROS (Belviranli et Gökbel, 2006).

Endogènes	Exogènes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mitochondries</li> <li>• Phagocytoses</li> <li>• Xanthine oxydase</li> <li>• Métaux de transition</li> <li>• Peroxysomes</li> <li>• Exercice physique</li> <li>• Inflammation</li> <li>• Choc</li> <li>• Ischiémie/reperfusion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cigarette</li> <li>• Radiation ionisantes</li> <li>• Pollutions diverses</li> <li>• Rayonnement UV</li> <li>• Produits chimiques &amp; médicaments</li> <li>• Ozone</li> </ul>

### 3 / Les conséquences moléculaires du stress oxydatif

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides (Laight *et al.*, 2000).



**Figure 2:** Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska, 2002).

## 4 / Les antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOR est particulièrement fragile. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ces derniers est assuré par des systèmes d'antioxydants. (Boyd *et al.*, 2003 ; Berger, 2006).

### 4-1 / Définition :

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. (Favier, 2003). Ils fixent les radicaux libres, protègent les protéines essentielles et diminuent ou empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques. (Weber, 2009).

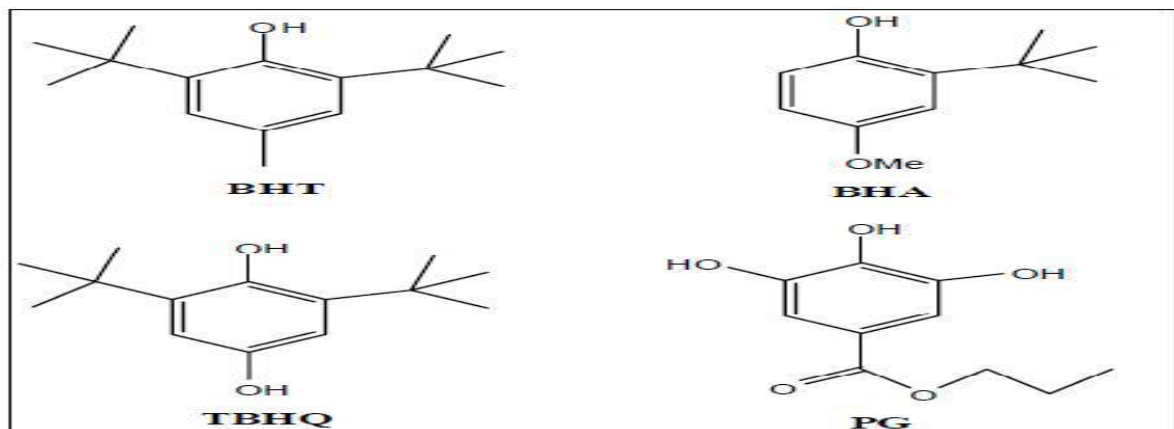
Le miel a également un éventail de constituants mineurs, dont beaucoup, y compris des polyphénols, sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes. Les composants majeurs de miel responsables de son effet antioxydant sont les flavonoïdes (Bertoncelj *et al.*, 2007).

### 4-2 / Les sources d'antioxydants :

En plus des substances propres à l'organisme représentées par les enzymes anti-oxydant telles que le superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase (Pastre, 2005), les médicaments, l'alimentation et les plantes sont également des sources d'antioxydants.

#### 4-2-1 / Antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. (Lisu *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu *et al.*, 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou cancérigènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques (Barlow, 1990).



**Figure 3:** Structures chimiques des antioxydants synthétiques (Amrani, 2012)

**4-2-2 / Antioxydants naturels :**

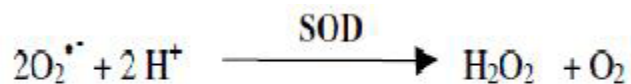
L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Diplock, 1991).

**4-2-2-1 / Les antioxydants enzymatiques :**

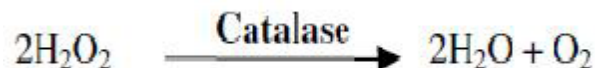
Les antioxydants enzymatiques (La superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

**a) Les superoxydes dismutases (SOD) :**

La famille des superoxyde dismutases comporte trois isoformes (SOD<sub>1</sub>, SOD<sub>2</sub>, SOD<sub>3</sub>) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub> (Antwerpen, 2006).

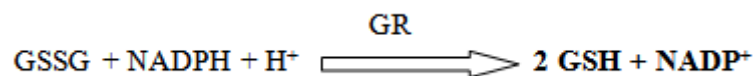
**b) Les catalases:**

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie. (Soulère *et al.*, 2002).

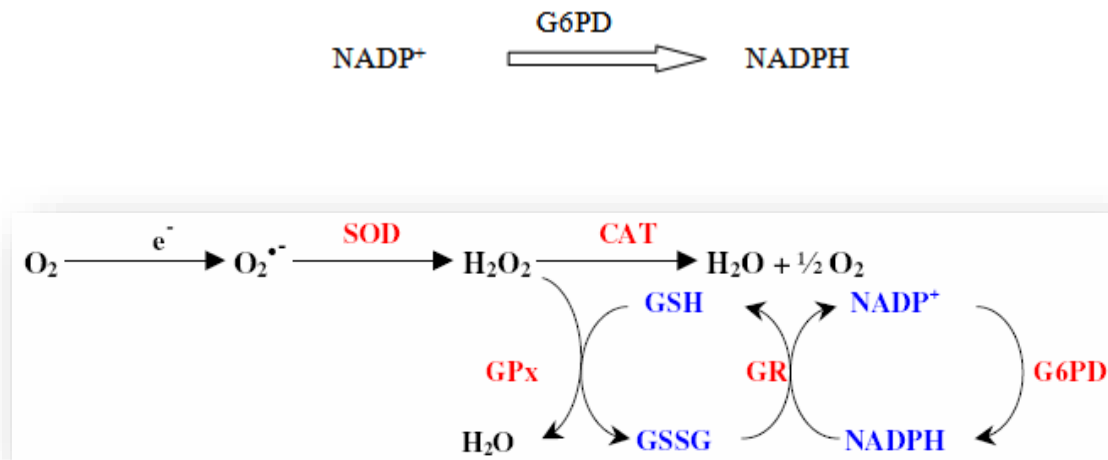
**c) La glutathion peroxydase et réductase (GSHP<sub>x</sub>) :**

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans le mitochondries .le rôle de glutathion peroxydases (GP<sub>x</sub> ) est de déduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxy des organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction , qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), Celles-ci se transforment en glutathion-dissulfure (GSSG) (Marfak, 2003).

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du  $\text{NADP}^+$  qui sera régénéré en  $\text{NADPH}$  pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme ; le G6PD (glucose-6-phosphate-déshydrogénase), (Curtay et Robin, 2000)



**Figure 4:** Principales étapes de la défense enzymatique contre les espèces réactives de l'oxygène.

#### 4-2-2-2 / Les antioxydants non enzymatiques :

Certaines substances ingérées sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement :

##### a) Vitamine C :

L'acide ascorbique et ses dérivés; Il peut être d'origine naturelle (fruits et légumes) ou synthétique. L'acide L-ascorbique (vitamine C) et son dérivé le palmitate d'ascorbyle, ils sont des antioxydants utilisés en synergie. Il possède un caractère acide et intervient dans les échanges d'oxydoréduction grâce à sa fonction éne-diol. L'acide ascorbique s'oxyde en acide déshydroascorbique, prévenant ainsi l'oxydation d'autres substances moins réactives (Portes, 2008)

##### b) Vitamine E :

Elle prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (Ahmet, 2003)

##### c) Glutathion :

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation en situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHP<sub>X</sub>. (Stamler et Slivka, 1996)

**d) Les oligoéléments :**

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes (Garait, 2006).

**e) Les caroténoïdes :**

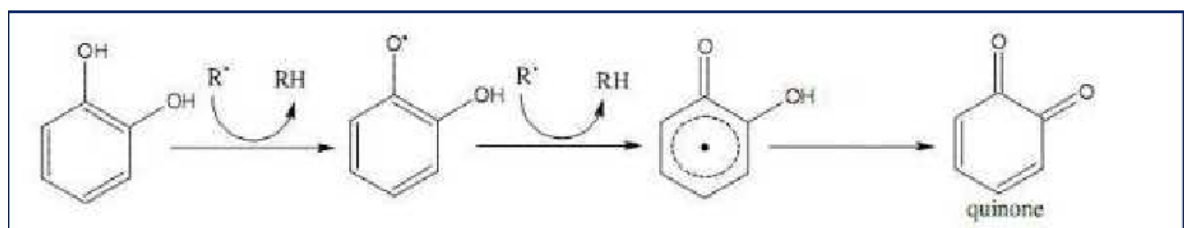
Se sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles . L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux  $ROO^\circ$ ,  $HO^\circ$ ,  $O_2^\circ$ ,  $R^\circ$  par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko *et al.*, 2006).

**f) Acide Urique :**

L'acide urique est un piègeur de l' $O_2$ , des radicaux peroxydes et hydroxyles ( $RO_2^\circ$  et  $HO^\circ$ ). La réaction de l'acide urique avec ces ROS génère des radicaux moins réactifs que  $HO^\circ$  ( Powers et Jackson ,2008)

**g) Les composés phénoliques :**

La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres : radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle ( $C_3OH$ ) fortement réactif .Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique. (Ghedira, 2005). Elle contribue aussi à l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) qui sont impliquées dans l'atherogénèse (Rehaba,2012)



**Figure 5:** Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Marfak, 2003)

## II -Le miel

L'homme s'est toujours intéressé à l'abeille, notamment par intérêt économique. Mais au-delà la production de miel et de cire, l'abeille est un insecte qui fascine par la complexité de ses comportements sociaux (Guerzou et Nadji, 2002). Le mot « miel » est issu du latin *mel*, *mellis* qui signifie « miel » et « douceur » apparenté au grec *meli*, *melitos* ainsi qu'au gothique *milith*. Le miel est ainsi étroitement lié à la notion de douceur, autant dans la littérature que dans l'esprit du consommateur.

### 1 / Définition :

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles "*Apis mellifera*" à partir du nectar des plantes ou à partir des sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivantes de 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). Le miel a pour objet la protection du consommateur contre les différents types de fraudes susceptibles d'être pratiqués (Louveaux, 1968). Les études récentes montrent que la qualité des divers miels consommés dans le monde entier dépend de nombreux facteurs biologiques, climatiques, écologiques ainsi que du mode d'extraction (Bogdanov *et al.*, 2004).

### 2 / Origine du miel :

Le miel de fleur est produit par les abeilles à partir du nectar des fleurs, alors que le miel de miellat est préparé à partir des sécrétions des parties vivantes de plantes ou des excréments des insectes suceurs sur la partie vivante des plantes (Sanz *et al.*, 2005).

#### 2-1 / Nectar :

Le nectar est une sécrétion sucrée produite par des organes glandulaires des végétaux appelés «les nectaires» qui sont très souvent situés dans les fleurs. Il constitue l'aliment énergétique privilégié de l'abeille (Bonimond, 1983). Les principaux constituants du nectar sont l'eau dont la teneur est fortement variable de 20 à 95%, et cela selon les espèces et selon les facteurs de l'environnement (météorologiques, situation géographique,...), les sucres dont la composition est relativement fixe pour une espèce ou même pour une famille botanique donnée.

Le nectar contient aussi des acides organiques, des acides aminés, des protéines, des enzymes des vitamines et des substances aromatiques. Ces substances sont présentes en faible quantité ne dépasse pas 1% (Ziegler, 1968).

Le nectar attire les abeilles qui le récoltent et le ramènent à la ruche. C'est par cette dernière pendant la collecte du nectar, que s'effectue la pollinisation des fleurs (Gonnet, 1982).



**Figure 6:** Photo d'une abeille butinant du nectar (d'après Webmaster, 2007)

### **2-2 / Miellat :**

Il s'agit d'un liquide sucré produit par plusieurs espèces d'insectes parasites vivant sur la plante, tels que des pucerons, des cochenilles ou des cicadelles par exemple. Ces insectes munis d'un appareil buccal piqueur suceur, prélèvent la lymphe végétale dont ils se nourrissent en perforant la plante qui les abrite (Bruneau, 2004). Le miellat est composé généralement des sucres d'où la composition est très différente des nectars avec présence du glucose, de triholoside comme le mélézitose et même quelquefois de sucres supérieurs (Bogdanov *et al.*, 2005), contient aussi des dextrines de gommes, de protéines et d'acides aminés, de vitamines tel que la thiamine et la biotine, de minéraux et d'acides organiques (acide nitrique et acide malique) ( Bruneau, 2004).

Les miellats représentent une ressource alimentaire importante pour les abeilles lorsqu'elles ne trouvent pas des fleurs à leur disposition.

### **3 / Les types de miels**

Selon l'origine géographique du miel qui se repose sur l'analyse pollinique, nous avons les miels monofloraux et les miels multifloraux.

#### **3-1 / Miels monofloraux (unifloraux) :**

Un miel uni florale est un miel récolté par les abeilles sur une espèce végétale unique, de tels miels sont exceptionnels, car il est rare que l'abeille ne butine qu'une seul espèce mellifère, on peut donc considérer que ses miels unis floraux naturels, sont des miels provenant d'une plante déterminé mais non à 100% (Bruneau, 2004).

Dans la pratique, il n'est pas facile de produire les miels monofloraux .Ainsi, leur prix est dans la plupart des cas, plus haut que le multifloral.

Les miels monofloraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques (Bagdanov *et al.*, 2008).

### 3-2 / Miels multif floraux (poly floraux) :

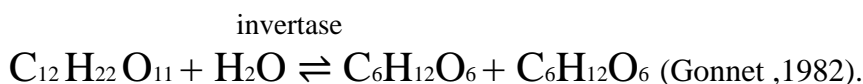
Les miels multif floraux, ou miel toutes fleurs, sont souvent classés suivant les lieux de récolte (miel de montagne, de forêt, etc.), ou encore suivant les saisons (miel de printemps ou d'été). (Donadieu, 1984)

### 4 / Formation de miel

Le nectar aspiré est alors accumulé dans le jabot de la butineuse où il commence sa transformation. Puis dans le tube digestif, des enzymes appelées les gluco-invertases, transforment le saccharose en glucose et fructose (Irlande, 2010)

#### 4-1 / Transformation chimique du miel :

Les sucres se transforment. Leur constitution chimique évolue entre celle du nectar ou du miellat et celle du miel. En particulier, le saccharose devient un mélange de glucose et de fructose sous l'action d'une enzyme, l'invertase, incorporée au nectar par la salive des abeilles. Ceci représente 90% des sucres totaux du miel. (Gonnet, 1982), La transformation, ou inversion, s'exprime par l'équation suivante :



En même temps, les abeilles réduisent la teneur en eau de la solution sucrée jusqu'à un taux avoisinant 50%. De retour à la ruche, les butineuses transfèrent leurs récoltes à des ouvrières d'intérieur, ces dernières par régurgitations successives complètent et terminent la transformation commencée. Puis, vont dégorger ce liquide sur des grandes surfaces dans des alvéoles disponibles sur les rayons de cire (Donadieu, 1984).

#### 4-2 / Transformation physique du miel :

La solution sucrée transformée, contenant encore environ 50% d'eau, va subir une nouvelle concentration par l'évaporation, qui s'effectue sous la double influence d'une part, de la chaleur régnant dans la ruche qui est de l'ordre de 36 à 37 °C, et d'autre part, par la ventilation qui est assurée par les abeilles ventileuses, en créant un puissant courant d'air ascendant dans la ruche par un mouvement très rapide des ailes. Au bout de quelques jours, cette solution contiendra en moyenne 18% d'eau, et 80% des sucres. Cette solution représente le miel stocké dans les cellules. Ces dernières, une fois remplies, sont calmatées par un mince opercule de cire, permettant une excellente conservation (Lobreau *et al.*, 1999).

## 5 / Composition du miel:

La composition du miel dépend de très nombreux facteurs : espèces butinées, nature du sol, race d'abeilles et état physiologique de la colonie (Fig.7) (Prost, 1979).

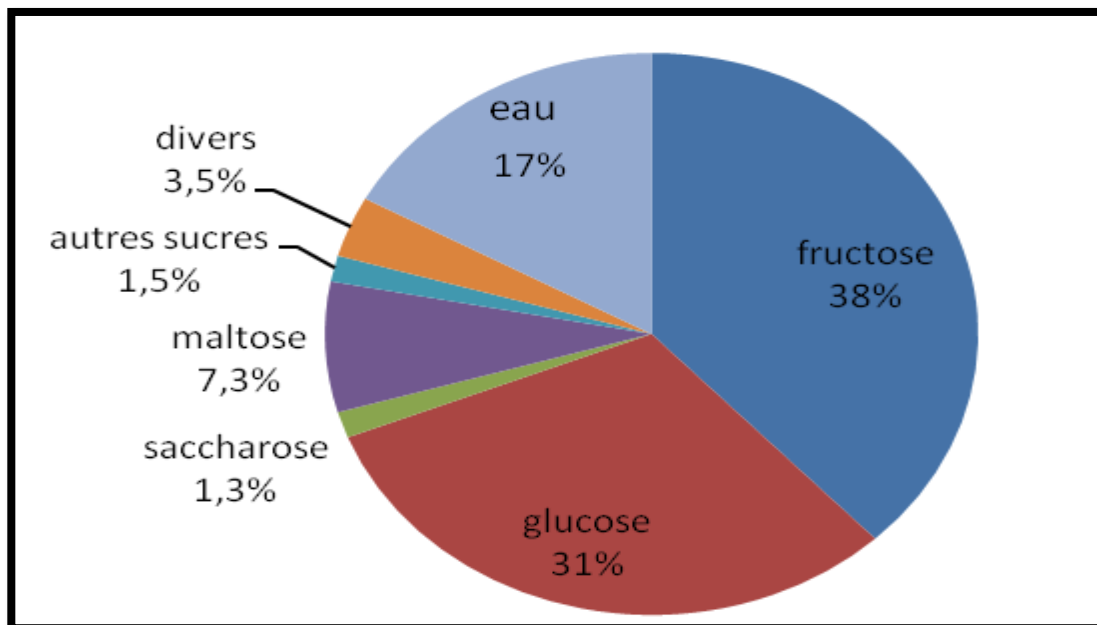


Figure 7 : Composition moyenne du miel (Bruneau , 2002)

### 5-1 / Les composés majeurs:

#### 5-1-1 / La teneur en eau :

Le miel contient un certain pourcentage d'eau qui varie en moyenne de 16 à 20 %; cette teneur en eau est l'une des caractéristiques les plus importantes du miel dans la mesure où elle conditionne pratiquement sa qualité (l'optimum se situe entre 17 et 18%) (Donadieu ,1978), elle conditionne la conservation du produit, son poids spécifique et dans certains mesure sa cristallisation (Terrab *et al.*, 2002).

#### 5-1-2 / Les glucides :

Les glucides ou sucres, présents en grande quantité : 78 à 80%. La majorité est des sucres simples (environ 90% des sucres totaux) avec une prédominance pour le fructose, davantage que le glucose. Une petite quantité de dissaccharides (sucrose, maltose, isomaltose), trisaccharides et oligosaccharides sont également présents et caractéristiques de leur origine botanique (Irland, 2010).

**5-2 / Les composés mineurs :****5-2-1 / Les protéines et les acides aminées :**

Ils sont présents en faible quantité dans le miel (0,26 %) et la teneur en azote est négligeable, de l'ordre de 0,041 %. Il s'agit essentiellement de peptones, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines qui proviennent soit de la plante (nectars, grains de pollen), soit des sécrétions de l'abeille. Il y a également des traces d'acides aminés comme la proline, la trypsine, l'histidine, l'alanine, la glycine, la méthionine, etc. La proline est le plus abondant des acides aminés du miel. La quantité de proline donne une indication sur la qualité du miel, et elle ne doit pas être inférieure à 183 mg/ kg (Meda *et al.*, 2005).

**5-2-2 / Les lipides :**

La fraction lipidique des miels est très faible et n'a guère fait l'objet de recherche. Il est probable que l'extrait éthéré du miel contient surtout de la cire provenant de l'extraction (Louveaux, 1985).

**5-2-3 / Les acides organiques :**

Tous les miels ont une réaction acide. Le pH optimum est de 3,9 et peut varier de 3,2 à 4,5. Ces miels contiennent, non pas, comme on le croyait autrefois, de l'acide formique provenant de la glande à venin, mais un mélange d'acides organiques dont certains sont présents dans le nectar alors que d'autres résultent des multiples réactions chimiques au cours de l'élaboration du miel. L'analyse de ces acides organiques a montré qu'ils sont nombreux ; mais c'est l'acide gluconique provenant du glucose qui domine. Son origine serait une bactérie, appelée *Gluconobacter* qui, lors de la maturation du miel, transformerait le glucose en acide gluconique (Descottes, 2004).

**5-2-4 / Les sels minéraux et oligo-éléments :**

Le miel contient une variété de métaux. La concentration en composés minéraux s'étale de 0,1% à 1%. En comparaison avec les miels de nectar, les miels de meillat sont plus riches en minéraux, ayant pour résultat une conductivité électrique plus élevée. Le potassium est le métal principal, suivi du calcium, du magnésium, du sodium, du soufre et du phosphore. Les oligoéléments incluent le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse (Lachman *et al.*, 2007)

**5-2-5 / Substances aromatiques :**

Plus de 50 substances aromatiques qui paraissent provenir exclusivement de la plante (Descottes, 2004). Ces arômes jouent un rôle important dans l'appréciation sensorielle du miel. Les substances aromatiques se conservent le mieux si le miel est stocké au froid dans des récipients fermés. Si l'on chauffe le miel, une part de ces substances est dégradée (Bogdanov, 2003).

**5-2-6 / Les enzymes :**

Le nectar contient des enzymes qui agissent sur les sucres; les sécrétions de l'abeille viennent y ajouter les enzymes des glandes pharyngiennes. Les principaux enzymes du miel sont: L'invertase ( $\alpha$ - 1,4 glucosidase), L'amylase ( $\alpha$  amylase; diastase), glucose oxydase, catalase et le phosphatase, elles proviennent principalement des abeilles.L'invertase et l'amylase sont importantes pour l'appréciation du miel (Serrano *et al.*,2007)

**5-2-7 / Les vitamines :**

Le miel est relativement pauvre en vitamines si on le compare à d'autres aliments. On n'y trouve aucune vitamine liposoluble (vitamine A et D), mais un peu de vitamine du groupe B et occasionnellement un peu de vitamine C. Les vitamines du miel ont presque toujours leur origine dans les grains de pollen qu'il contient en suspension (Descottes, 2004).

**5-2-8 / Hydroxyméthyl furfural (HMF) :**

L'HMF est un dérivé de déshydratation des sucres ; qui apparaît par réaction chimique naturelle lors du vieillissement ou du chauffage des miels. La dégradation des hexoses, en présence d'un acide, peut amener la formation d'un dérivé hétérocyclique à fonction carbonylée qui est l'Hydroxyméthyl-5-furfural ou HMF. La teneur en HMF est un critère de qualité important. (Bogdanov *et al.*, 2005).

**5-2-9 / Les composés phénoliques :**

Le miel est riche en acides phénoliques et flavonoïde, qui montrent un éventail effet biologique et agissent en tant qu'antioxydants naturels. L'analyse des polyphénols a été considérée comme une manière très prometteuse d'étudier des origines florales et géographiques des miels. La teneur des composés polyphénoliques (par exemple, les flavonoïdes et les acides phénoliques) en miel est fortement affectée par l'origine florale et géographiques aussi bien que par le climat caractéristique de la région (Pyrzynska et Biesaga, 2009).

Le miel sert de bonne source des antioxydants naturels, qui sont efficaces en réduisant l'occurrence de risque des maladies cardiovasculaires, du cancer, des différents processus inflammatoires et du déclin du système immunitaire (Lachman *et al.*,2010).

**Tableau 3:** Principaux composants du miel en pourcentage (%) (Ouchamoukh *et al.*,2007)

Eau	Eau	17,2
Sucres	Lévuiose (D-fructose)	38,19
	Dextrose (D-glucose)	31,28
	Saccharose (D- Saccharose)	1,31
	Maltose et autres disaccharides réducteurs	7,31
	Sucres supérieurs	1,5
	Sucres totaux	79,59
Acides	Gluconique, citriques, Malique, Succinique, formique, etc	0,57
Protéines	Acides aminées: acide glutamique, alanine, arginine, glycine, leucine, isoleucine, acide aspartique, valine, histidine et lysine	0,26
Cendres	Minéraux: potassium, sodium, magnésium, calcium, phosphore, fer, manganèse, cuivre, etc...	0,17
Composants mineurs	Comprenant principalement des pigments des substances aromatiques, des alcools de sucre, des tannins, des enzymes et des diastases dont l'amylase, la peroxydase, les scindés, l'hydrogénase, la phosphatase et les invertases, des vitamines dont la thianine, la riboflavine, l'acide nicotinique, vitamine K, l'acide folique, la biotine.	2,21

## 6 / Propriétés de miel

Le miel est un produit biologique d'une grande complexité, présentant un certain nombre de propriétés physiques, chimiques et biologiques.

### 6 -1 / Propriétés physiques :

#### 6-1-1 / Propriétés mécaniques :

##### \* La densité (poids spécifique) :

C'est à dire le rapport de la masse d'un miel avec le même volume d'eau, c'est une donnée très utile pouvant être utilisée pour mesurer la teneur en eau des miels (Descottes, 2004 ; Emmanuelle et *al.*, 1996). Le miel a une densité relativement élevée qui varie entre 1,40 et 1,45 g/cm<sup>3</sup>. La mesure du poids spécifique au moyen d'un densimètre ou de réfractomètre (Bogdanov *et al.*, 2003).

##### \* La viscosité :

Selon Descottes (2004), elle dépend de la température, de la teneur en eau et de la composition chimique. Elle diminue quand la température s'élève jusqu'à 30 C° et varie au delà de 35 C° (Prost, 1987).

#### 6-1-2 / Propriétés thermiques :

##### \* Chaleur spécifique :

La chaleur spécifiques du miel a été étudiée par Helvey au moyen d'un calorimètre sur des solutions de miel de plus en plus, la chaleur spécifiques est de 0.54 à 20°C pour 17% d'eau. Elle varie très peu d'un miel à l'autre. Le coefficient de température est de 0.02 cal/°C ; en moyenne, valeur relativement basse (Lazaridou *et al.*, 2004).

##### \* Conductibilités thermique :

La conductibilité thermique du miel s'exprime en calories par cm<sup>3</sup> par seconde par degré centigrade (l = la conductibilité) :  $L = 1.29 \cdot 10^{-4}$  à 20°C. Le miel contient d'autant mieux la chaleur qu'il est plus chaud. Très déshydraté il retrouve une bonne conductibilité thermique. (Huchet *et al.*, 1996).

##### \* L'abaissement du point de congélation:

Il dépend de la proportion de glucose et de la teneur en saccharose et en dextrines. Il serait de 1,42°C à 1,53°C en solution aqueuse à 15%, et 2,75°C à 3,15°C en solution aqueuse à 25% (Bogdanov *et al.*, 2006).

**6-1-3 / Propriétés électriques :****\* Conductibilité électrique :**

C'est la propriété du miel à conduire le courant électrique (Bonimond, 1983). D'après PROST (1987) la conductibilité électrique est liée à la teneur du miel en matières minérales, la mesure s'effectue à l'aide d'un conductimètre (Lobreau *et al.*, 1999). Conductibilité électrique est donnée en ms.cm-1(S pour Siemens) (Kaskoniené *et al.*, 2010).

**6-1-4 / Propriétés optiques :****\* Indice de réfraction :**

L'indice de réfraction du miel est mesuré au moyen du réfractomètre constitue la méthode la plus rapide et l'une des plus sûres pour évaluer la teneur en eau des miels (Donadieu, 2004). Le miel a un indice de réfraction qui oscille entre 1.47 et 1.50 selon sa teneur en eau à la température de 20 C° (Lobreau *et al.*, 1999).

**\* Pouvoir rotatoire :**

Egalement appelé « activité optique », le pouvoir rotatoire est la propriété qu'ont certains milieux de faire tourner le vecteur lumineux d'un faisceau lumineux la traversant. La majorité des miels sont lévogyres (Nadia *et al.*, 2003)

**\* Coloration :**

La couleur des miels va du blanc au noir. Elle s'apprécie au moyen de colorimètre et varie selon l'espèce butinée et la rapidité de la sécrétion. (miel clair si sécrétion rapide).

il existe des miels sans couleur ; transparents, d'autres sont blancs, mais la plupart des miels multif floraux sont ambrés, et certains sont très foncés, presque noirs. Elle est due aux matières minérales qu'il contient (Negueruela et Perez ,2000).

**\*Turbidité :**

Lorsque les miels sont ramenés à l'état liquide par passage à l'étuve à 65°C jusqu'à disparition totale des cristaux de glucose, ils se présentent généralement comme des liquides très transparents. Toutefois, ils contiennent toujours en suspension des éléments suivantes (levures, poussières, grains de pollen) qui leur donne une certaine turbidité (Marini *et al.*, 2004).

**\* Fluorescence :**

Beaucoup de miels présentent une fluorescence plus ou moins importante sous l'action de l'ultraviolet (Descottes, 2004).

**\*Odeur et goût :**

L'odeur du miel est variable (Blanc, 2010). L'arôme, le goût et la couleur du miel dépendent des plantes où les abeilles ont récolté le nectar.

Le miel foncé a généralement un goût plus prononcé et sa teneur en sels minéraux est élevée ; le miel clair a une saveur plus délicate (Bradbear, 2005).

**\*La cristallisation du miel :**

La cristallisation des miels est un phénomène très important car c'est de lui que dépend en partie la qualité du miel. La vitesse de cristallisation des miels est très variable. Elle est en fonction de la composition en sucres, de la teneur en eau, et de la température de conservation (Bruneau, 2002). Certains miels cristallisent dans les jours qui suivent la récolte; d'autres restent à l'état liquide pendant des années à la température ordinaire (Bogdanov *et al.*, 2003).

**6-2 / Propriétés chimiques :**

**6-2-1 / pH:**

Le pH ou "potentiel hydrogène". C'est la mesure du coefficient caractérisant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5 ; elle est due à la présence des acides organiques (Bogdanov *et al.*, 2004). Selon Schweitzer (2005), les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellats, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

**6-2-2 / L'hygroscopicité :**

Le miel tend à absorber l'humidité de l'air et, si on le laisse trop longtemps dans une atmosphère humide, cette absorption peut être considérable.

Un miel "normal", contenant 18% d'eau, peut atteindre, au bout de trois mois, une hygrométrie de 55% : son poids augmente alors de 84% (Huchet *et al.*, 1996).

**6-3 / Propriétés biologiques :**

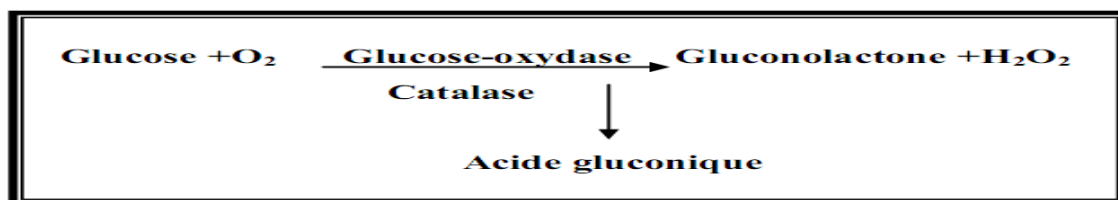
Le miel est non seulement un aliment mais on peut le considérer comme un médicament car il possède maintes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobienne, thérapeutique, nutritionnelles) (Lobreau *et al.*, 1999).

**6-3-1 / Propriétés antimicrobienne :**

Les miels ont été longtemps identifiés pour leur activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positive (Bogdanov *et al.*, 2008), les moisissures et les levures avec des propriétés uniques qui la rendent bactériostatique et bactéricide.

L'effet osmotique joue un rôle fondamental dans l'action anti bactérienne du miel, toutefois un certain nombre de bactéries n'étant pas inhibées dans des milieux à faible coefficient hydrique, il est clair que d'autres mécanismes interviennent. Le pH du miel semble être suffisamment bas pour ralentir ou éviter la croissance de nombreuses espèces pathogènes (Voidarou *et al.*, 2011). L'eau oxygénée aussi appelée peroxyde d'hydrogène est considérée comme la principale inhibitive du miel.

Elle est produite par réaction enzymatique ; c'est la glucose-oxydase, sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel qui permet la réaction suivante :



### 6-3-2 / Propriétés thérapeutique :

Le miel est non seulement considéré comme une substance sucrée, savoureuse, mais également comme une partie de la médecine traditionnelle (Paulus *et al.*, 2012 ; Bogdanov *et al.*, 2008). Nous citons ici quelques avantages les plus connus pour ce produit :

#### ➤ Avantages à l'appareil digestif:

Le miel améliore l'assimilation de nourriture et il est utile pour les problèmes intestinaux chroniques et congéniaux tels que la constipation, les ulcères duodénaux et les perturbations de foie (Fao, 1996).

#### ➤ Les propriétés cicatrisantes:

Le miel, par sa saturation en sucres entretient une pression osmotique trop élevée pour inhiber la croissance des microbes (Candiracci *et al.*, 2012). Cette action est à la base du traitement des plaies par le miel. Ainsi, cette pression entraîne une résorption de l'œdème péri lésionnel et un appel local de macrophage qui favoriseraient le nettoyage des plaies .

Il y a en plus une augmentation secondaire des fibroblastes producteurs de collagène qui favoriserait une cicatrice de bonne qualité (Attipou *et al.* , 1998).



**Figure 8 :** Brûlure du 2<sup>ème</sup> degré avant et après traitement par le miel (Assie, 2004).

#### ➤ La protection contre le cancer:

La consommation de miel fournirait une protection contre le cancer du sein.

Cette protection serait attribuable au pouvoir antioxydant du miel qui a désactivé les molécules oxydées naturellement dans l'organisme, par exemple les radicaux libres. Ces molécules étant impliquées dans les processus d'endommagement de l'ADN et dans la croissance des tumeurs cancéreuses, leur inactivation ralentirait ces phénomènes et donc la prolifération des cellules cancéreuses.

### **6-3-3 / Propriétés nutritionnelles :**

Le miel est un aliment glucidique à haute valeur énergétique (320 calories par 100 grammes de miel) assimilable par l'organisme par sa haute teneur en glucose et fructose (Melliou et Chinou, 2011). D'autre part, le miel est une source de différentes matières minérales comme le calcium, le magnésium, le soufre et le phosphore qui sont utiles au métabolisme.

De parts sa richesse en éléments biologiques, le miel intensifie les capacités du système immunitaire, Amélioration de la croissance de nouveau-nés non-allaités, faciliter une meilleure performance physique et la résistance à la fatigue, mais il n'est pas un aliment complet car il est pauvre en protide, lipide et vitamines (Blasa *et al.*, 2007 ; Khenfer et Fettal, 2001).

### **6-3-4 / Les miels toxiques :**

Par opposition à la qualité thérapeutique du miel, (Ravazzi, 2007) rapporte que certain miel étaient connus nocifs à cause de leurs origines botanique (troène, ailante, buis, aconit, ciguë, belladone). Le nectar de ces plantes, sans représenter une toxicité pour les abeilles, peut porter atteinte à la santé humaine (Ravazzi, 2007).

### **6-3-5 / Propriétés antioxydantes :**

Le miel est riche en acides phénoliques et flavonoïdes, qui montrent un éventail effet biologique et agissent en tant qu'antioxydants naturels.

L'analyse des poly phénols a été considérée comme une manière très prometteuse d'étudier des origines florales et géographiques des miels. La teneur des composés polyphénoliques (par exemple, des flavonoïdes et des acides phénolique) en miel et fortement affectée par l'origine florale et géographiques aussi bien que par le climat caractéristique de la région (Pyrznska et Biesaga, 2009).

Le miel est utilisé comme source naturelle d'antioxydants qui sont efficaces pour la réduction des risques des maladies telles que le cancer, la cataracte, le diabète, les maladies cardiovasculaire et les différents processus d'inflammation (Lachman *et al.*, 2010 ; Meda *et al.*, 2005). Cependant, cette activité est variable d'un miel à un autre selon la source botanique et la présence de différents composés antioxydant. L'action des composés phénoliques est peut-être liée à leur capacité de réduire et chélatureur l'ion ferrique qui catalyse la peroxydation des lipides (Al-Mamay *et al.*, 2002).

### III - Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus. (flavus=jaune) (Karaali *et al.*, 2004 ; Male et Kuntic, 2007). Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E. Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al.*, 2001) Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Harborne et Williams, 2000).

#### 1 / Définition :

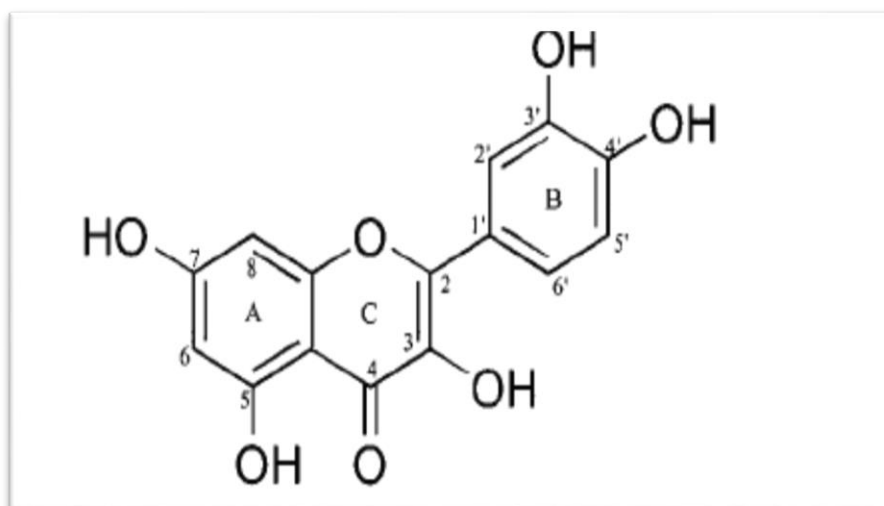
Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes appartenant à la famille des polyphénols (Bouakaz, 2006). 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, est converti en flavonoïdes (Athamena, 2009 ; Ababsa, 2012). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havasteen, 2002), presque toujours hydrosolubles (Ababsa, 2012). Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-Phényl Chromone portant des fonctions phénols libres (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires (Erlund, 2004), où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes (Bruneton, 1993).

#### 2 / Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone (Milane, 2004) à 15 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C, de façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Bouakaz, 2006).

Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Fig.9) (Bruneton, 1999). On signale que le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base (Milane, 2004).

La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C).

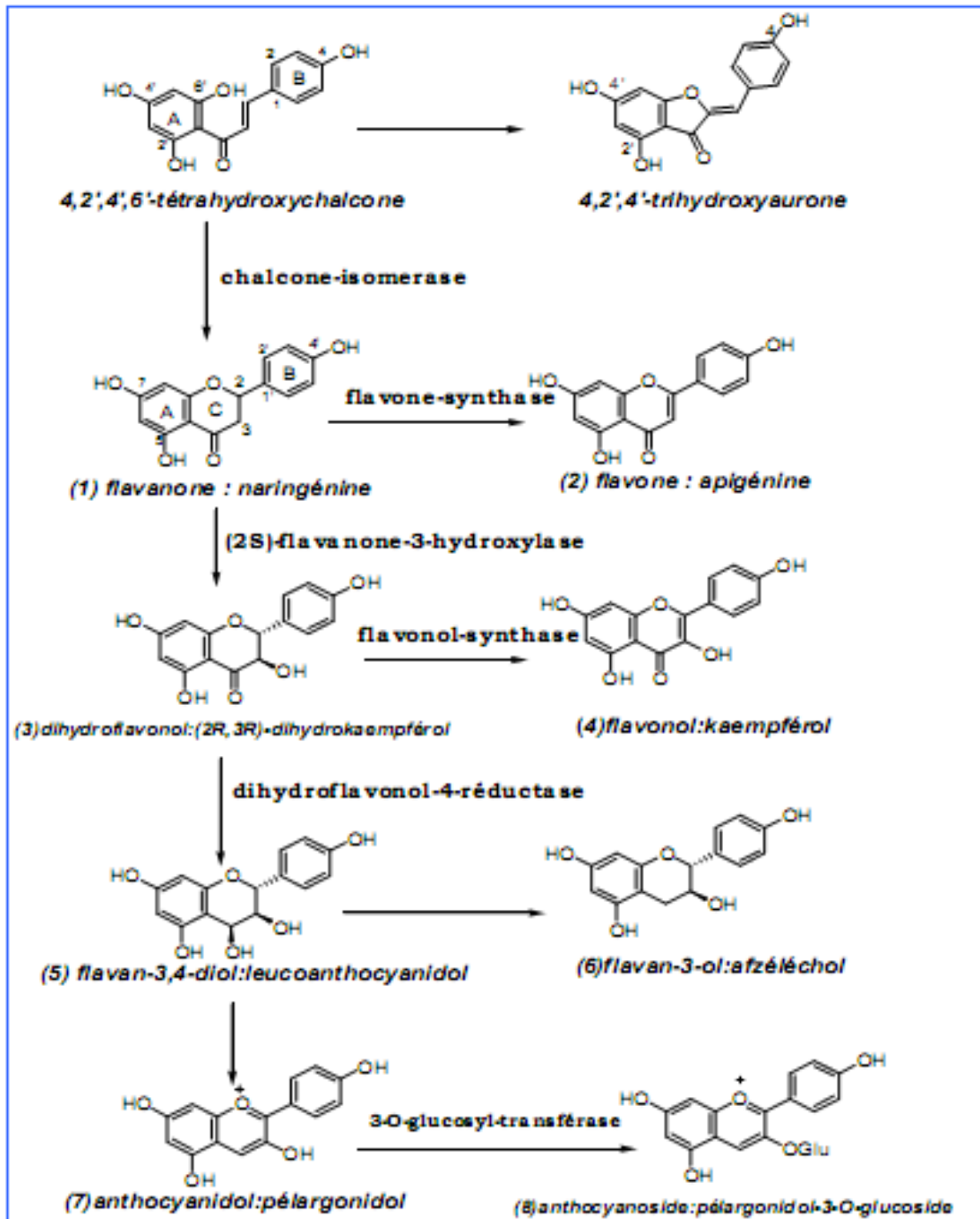


**Figure 9** : Structure de base des flavonoïdes (Heim *et al* , 2002)

### 3 / Biosynthèse :

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA.

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes ( Lhuillier ,2007 ).



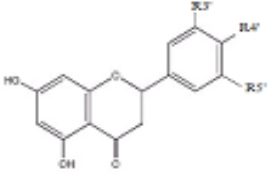
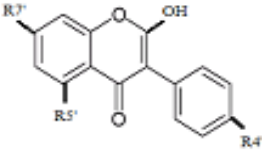
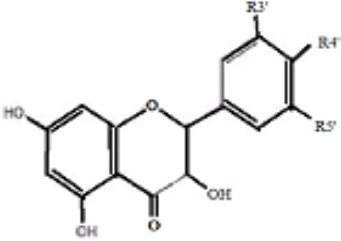
**Figure 10 :** La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton , 1999)

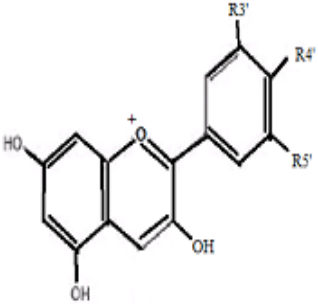
#### 4 / Classification des flavonoïdes :

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, c'est-à-dire, la présence de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Yao *et al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronones (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003) .

**Tableau 4:** Les principales classes des flavonoïdes (Nadia ,2009)

<p><b>Flavanones</b></p> 	<p>Naringénine Eriodictyol</p>	<p>Fruits du genre Citrus.</p>	<p>Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le Flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.</p>
<p><b>Isoflavones</b></p> 	<p>Genisteine Daidzeine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>	<p>Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.</p>
<p><b>Flavan3-ols</b></p> 	<p>Catéchine Epicatéchine Epigallocatec- -hine</p>	<p>Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat.</p>	<p>Flavan3ols ainsi que flavan3, 4diols sont tout les deux impliqués dans labiosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques</p>

<p><b>Anthocyanidines</b></p> 	<p>Cyanidine Delphénidine</p>	<p>Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.</p>	<p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p>
---	-----------------------------------	--	---

## 5 / Distribution et localisation

### 5-1 / Distribution :

Les flavonoïdes sont largement distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes (Milane, 2004). Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. (Lahouel, 2004; Piquemal, 2008).

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles (Marfak, 2003).

### 5-2 / Localisation :

Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant, alors le stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et de mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines (Boudet, 2000).

## 6 / Biodisponibilité des flavonoïdes :

Les flavonoïdes présentent ainsi des propriétés bénéfiques biologiques et antioxydantes. Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme.

Après métabolisation par les bactéries dans l'intestin, 15% des flavonoïdes aglycones sont absorbés par l'intermédiaire des micelles de bile par les cellules épithéliales et passent ainsi dans la lymphe (Spencer *et al.*, 1999).

Quelques flavonoïdes inhibent la diffusion facilitée des monosaccharides dans les cellules épithéliales de l'intestin. Les produits de dégradation sont sécrétés par des transporteurs d'acides organiques dans le sang et excrétés ensuite par les reins (Graefe *et al.*, 1999; Graefe and Veit, 1999). La demi-vie d'un flavonoïde dans l'organisme est d'environ 1-2 h. Ainsi, les flavonoïdes sont assez bien éliminés par la bile, et ne sont pas accumulés dans le foie l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6% de l'élimination totale (Milane, 2004).

## **7/ Activités biologiques des flavonoïdes :**

### **7-1 / Activité antioxydante :**

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. (Fuhrman *et al.*, 1995). L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

#### **7-1-1/ Propriétés pro-oxydantes :**

Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'autooxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*. Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (Milane, 2004).

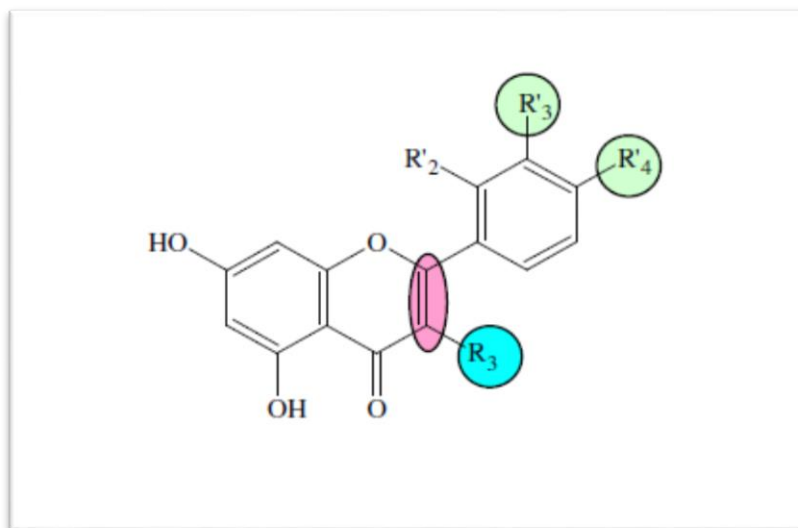
#### **7-1-2/ Le piégeage direct des ROS :**

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (Jovanovic, 1994), les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène.

En outre, le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction qui peut prendre place en présence de taux élevés de métaux de transition, est responsable de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (Mccord, 1995).

De nombreuses études ont établi la propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure (Jovanovic, 1994 ; Cotelle, 1996 ; Pietta, 2000), cette activité nécessite les critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyles sur le cycle B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox et donc le pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes) (Chen *et al.*, 2012).
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité antiradicalaire des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Seyoum *et al.*, 2006).
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 augmente également la capacité à piéger les radicaux des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et une perte de la coplanarité conduisant ainsi à la réduction de l'activité antioxydante) (Heim *et al.*, 2002 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Seyoum *et al.*, 2006).



**Figure 11 :** Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des Flavonoïdes (Seyoum *et al.*, 2006)

**7-1-3/ Inhibition enzymatique :**

En règle générale, les flavonoïdes sont *in vitro*, des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine; l'élastase; l'hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proantho-cyanidols; la phosphodiésterase de l'AMPc; l'aldosereductase par le quercétiroside, ainsi que par des méthoxyflavones; la protéine-kinase, notamment par le lutéolol; plusieurs flavonoïdes (cirsiolol, hypolaetine, etc.) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Quant à (lutéolol, apigénol, chrysin, etc.) inhibent la cyclooxygénase (Bruneton, 1999).

Quelques flavonoïdes sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse des prostaglandines. Cet effet est dû à l'inhibition de certaines enzymes (lipoxygénase, phospholipase, cyclo-oxygénase) impliquées dans leur biosynthèse.

L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes (pinostrobin, quercétine, morinemyricétine,) est attribuée à leur efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (Hodek et al., 2002). Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase (Bruneton, 1999).

**7-1-4/ Chélation des ions métalliques :**

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple  $\text{Cu}^{+2}$  est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques (Brown, 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer, en créant des composés complexes inactifs (Malešev et Kuntić, 2007) mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Brown J, 1998).



La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés dans ce travail. On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (1) un noyau catéchol sur le cycle B, (2) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (3) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C.

**7-1 / Effets antiallergiques :**

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et les composés phénoliques et terpéniques ATPase Ca<sup>2+</sup>-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. (Marfek , 2003)

**7-2 / Activités anti-inflammatoires et immunologiques :**

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires (silva, 1994 ; Galati., 1994 ; Read,1995) par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations (González *et al* .,2007) . Aussi les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton et Elliott ,1996), ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T ( Namgoong *et al* .,1994).

**7-3 / Propriétés antibactériennes :**

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire. (Cowan ,1999).

**7-4 / Activité antivirale :**

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du romarin, a indiqué qu'il ya une inhibition de l'infection (Aruoma , 1996 ; Milane ,2004) par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) aux concentrations très basses, qui ont étaient également cytotoxiques. Cependant, le carnosol a montré une activité anti-HIV à une concentration de 8µM qui n'était pas cytotoxique (Tapas *et al* .,2008).

**7-5 / Propriétés anticancéreuses :**

Les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder ou d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Nadia ,2009). Alors certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein, de la prostate et l'ostéoporose.

**8 / D'autres effets biologiques :**

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (Van *et al* .,1998). Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Xu *et al* .,2007). Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires.

**Objectif :**

Ce présent travail repose essentiellement sur l'évaluation de l'activité antioxydant de miel de la région de Bouhmama, L'expérimentation s'est déroulée au niveau du laboratoire de biologie à l'université Abbes Laghrour «Khenchela».

**1 / Echantillon du miel :**

L'échantillon du miel récolté dans l'hiver et conservé dans un flacon en verre stérile, hermétiquement fermé et gardé à la température ambiante, cette technique est utilisée pour protéger les composés sensibles à la chaleur et à la lumière.

**1-1 / Choix du miel de la région de Bouhmama :**

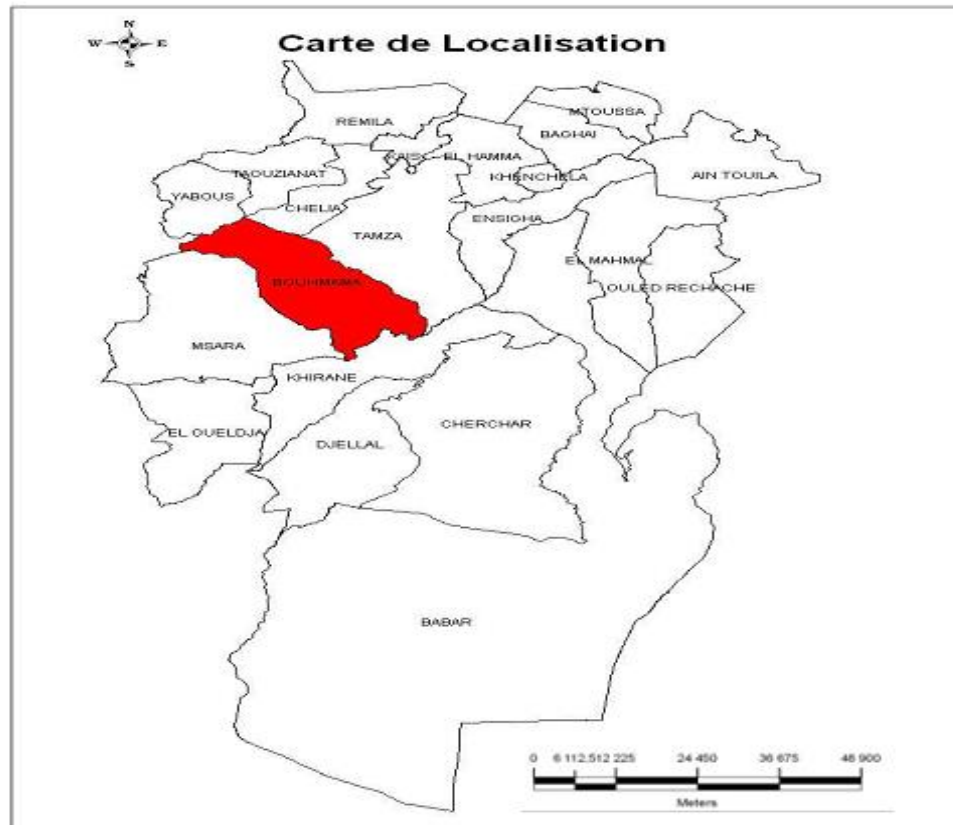
L'analyse de la flore des Aurès montre qu'elle est très riche en espèces médicinales dont la récolte ou la culture peut procurer un certain nombre d'emplois. Pour cette raison, l'étude est basée sur le miel de la région de Bouhmama à cause de sa richesse en plantes médicinales mellifères.

**❖ Situation géographique :**

La région de Bouhmama est située au Nord-Ouest de la Wilaya de Khenchela et dans la partie Est des Aurès. Elle est presque complètement entourée d'une chaîne de montagnes. Les limites géographiques de Bouhmama sont :

- \* Nord-ouest : Massif de CHELIA ;
- \* Nord : Contreforts des massifs de CHELIA ;
- \* Est : Massif de BENI MLOUL ;
- \* Sud-est : Gorge de MELLAGOU.

La commune de bouhmama abrite une population totale de 10520 habitants sur un territoire couvrant une superficie de 409 km<sup>2</sup> soit une densité de peuplement de 25,72 habitants au km<sup>2</sup>.



**Figure 12 :** Situation géographique de la commune de Bouhmama (Ceneap, 2008)

❖ **Le climat :**

La région de Bouhmama se trouve dans une zone à climat semi-aride avec un hiver froid humide et un été chaud où la moyenne annuelle des précipitations est de l'ordre de 600mm/an. La température moyenne annuelle est de 15,8 °C (Reminiéras, 1986)

❖ **Couverture végétale :**

Les différentes espèces fruitières plantées dans la région de Bouhmama sont : pommier, noyer, abricotier, poirier, figuier, cerisier, vigne de table dont la superficie importante est celle du pommier avec 848 ha ( Houbibi,2012)

La surface forestière : est de 28776 ha, cette superficie englobant un cortège floristique diversifié composé d'essences précieuses telles que :

\* Le cèdre (*Cedrus atlantica* MANETTI) ; le pin d'Alep (*Pinus halpensis* MILL) ; et le chêne vert (*Quercus ilex*).

- Autour des habitations et de quelques fermes, nous observons des petits jardins irrigués à partir des puits de faible profondeur où sont cultivés des légumes.

## 2 / Méthodologie :

### 2-1 / Réactifs chimiques et instrumentations :

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: méthanol, éther de pétrole, acétate d'éthyle, n-butanol, FeCl<sub>3</sub>, magnésium, alcool chlorhydrique, acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), HCl, acide acétique, toluène, acide ascorbique, acétone, CHCl<sub>3</sub>, quercetine, le radical 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) ; Réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique, carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>),

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER COURMAT), pH mètres (Hanna), Agitateur magnétique (SCIOGEX), Four à moufle (PROTHERM), Dessiccateur, Réfractomètre, Conductivimètre (HANNA instruments, EC 215) et Balance (OHAUS).

### 2-2 / Analyses physico-chimiques :

Les analyses physico-chimiques ont été effectuées sur l'échantillon de miels en vue de connaître leurs caractéristiques.

Nous avons sélectionné certains paramètres qui nous permettrons d'apprécier la qualité de miel étudié qui sont:

#### 2-2-1 / Le pH :

Le miel est acide, et son pH oscille en moyenne, entre 3,5 et 6, l'étude de l'acidité d'un miel permet d'identifier son origine botanique. Les miels de nectar ont un pH faible (de 3,3 à 4,5) tandis que les miels de miellat ont un pH un peu plus élevé (de 4,5 à 5,5) (Deschamps V. 1998). Le pH d'un miel est mesuré à l'aide d'un pH- mètre. Les électrodes du pH mètre sont immergés dans le miel (Bogdanov, 2002).



**Figure 13** : mesure de pH du miel

### 2-2-2 / La conductivité électrique :

C'est la mesure de la capacité de cet échantillon de miel à transmettre un flux électrique ou conductance. (Acquarone *et al.*, 2007) la mesure de la conductivité électrique est un bon critère pour déterminer l'origine botanique d'un miel (Bogdanov *et al.*, 1997) car elle permet de distinguer facilement les miels de miellats des miels de nectar, les premiers ayant une conductibilité bien plus élevée que les seconds. La conductivité électrique a été déterminée à 20° en utilisant un conductimètre Les déterminations ont été effectuées sur une solution aqueuse de miel à 20%. (Leo *et al.*, 2011)



**Figure 14:** Mesure de la conductivité électrique du miel

### 2-2-3 / Teneur en eau et l'indice de réfraction :

La détermination de la teneur en eau est basée sur la mesure de l'indice de réfraction. Quelques grammes de miel sont introduits dans un tube à essai puis mis au bain marie à 50 °C jusqu'à disparition des cristaux de sucres. Après homogénéisation, une petite quantité de miel est déposée sur le prisme de réfractomètre. La surface de ce dernier est couverte par une goutte de miel, l'indice est affiché après 2 minutes (Bogdanov, 2002). Une fois l'indice de réfraction obtenu, le pourcentage de la teneur en eau correspondant est donné par le tableau de CHATWAY à 20 °C.



**Figure 15** : mesure de l'indice de réfraction

#### 2-2-4 / Teneur en sucres :

Grasse à la méthode réfractométrique, la lecture est faite sur l'échelle qui indique la teneur en sucres (saccharose, glucose, fructose) qui se trouve en parallèle avec l'échelle de l'indice de réfraction.

#### 2-2-5 / Teneur en cendre :

La capsule d'incinération vide étant pesée, 5g d'échantillon sont ajoutés et la capsule est soumise à la température de 600°C dans un four à moufle pendant 4 à 5h. Après incinération, la capsule contenant les cendres est refroidie puis pesée.

La proportion des cendres brutes est obtenue à partir de la formule suivante :

$$C\% = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100$$

Dont:

$m_0$  : masse en g de la capsule vide

$m_1$  : masse en g de la capsule + échantillon avant incinération

$m_2$  : masse en g de la capsule + cendres après incinération

C% : teneur en cendres brutes



**Figure 16 :** Mesure de la teneur en cendre par une four à moufle

#### **2-2-6 / Teneur en HMF :**

L'analyse de la quantité d'hydroxyméthylfurfural (HMF) est une excellente méthode pour apprécier la qualité d'un miel : sont vieillissement et son chauffage (Rizelio *et al.*, 2012; Bogdanov *et al.*, 1997)

Le taux d'HMF est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à doubles rayons, cette méthode détermine la concentration d'HMF du miel, son principe est basé sur la détermination de l'absorbance UV de HMF à deux longueurs d'onde 284 nm et 336nm, HMF est calculé après la soustraction des deux absorbances 284 nm et 336 nm (Amr *et al.*, 2007).

#### **2-2-7 / Pouvoir rotatoire :**

Egalement appelé « activité optique », le pouvoir rotatoire est la propriété qu'ont certains milieux de faire tourner le vecteur lumineux d'un faisceau lumineux la traversant. Les composés induisant une déviation du vecteur vers la droite sont qualifiés de « dextrogyres » (c'est le cas du saccharose, par exemple), tandis que les composés induisant une déviation du vecteur vers la gauche sont dits « lévogyres » (le fructose en fait partie). Le pouvoir rotatoire du miel est utilisé en Italie pour distinguer le miel de fleurs du miel de miellat. Cependant, les seuils limites n'ont pas encore été acceptés en France (Bogdanov *et al.*, 1997).

### 3 / Tests chimiques préliminaires :

L'échantillon de miel est subi des tests chimiques pour confirmer la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires.

#### 3-1 / Les saponosides :

On utilise la propriété qu'ont les solutions aqueuses de saponosides de donner par agitation une mousse persistante après une macération de (2g) de miel étudié dans trois bichers différents contenant (80 ml) d'eaux distillée.

#### 3-2 / Les flavonoïdes :

La méthode utilisée est celle dite (réaction de SHIBATA).

- Mettre 2 ml d'extrait aqueux à 10% dans un tube à essai.
- Ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (4 ml et OH + 1 ml HCl concentré) et 2 ou 3 copeaux de magnésium. Une coloration rose orangé ou violacée apparaissant lorsqu'il y a des flavonoïdes. (Ciulei, 1982).

#### 3-3 / Les tanins :

La réaction effectuée est l'action de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) 5% sur l'extrait aqueux à 10%, l'apparition d'une coloration bleu noire ou verte dénotant la présence de tanins. (Harborne, 1968 ; Ribereau , 1968)

#### 3-4 / Cardénolides :

5 g de miel sont macérés avec 20 ml d'eau distillée dans trois bicher différents, 10 ml de filtrats est mélangé avec 10 ml de ( $\text{CHCl}_3$ , et éthanol). La phase organique est évaporée, et est dissous dans 3 ml d'acide acétique, simultanément alors a déplacé à une éprouvette.

On ajoute quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$ , et a suivi en ajoutant 1 ml d'acide sulfurique concentré. Les solutions ne sont pas colorées par une couleur verte bleu indique l'absence de cardénolide.

### 4 / Préparation des extraits :

#### 4-1 / Préparation de l'extrait méthanolique brut :

200g du miel sont mises à macérer pendant une nuit à température ambiante, dans un mélange méthanol-eau (7:3 V/V), le tout par la suite est filtré sur papier filtre.

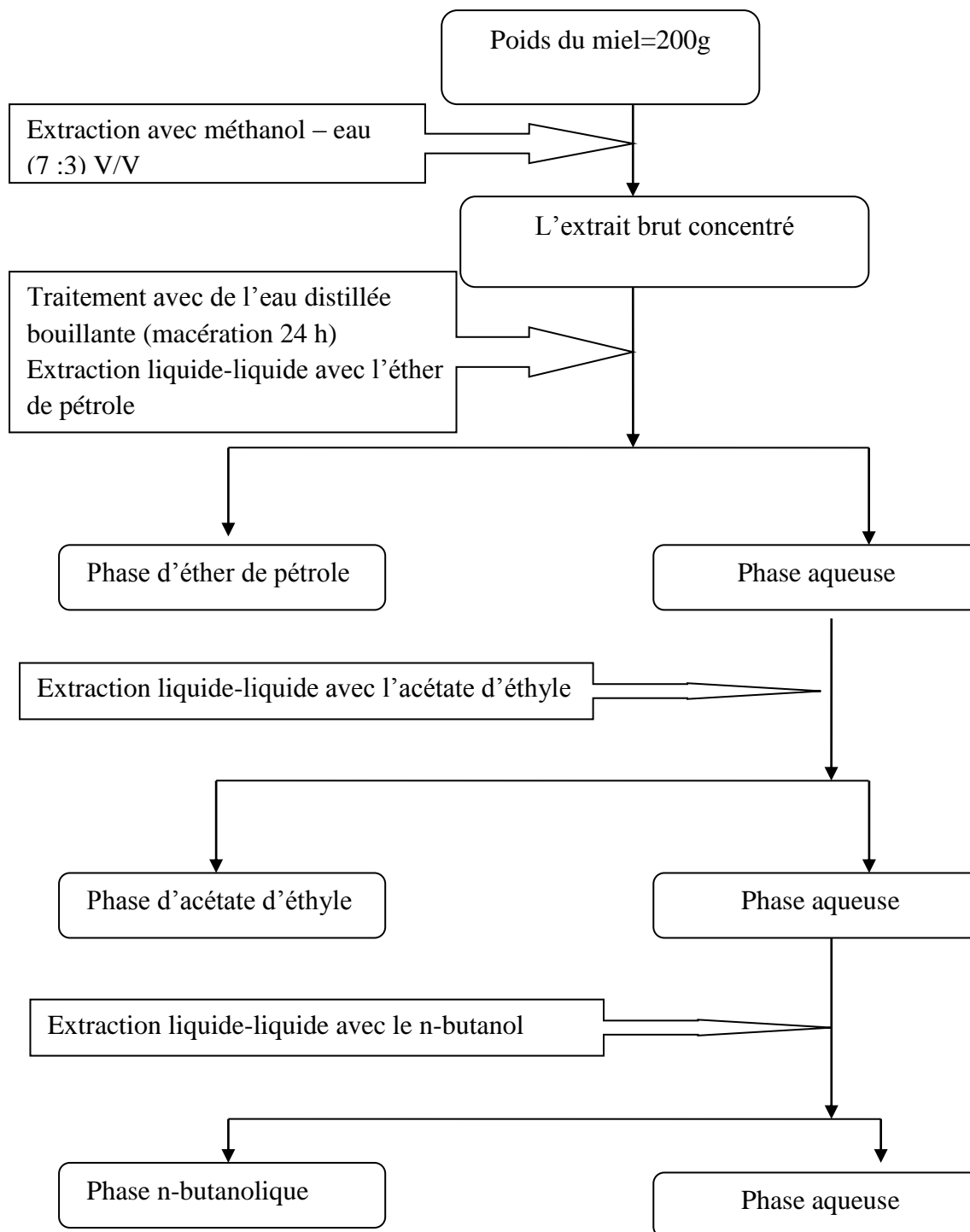
Le solvant est évaporé à la température 50°C. Une autre fraction d'extrait est préparée à part à partir de 200g du miel est considérée comme étant l'extrait méthanolique brut **EMB** qui est conservé à +5°C jusqu'à utilisation.

**4-2 / Fractionnement de l'extrait brut :**

L'extrait méthanolique brut est mélangé avec de l'eau distillée bouillante et laissé à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait brut est épuisé successivement par 3 solvants (l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le n- butanol). L'extrait brut est initialement mélangé avec l'éther de pétrole, le mélange est laissé décanter et la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant devienne transparent.

L'éther de pétrole est par la suite évaporé à 40°C et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction d'éther de pétrole **EEP**.

La phase aqueuse résiduelle est soumise à deux autres extractions liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et le n- butanol, en suivant les mêmes étapes que la première extraction afin d'obtenir les fractions acétate d'éthyle **EAE** (évaporé à 40°C) et n-butanolique **En-B**. (évaporé à 70°C ). Tous les extraits obtenus sont conservés à +5°C jusqu'à utilisation après le calcul de leur rendement.



**Figure 17** : Protocole de préparation des extraits de miel

### 5 / Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par (Wong *et al.*, 2006).

➤ **Principe :**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

Brièvement 200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

➤ **Expression des résultats :**

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

### 6 / Dosage des flavonoïdes :

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) citée par (Djeridane *et al.*, 2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

➤ **Principe :**

1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

➤ **Expression des résultats :**

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1.75-40 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

**7 / Analyse de la composition chimique des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince :**

➤ **Principe :**

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal-Rf-et coloration) susceptible d'orienter vers une hypothèse de structures.

➤ **Méthode**

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques gel de silice sur support rigide en aluminium 20 /20 cm.

Les extraits sont déposés à l'aide d'une micropipette (2µl) à des points repères à 1,5cm du bord inférieur de la plaque. En suite, les plaques sont placées dans les cuves de développement dans les quelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile à environ 1cm de l'hauteur. La migration est effectuée par l'utilisation des éluants suivants :

**EMB** : Butanol /Acide acétique/H<sub>2</sub>O (40 /10/50)

Acétone/ H<sub>2</sub>O (50 /50)

**ECP** : Chloroforme/Méthanol (96/4)

**EAE** : Toluène/Acétate d'éthyle / Méthanol (5/3/2)

**En-B** : Chloroforme/ Méthanol/Eau distillée (65 /35/10)

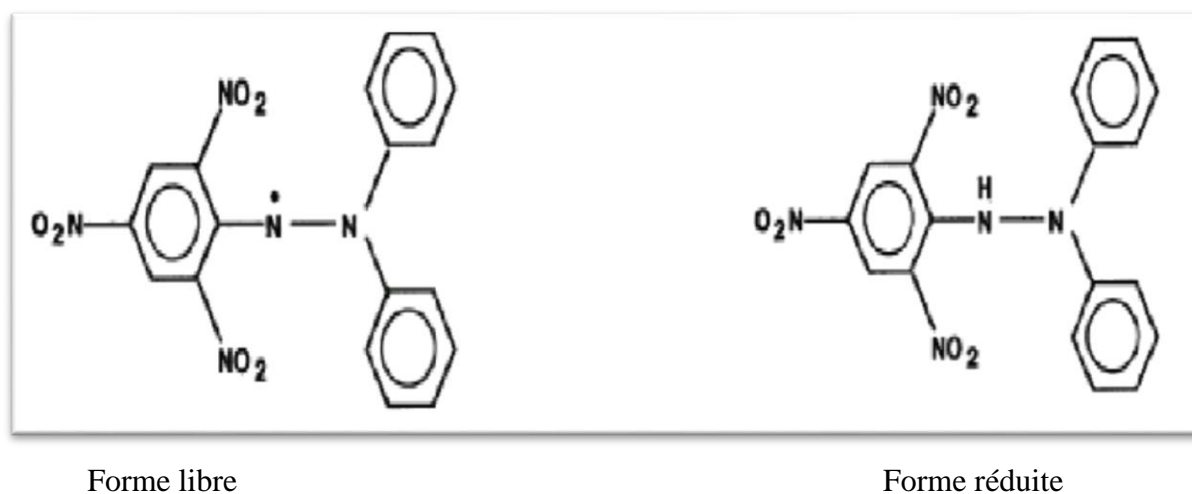
Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour le calcul du rapport frontal **R<sub>f</sub>** qui est égal à la distance parcourue par le soluté/la distance parcourue par le solvant.

### 8 / Etude de l'activité anti-oxydante par test au DPPH :

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par l'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Markowicz *et al.*, 2007).

#### ➤ Principe :

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Fig. 18) (Maataoui *et al.*, 2006).



**Figure 18 :** Forme libre et réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)

Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :



L'Activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

#### ➤ Méthode :

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM. Dans des tubes on introduit 2,5 ml de chaque extrait (1mg/ml dans le méthanol avec des dilutions convenables) et on ajoute 1ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 2.5 ml de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

➤ **L'expression des résultats :**

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

Les résultats sont exprimés en tant que l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%} = [(\text{Abs Control négatif} - \text{Abs Echantillon}) / \text{Abs Control négatif}] \times 100$$
  
(Wang *et al.*, 2002)

Où :

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif .

## **Conclusion et perspectives**

Ce travail de recherche réalisé, nous a permis d'étudier certains paramètres physico-chimiques et l'étude de l'activité antioxydante des différents extraits organiques d'une variété de miel cultivé à la région de Bouhmama (Khenchela). Cette analyse physico-chimique a apporté des résultats très intéressants et exploitables dans le domaine agro-alimentaire et la santé.

L'analyse des paramètres physico-chimiques est un bon critère de qualité du miel, souvent utilisé dans la routine de contrôle, Elles dépendent de divers facteurs tels que la saison de récolte, le degré de maturité atteint dans la ruche, les facteurs climatiques, l'origine botanique et l'espèce d'abeille. Ainsi, notre échantillon du miel étudié a été comparé aux normes internationales. L'étude physico-chimique a montré que la variété de Bouhmama est un miel du pH faible à nectar, polyfloral et riche en fructose.

Parallèlement, l'étude phytochimique a dévoilé que cette espèce est très riche en saponosides, en tanins et en flavonoïdes et la CCM analytique effectuée confirme surtout une abondance en flavones et flavonols. Les résultats obtenus peuvent être, ardemment, attribués à un des composés ou une conjugaison de substances.

Nos résultats montrent que les extraits méthanolique et n-butanolique et acétate d'éthyle présentent une richesse en polyphénols totaux et flavonoïdes.

L'activité anti oxydante du miel naturel dépend largement de leur composition chimique, l'étude du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes, caractérisant nos extraits du miel, à piéger les radicaux libres.

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- Analyse pollinique de notre échantillon.
- Appréciation d'autres activités biologiques de ce miel et faire une comparaison avec d'autres variétés.

## 1 / Analyses physico-chimiques

### 1-1/ Le pH :

Le pH est un critère de qualité et qui figure dans les normes internationales. La valeur de pH obtenus est 4.2. Cette résultat confirme le caractère acide de miel (Nanda *et al.*, 2003). Les miels de nectar ont un pH faible ( Vanhanen *et al.*, 2011) . Donc le miel étudié peut être d'origine de nectar. Ibrahim *et al.*, (2012), indiquent que le miel est naturellement acide indépendamment de son origine géographique, qui peut être due à la présence d'acides organiques qui contribuent à sa saveur et sa stabilité contre la détérioration microbienne. Le pH des échantillons du miel est important au cours du processus d'extraction, car elle affecte la texture, la stabilité et la durée de vie. Le pH du miel est suffisamment bas pour ralentir ou empêcher la croissance de nombreuses espèces de bactéries (Malika *et al.*, 2005).

### 1-2 / La conductivité électrique :

La conductivité électrique permet de distinguer facilement les miels de miellats des miels de nectar, d'après dawney *et al* (2005), les miels des miellats possèdent une conductivité électrique beaucoup plus élevée que les miels de fleurs, la valeur obtenue est 0.31 ms/cm Toutes fois les valeurs obtenues cadrent les normes internationales et qui sont  $\leq 0.8$ ms/cm pour les miel de nectar et  $\geq 0.8$  ms/cm pour le miel de miellat. ( Bogdanov ,1999)

Zerrouk *et al* (2011) signalent que la conductivité électrique du miel est étroitement liée à la concentration des sels minéraux, d'acides organiques et de protéines, elle est considérée comme étant un paramètre de grande variabilité selon l'origine florale et l'un des meilleurs paramètres de différenciation entre miels à fleurs et miellats. Malika *et al* (2005), montrent que la conductivité est un bon critère de qualité lié à l'origine botanique du miel et très souvent utilisé dans la routine de contrôle. Il est facile à évaluer la teneur en cendre, cette dernière étant plus longue, coûteuse et comporte des erreurs plus élevées. La teneur en cendre représente une mesure directe de résidu inorganique après carbonisation du miel, tandis que la conductivité électrique mesure toutes substances organiques et inorganiques.

### 1-3 / Teneur en eau et l'indice de réfraction :

Le contenu en eau est un paramètre lié au degré de maturité (Ouchemoukh *et al.*,2007 ; Chefrour *et al.*, 2009),au mode d'extraction et à la densité de miel. En outre, le contenu en eau est affecté par le climat, la saison et la teneur en eau initiale du nectar de la plante (Ozcan *et al.*,2006).Il est 13.8 % à une indice de réfraction de 1,5023.Cette valeur est inférieures au limite de 20% autorisée par le *codex alimentarius* (2001) et le Journal Officiel de l'Union Européenne (2002). Ce miel est polyfloral et provient de la région de Bouhmama qui est caractérisé par un climat chaud et sec. Ce là confirme que le risque de fermentation est très faible dans cet échantillon.

### 1-4 / Teneur en sucres:

Les sucres représentent environ 80 % de la masse des miels, ce sont le glucose et le fructose (sucres réducteurs) qui dominant nettement et font à eux seuls près de 70%. (Irland,2010) Les résultats de la détermination de la teneur en sucres réducteurs et en saccharose apparent sont consignés dans le tableau suivant :

**Tableau 05** : Le taux de sucres dans le miel

Nom de sucre	Teneur en sucre (%)
Saccharose	7%
Glucose	82.9%
Fructose	84.7%

D'après ces résultats, les teneurs en sucres réducteurs de miel sont toutes supérieures à 60 % en ce qui concerne la teneur en saccharose, la valeur est supérieure à 5%.

Les sucres des miels sont responsables de sa viscosité, de son hygroscopicité et de sa cristallisation .La répartition entre les différents sucres va donner de précieux renseignements qui permettront de prévoir la vitesse de cristallisation et la stabilité de la structure d'un miel (Pourtallier *et al.*,1970). Elle donnera également des informations sur l'origine du miel. Le miel de miellat est moins riche en monosaccharides que le miel de nectar mais sa teneur en di- et trisaccharides est plus élevée (Medai *et al.*, 2005).Le miel est hygroscopique a la capacité d'absorber l'humidité de l'air lorsqu'elle est supérieure à 55 %.Le fructose est largement responsable de l'hygroscopicité du miel. Le glucose, quant à lui, est le principal responsable de la cristallisation (Manikis *et al.*,2001).

**1-5 / Teneur en cendre :**

Le pourcentage de la teneur en cendres est un indicateur de la teneur en matière minérale globale du miel (Saxena *et al.*,2010). La teneur en cendre de miel étudié est égal à: 0.5.Cette valeur indique que cette miel d'origine florale car selon le *Codex Alimentarius*, qui établit un contenu minéral de miel de fleurs est inférieur ou égal à 0.6% et inférieur de 1% pour miel de miellat ou mélange avec miel de fleur. D'après (Fuenmayor *et al.*,2012), la cendre du miel dépend fortement de l'origine botanique et l'espèce d'abeille.

**1-6 / Teneur en HMF (Hydroxyméthylfurfural )**

La mesure de la teneur en HMF est très importante pour connaître la qualité de nos variétés de miel étudiées et ce critère est retenu par *Codex Alimentarius*, l'HMF du miel s'exprime en mg /kg ,la limite légale est actuellement 40 mg /kg max, un miel de bonne qualité ne devrait pas avoir un taux supérieur à 25 mg /kg (Downey *et al.*,2005 ; Zappala *et al.*,2005).Le résultat obtenue est 34.8mg/kg.

Le vieillissement à des conséquences sur l'arôme, le goût, la couleur devient de plus en plus foncée, des modifications chimiques interviennent. La plus connue est l'apparition d'HMF ou hydroxyméthylfurfural (Kubis ,1998 ; Maria *et al.*, 2003) qui est un aldéhyde cyclique (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) issu de la dégradation des sucres, en premier lieu par déshydrogénation du fructose et du glucose en milieu acide et à la température élevée (Badui, 1986 ; Espinoza *et al.*, 1993)

**1- 7 / Pouvoir rotatoire :**

Le miel de fleur est lévogyres contrairement au miel de miellat et au miel fraudé, qui sont normalement dextrogyres. C'est une conséquence de prépondérance normale de fructose dans le miel floral, qui montre une rotation spécifique négative au-dessus de glucose (Nada *et al.*,2003). Le miel étudié présente la valeur suivant:-6.00 indique que cette échantillon est un miel de fleur riche en fructose.

## 2/ Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur les extraits de miel révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le tableau suivante :

**Tableau 6:** Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique brute de miel.

Les composés	les extraits de miel
Les saponosides	+ La formation d'une mousse persistante après 15 min
Les flavonoïdes	+ Apparition d'une couleur rose orangé
Les tanins	+ Apparition d'une coloration verte et un précipité après 3min
Les cardénolides	-

Les résultats sont interprétés comme suit : (+) Réaction positive, (-) Réaction négative. L'étude phytochimique d'EMB a montré que; cette miel contient, des saponosides, des flavonoïdes, des tanins,. Ce qui confirme les travaux de (Belkassam A *et al.*,2011) qui a été révélé la présence des flavonoïdes, saponosides, tanins dans le miel. La richesse de miel en composés chimiques actifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies telles que la fièvre et contre les vers intestinaux.

## 3/ Le rendement des extraits

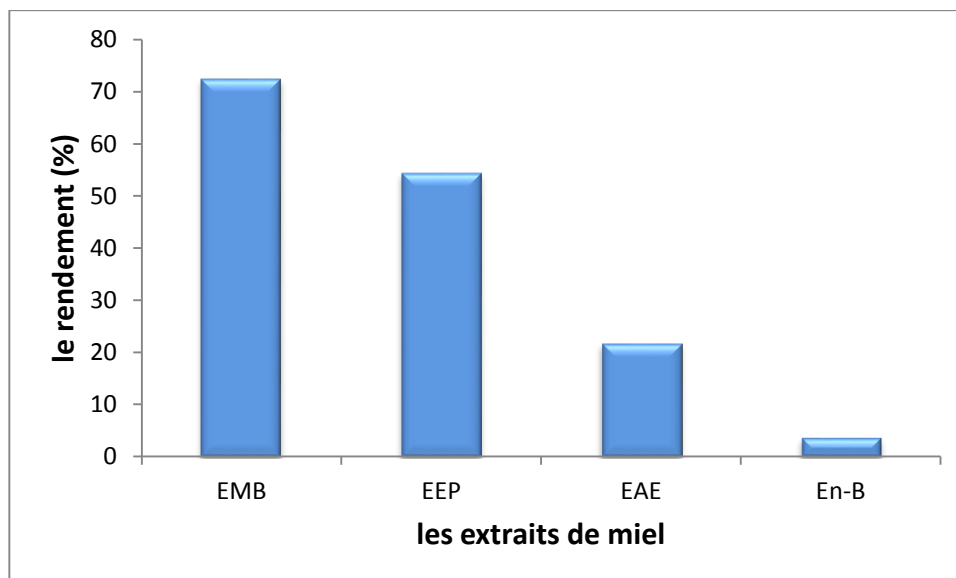
Les rendements des extraits sont calculés par rapport au poids total du miel dont les résultats sont illustrés dans le tableau suivante:

**Tableau 7** : Le rendement des différents extraits: méthanol, l'éther de pétrole, acétate d'éthyle, et n-butanol

Les extraits	Le poids du miel en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)	Couleur et aspect
<b>EMB</b>	200	145	72,5	Marron visqueux
<b>EEP</b>	200	109	54,5	Marron liquide
<b>EAE</b>		43,83	21,91	Transparent liquide
<b>En-B</b>		7.5	3,75	Jaune liquide

Les résultats obtenus pour les extraits de miel, montrent que le rendement le plus élevé a été obtenu dans l'extrait méthanolique brut (72,5%) suivi de l'extrait d'éther de pétrole (54,5%), Puis l'extrait d'acétate d'éthyle (21,91) et en fin l'extrait de n-butanol avec (3,75%) qui est le plus faible, Selon Newman *et al.*, (1974); Markham (1982) les flavonoïdes que pourraient contenir les différentes fractions issue de l'extrait méthanolique seraient comme suit : l'extrait n-butanolique est plus riche en flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tétra glycosylés), l'extrait éther de pétrole qui est en générale constitué de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés et l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes aglycones et flavonoïdes glycosylés en particulier monoglycosylés.

Car la macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (Yrjonen, 2004), il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

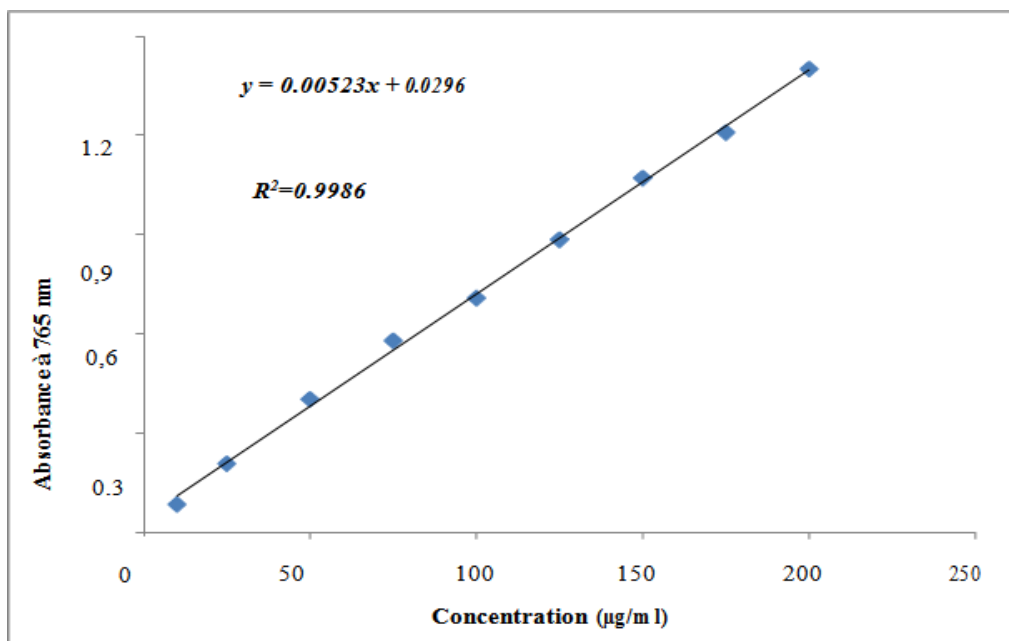


**Figure 19:** Comparaison de rendement des quatre extraits de miel

#### 4/ Teneur en polyphénols

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. Les mélanges aqueux de méthanol, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol sont généralement utilisés pour l'extraction (Turkmen *et al.*, 2007). La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé. Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (Falleh *et al.*, 2008) dont le méthanol aqueux 70% est deux fois plus efficace que le méthanol pur pour l'extraction des composés phénoliques (Vuorela, 2005). La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (Blasa *et al.*, 2007).

L'acide gallique est le standard (Fig.20) le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisuthisakul *et al.*, 2008).



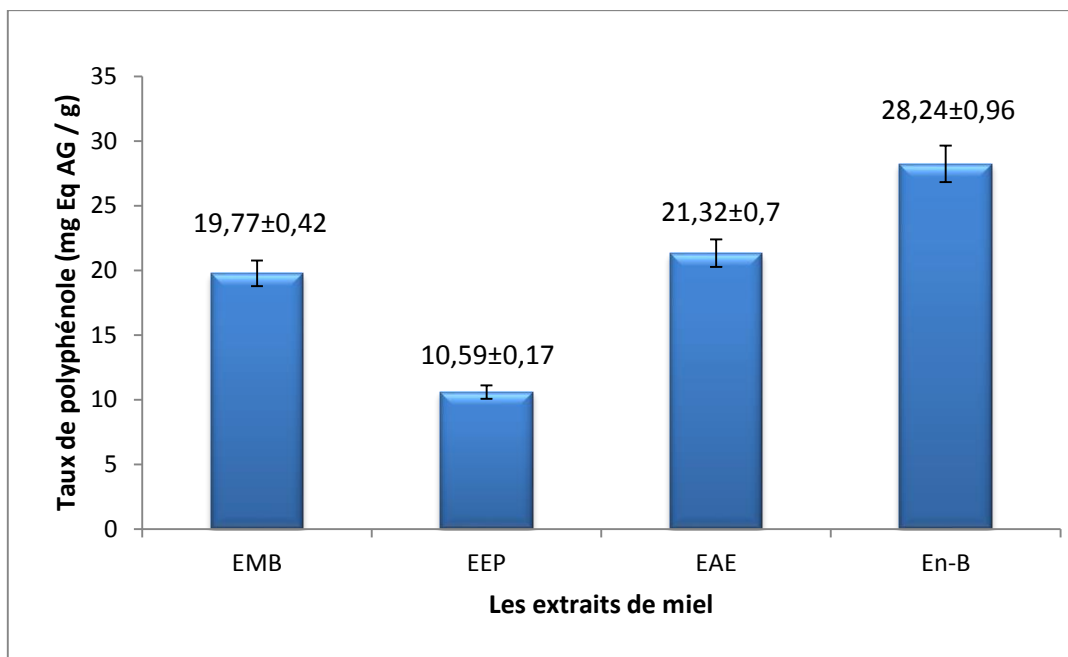
**Figure 20 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

**Tableau 8 :** Teneur en polyphénols des extraits organiques du miel

<i>Extrait</i>	<i>Teneur en polyphénols <sup>(a)</sup></i>
<b>EMB</b>	19,77 $\pm$ 0,42
<b>EEP</b>	10,59 $\pm$ 0,17
<b>EAE</b>	21,32 $\pm$ 0,70
<b>En-B</b>	28,24 $\pm$ 0,96

(a) mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures



**Figure 21** : Teneur en polyphénols totaux des quatre extraits de miel

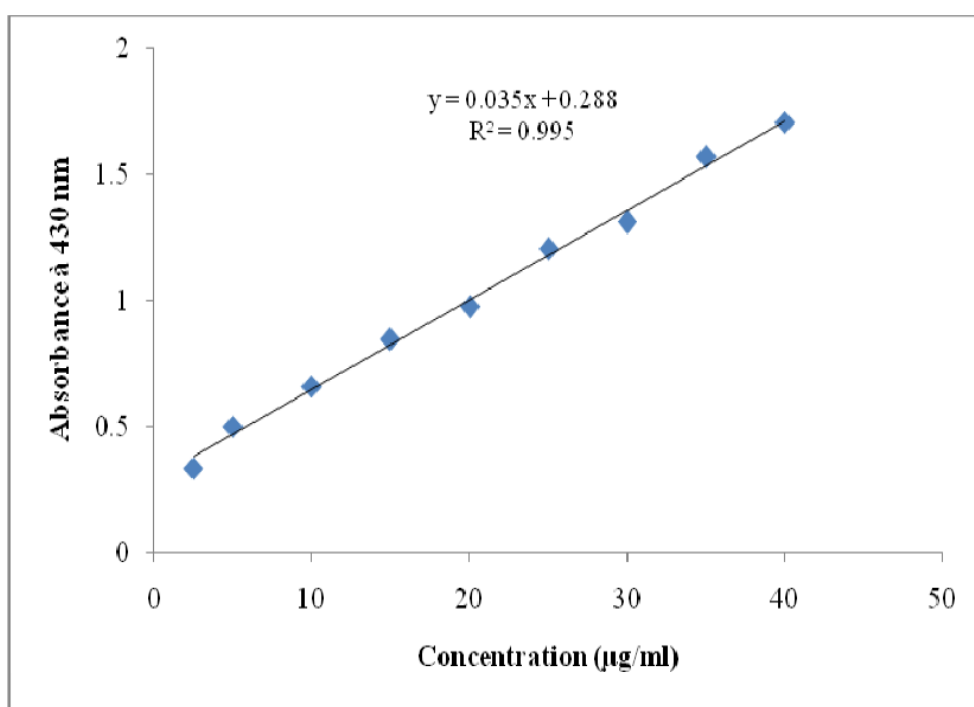
Nos résultats montrent que l'extrait n-butanolique est le plus riche en polyphénols totaux avec 28,24 mg EqAG/g suivis par l'extrait d'acétate d'éthyle(21,32), l'extrait méthanolique à (19,77) et enfin l'extrait éther de pétrole présente la teneur la plus faible avec 10,59 mg EqAG/g d'extrait.

L'activité anti oxydante du miel naturel dépend largement de leur composition chimique, tels que les composés phénoliques, flavonoïdes, enzymes, acides organiques, acides aminés, l'acide ascorbique, caroténoïdes, et leurs origines. Ainsi, les composés phénoliques ou polyphénols sont l'une des plus importantes classes de composés trouvés dans le miel. (Ibrahim *et al.*, 2012).

## 5 / Dosage des flavonoïdes

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez *et al.*, 2006) .Selon Djeridane *et al.*, (2006) l'éther de pétrole est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O- glycosides et partiellement di-O- glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides C-glycosides.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' $\text{AlCl}_3$ , en utilisant comme standard la quercétine (Fig.22) les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EQ/g.



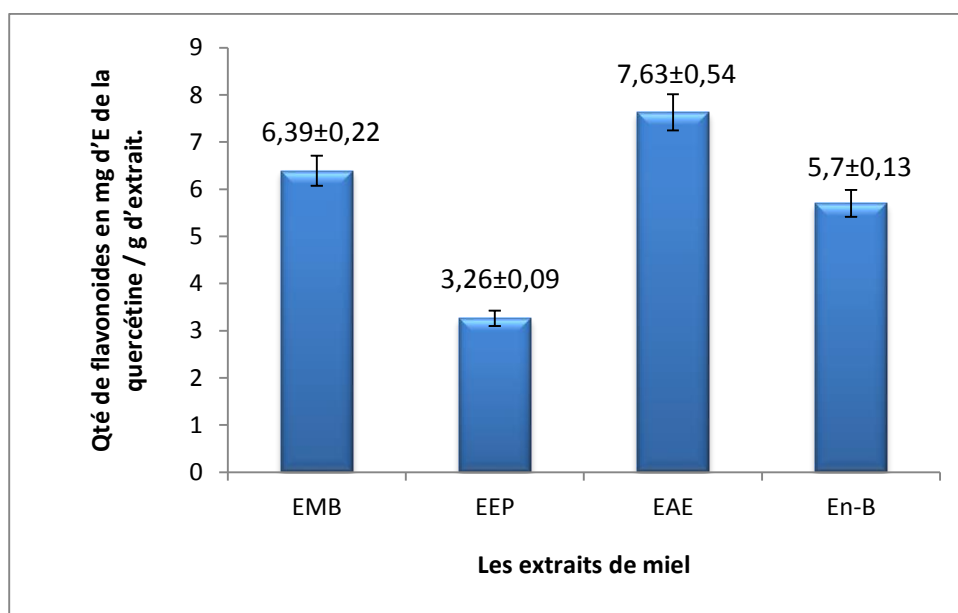
**Figure 22** : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  SD de trois mesures).

**Tableau 9** : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de miel

Extrait	Teneur en flavonoïde <sup>(b)</sup>
<b>EMB</b>	6,39±0,22
<b>EEP</b>	3,26±0,09
<b>EAE</b>	7,63±0,54
<b>En-B</b>	5,7±0,13

(b) mg d'équivalent de la quercétine par gramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD

**Figure 23** : Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE) dans les extraits de miel

Nos résultats montrent que la teneur totale des flavonoïdes des extraits n'est pas vraiment liée à la teneur des composés phénoliques totaux.

Les flavonoïdes sont reconnus par leurs hautes activités pharmacologiques comme piègeurs des radicaux.

L'intérêt récent pour ces substances a été stimulé par les avantages potentiels pour la santé découlant de leurs activités antioxydantes et antiradicalaires contre les maladies coronariennes et le cancer (Saba *et al.*, 2011). Le miel de la région de Bouhmama est caractérisé par un taux élevé en composés phénoliques, ce qui explique leur capacité antioxydante. Il existe une relation étroite entre la concentration en composés phénolique du miel et origine des espèces végétales visitées par l'abeille.

## 6/ Chromatographie analytique sur couche mince

Pour avoir les empreintes flavonoïques de nos extraits et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant quatre systèmes de solvants moyennement polaires. Sous lumière UV à 365 nm les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Le Rf des spots observés sous UV suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des flavonoides surtout des flavones et des flavonols.

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

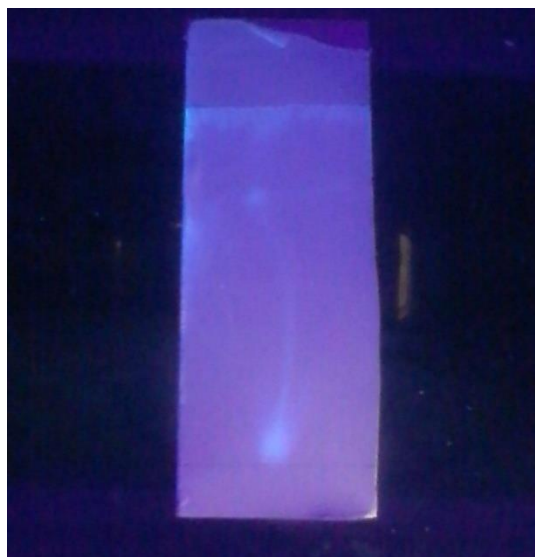
Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25), alors que les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5).

Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) (Bandyukova et Shinkarenko, 1973).

### 6-1/ Résultat de la CCM d'extrait méthanolique brut :

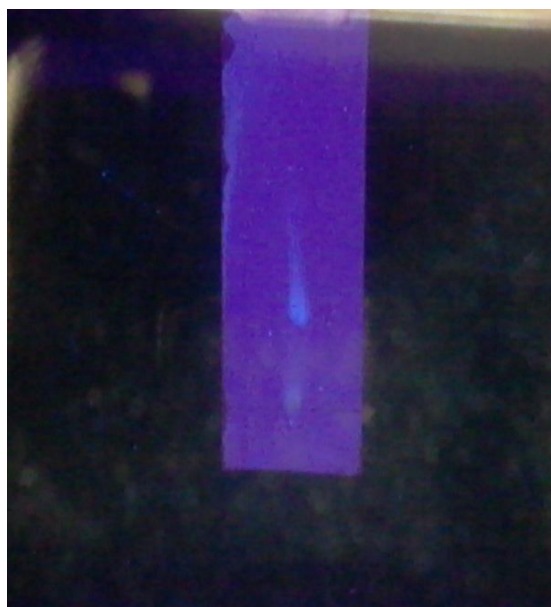


**Figure 24:** Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par chromatographie sur gel de silice par le système solvant :Acétone/H<sub>2</sub>O (50/50) (révélation à l'UV),  $\lambda = 365$  nm



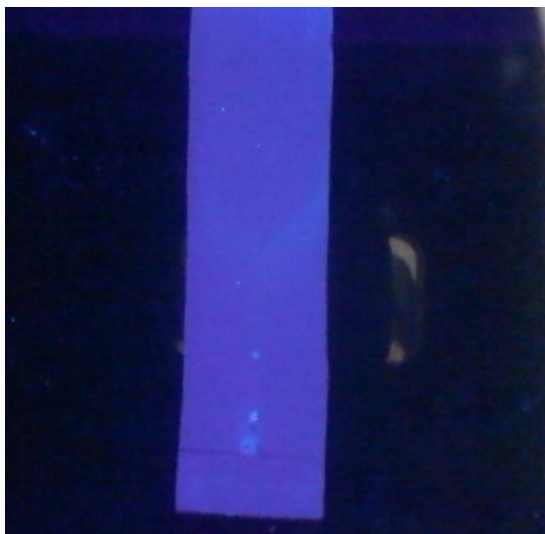
**Figure 25 :** Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait méthanolique par chromatographie sur gel de silice par le système solvant :Butanol/Acide acétique /H<sub>2</sub>O (40/10/50) (révélation à l'UV),  $\lambda = 365 \text{ nm}$

**6-2 / Résultat de la CCM d'extrait d'éther de pétrole :**



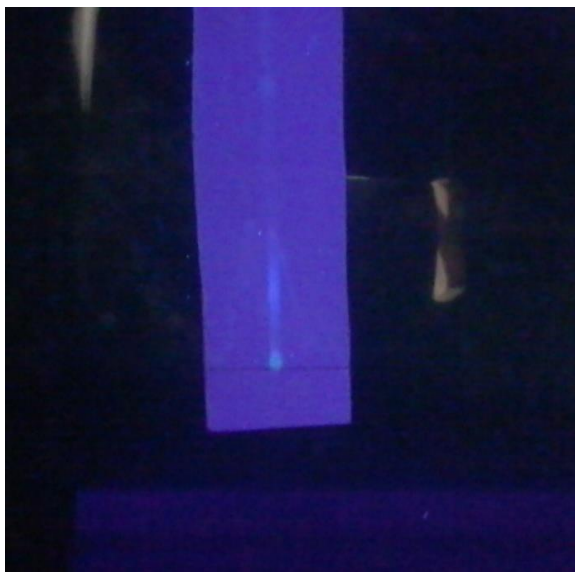
**Figure 26 :** Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait d'éther de pétrole par chromatographie sur gel de silice par Le système solvant : Chloroforme/Méthanol (96/4) (révélation à l'UV),  $\lambda = 365 \text{ nm}$

**6-3 / Résultat de la CCM d'extrait d'acétate d'éthyle :**



**Figure 27:** Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait d'acétate d'éthyle par chromatographie sur gel de silice par système solvant : Toluène/Acétate d'éthyle/Méthanol (5/3/2) (révélation à l'UV),  $\lambda = 365$  nm

**6-4 / Résultat de la CCM d'extrait de n-butanol :**



**Figure 28 :** Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait de n-butanol par chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Chloroforme/Méthanol/Eau distillée (65/35/10) (révélation à l'UV),  $\lambda = 365$  nm

**Tableau 10** : Résultat de la CCM de la fraction des extraits de miel

Les extraits	Rf (cm)	Type flavonoïde possible
<b>EMB (1)</b>	<b>0,19</b>	Flavonols, isoflavones, flavanones
	<b>0,28</b>	Flavones
	<b>0,38</b>	Flavonols
<b>EMB (2)</b>	<b>0,76</b>	flavanones, flavonols,
<b>EEP</b>	<b>0,25</b>	Flavones
<b>EAE</b>	<b>0,045</b>	Flavones
	<b>0,22</b>	Flavones
<b>En-B</b>	<b>0,29</b>	Flavones
	<b>0,58</b>	Anthocyanidine 3-glycosides

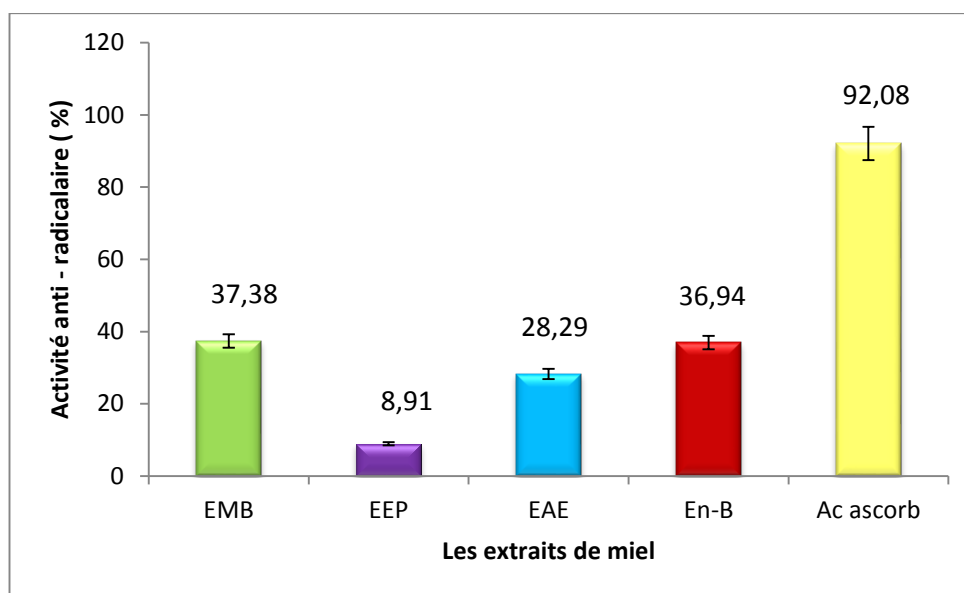
### 7 / Activité anti-oxydante :

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008) avec une bande maximum d'absorption entre 515-528 nm. Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (Curtay et Robin, 2000).

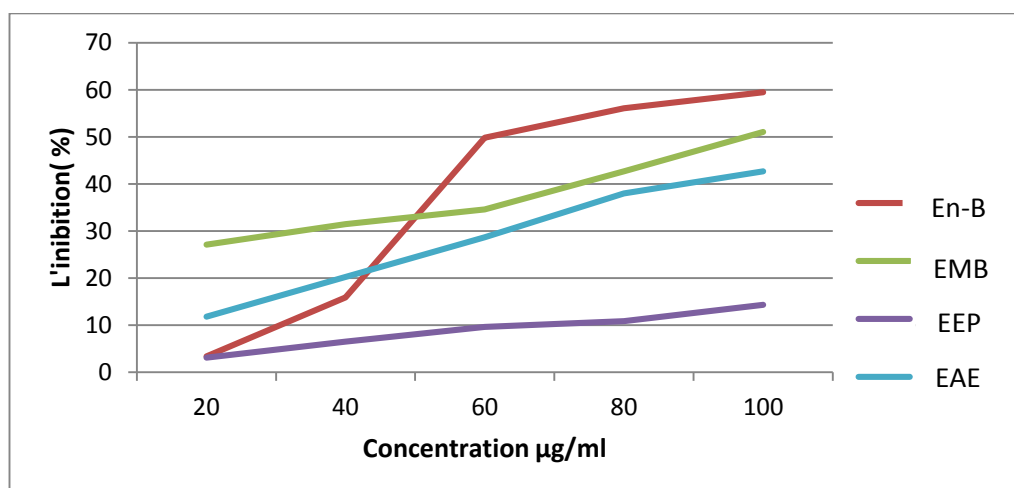
Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés (Ozturk *et al.*, 2007).

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits organiques du miel sont déterminés à l'aide de test de DPPH sont représentés dans la (Fig. 29) en comparaison avec l'acide ascorbique comme étant un antioxydant de référence.

Les valeurs de pourcentage d'inhibition des échantillons du miel étudiés révèlent que tous les extraits testés sont pourvus d'un potentiel antioxydant surtout l'extrait méthanolique avec une inhibition 37.38%, suivis par l'extrait n-butanolique avec 36.94% qui présente la teneur la plus élevée en polyphénols. Cette activité antiradicalaire est dose-dépendante (Fig. 30)



**Figure 29 :** Activité antioxydante exprimée en pourcentage d'inhibition des extraits du miel et l'acide ascorbique



**Figure 30 :** Changement de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration

Les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique. D'un autre côté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (Falleh *et al.*, 2008).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ababsa Z-A.( 2012).** Etude d'activités biologiques des deux espèces :Ammoides atlantica et Ranunculus bulbosus, Mémoire de Magister En Biochimie appliquée Université Hadj Lakhder-Batna, pp.01-45.
- **Acquarone C, Buera P ,Elizalde B. (2006).**Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys original. Food Chemistry,Volume 101,Issue 2, pp.695-703
- **Ahmet I ; Anis I ; Malik A ; Nawaz S-A ; Choudhary M.I.(2003).** Cholinesterase inhibitory constituents from Onosma hispidum. *Chem. Pharmaceut. Bull.* 51 (4), pp.412–414.
- **Allen R-G. and Tresini M.(2000).**Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic.Biol.Med* 28, pp.463-499.
- Amrani R.(2012).**étude comparative des composés phénoliques et étude du pouvoir antioxydant de quelques variétés de dattes d'Algérie, master académique, université de Ouargla,pp.110-111.
- **Antwerpen P-V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système Myéloperoxydase/ Peroxyde d'hydrogène/Chlorure. Thèse de doctorat. Université libre de Bruxelles, pp.3-5.
- **Athamena S .( 2009).** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de cuminum cyminum et les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'évaluation, Mémoires de magister en biochimie appliquées. Université Hadj Lakhder- Batna, pp.17-39.
- Attipou k ; Ankoum T ; Ayite A. and Missouhou k.(1998).**Traitement des plaies au miel.Experience de CHU de Lomé.Médecine d'Afrique Noire, pp.45-47.
- Badui D-S ; (1986 )** Química de los alimentos. Ed. Alhambra, pp.55-57
- Balaban R-S ; Nemoto S and Funkel T.(2005)** .Mitochondria, oxidants and aging cell 120,pp.483-495
- Barlow S-M. (1990).** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F,Food antioxidants.pp.253-307
- Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems.Comments on Toxicology, pp.9-21.

- Bertoncelj J ;Dobersek U ;Jamnik M.and Golob T .(2007).**Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey .*Food Chemistry*,105 :822-828
- Bruneau E.(2004).** Les produits de la ruche .Ed: RUSTICA , pp.354-384
- Beaudeau j-l ; Delattre j ; Therond p ; Bonnefont-Rousselot d ; Berger m.(2006).**Manipulation nutritionnelles du stress oxydant : état de connaissances
- Blasa M ;Candiracci M ;Accorsi A ;Piacenti M-P.and Piatti E.(2007).**Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells.*Food Chemistry*,104,pp.1635-1640.
- Bogdanov S ;JurendicT ;Sieber R ;Gallmann P (2006).**Honey for nutrition and health :A review.*Am.J.Coll.Nutr ;27* ,pp.677-689.
- Bogdanov S ; Bieri K ; Gremand G ; Kanzig A ;Seiler K ;Zurcher K.(2005).** Suisse food Manual: pollen Bienenprodukte, BAG( Swiss Federal office for public health);Bern, pp.40-45.
- Bouakaz I.(2006).** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.pp.100-1107.
- Boudet A-M. (2000)** .L'usine chimique. 9<sup>ème</sup> conférence de l'université de tous les savoirs. France. pp.116-120..
- Boveris A ;Oshino N et Chance B.(1972).** the cellular production of hydrogen peroxyde *Biochem J* .pp.128-617.
- Boyd B ; Ford C ; Koepke M-C ;Gary K ;Horn E ; McAnalley S. et McAnalley B.(2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*. 4(6),pp.17-20.
- Brown J-E; Khodr H; Hider R-C. et Rice E-C.(1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J*. 330, pp.1173-1178.
- Bruneton J. (2004).** Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3<sup>e</sup> Ed Techniques et documentations. Paris. pp: 227-250.
- Candiracci M ;Citterio B ;Piatti E.(2012).**Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans* *Food Chemistry*.131. pp.493-499.
- Celiktas O-Y; Hames K-E;Bedir E; Vardar Sukan F; Ozek T; Baser K-H.(2007).**Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 100,pp.553-559.

- Codex alimentarius commission. (2001).**Codex standard 12,Revised codex Standard.pp.50-55.
- Cotelle N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress.*Curr.Top. Med. Chem.* pp.569-590.
- Cowan M. (1999)** .Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* ; 12 (4),pp. 564-570.
- Curtay J-P;Robin J-M.(2000).**intéret des complexes antioxydants centre d'étude et développement de la nutrithérapie.pp.60-63.
- Dacosta, E ;Oliveira A-B ; Lapa A-J.(2003).**Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994 46(2).pp.118-22.
- Delphine I.(2010).** Le miel et ses propriétés thérapeutiques.pp.4-7.
- Deschamps C. (1998)** .Production et commercialisation du miel. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse, pp.118-122.
- Diplok A-T. (1991).** Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr.*53(suppl): 189.pp.150-155.
- Djeridane A;Yous M;Nadjemi B; Boutassouna D; Stocker P; Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97,pp.654-660.
- Donadieu Y.(2003).**Qu'est que le miel.Chapitre E.Faculté de médecine de puis.pp.7-10 .
- Downey G ;Hussey K ;Kelly J-D ;Walshe T-F.and Martin P-G.(2005).**Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food chemistry*, 91,pp.347-354.
- Edenharder R ; Grünhage, D. (2003).** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* pp.540-550.
- Emmanuelle H; Julie C ; et Laurent G.(1996).** Les Constituants Chimiques du Miel. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. APISERVICES, Galerie Virtuelle apicole.pp.130-140.
- Espinoza M-A ; Muñoz de la Peña ; Salinas F ;Semiautomatic.(1993).** determination of furanic aldehydes in food and pharmaceutical samples by a stopped-flow injection analysis method. *J. of the AOAC International.* pp.115-120.

- Falleh H ; Ksouri R ; Chaieb K ;Karray B-N ; Trabelsi N ; Boulaaba M ; Abdelly C. (2008)** .Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* 331, pp.372-379.
- FAO ,1996**, Value-added products from beekeeping, Rome, pp.394-400.
- Favier A. (1997)**. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin.* Vol. 55, pp.9-16.
- Fuenmayor C-A ; Zuluaga D- C ;Diaz M- A. and Quicazan M-C. ( 2012)** - 'MIEL DE ANGELITA': Nutritional Composition and Physicochemical Properties of *Tetragonisca angustula* HONEY. *FEB*, Vol. 37, N°. 2, pp.142-147
- Fuhrman B ; Lavy A ; and Aviram M. (1995)**. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, pp.549-554.
- Galati E-M ; Monforte M-T ; Kirjavainen S ; Forestieri A-M ; Trovato A.(1994)**. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmacologia*. 40(11), pp.709-12.
- Ghedira K. (2005)**. Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and Therapeutic uses. *phytothérapie*, 3(4), pp.162-169.
- Gloria.(2004)**. Composition, thermal and rheological behaviour of selected Greek honeys *Journal of Food Engineering*. Volume 64 , Issue 1, pp.9-21.
- Goldstein S ; and Czapski G. (1995)** .The reaction of NO. with O<sub>2</sub>.- and HO<sub>2</sub>: a pulse radiolysis study .*Free Radic. Biol.Med* 19, pp.505-510.
- Gomez C-M; Gomez R -M; Arraez R- D; Segura C- A; Fernandez G-A. (2006)** .Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 41, pp.1220-1234.
- González-Gallego J; Sánchez-Campos S; Tuñón M-J.(2007)**. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria* 22(3), pp.287-293.
- Graefe E-U, Derendorf H and Veit M. (1999)**. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37, pp.219-233.
- Guerzou N ;Nadji N.( 2002)**. Etude comparative entre quelques miels locaux et autres importés. Ingénieur d'état en Agronomie. Université Ziane Achour de Djelfa-Algérie. Mémoire online.

- Halliwell B. (1994).** Free radicals and antioxidants. *Nutr.Rev.* 52, pp.253-265.
- Havsteen B-H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* pp.96-100.
- Heim E.K; Tagliaferro A-R; Bobilya D-J.(2002).** Flavonoid antioxidants : chemistry ,metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 13,pp. 572-584.
- Hodek P ; Trefil P ;Stiborova M. (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.* 139,pp.1- 21.
- Houbibi H.(2012) .**Analyse Multicritères des composantes du Milieu à l'aide des techniques de la géomatique pour un aménagement intégré de la vallée d'Oued Mellagou- BouhmamaW. Kenchela.51,pp.61-69.
- Hourigan R.(2010) .**cellular energy Metabolism and oxidative stress .Text book of Aging Skin Springer –Verlag Berlin Heidelberg ,30,pp.313-320.
- Huchet E,coustel J et Guinat L. (1996).**Les constituants chimiques du miel,école nationale supérieure des industries Agricoles et Alimentaire,1 ,Avenue des olympiades 91744 Massy cedex .pp.3-5.
- Ibrahim K-M ; Moniruzzaman M ; Boukraa L ; Benhanifia M ; Asiful I-M; Nazmul I-M ; Sulaiman S-A. and HUA GAN S.(2012).**Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. *Journal molecules.* 17, pp.110-120.
- Jacques B ;and André R. (2004).** Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp. 217-223
- Jovanovic S-V ;Steenken S ; Tosic M ;Marjanovic B ;and Simic M.G. (1994).** Flavonoids asantioxidants.*J. Am. Chem. Soc.*116,pp.146-151.
- Karaali A ; Boyacioalu D ; Günez G et Özçelik B . (2004).** Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commision’s the 6 framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey,pp.90-99.
- Kaskonienè V ;Venskutonis P-R ;Ceksteryté V.(2010).**Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania *LWT –Food Science and Technology* ,Volume 43,Issue 5,June 2010, pp.801-807.

- Kohen R ;Nyska A. (2002).** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30,pp. 120-150.
- Kubis I ; Ingr I.(1998)** .Effects inducing changes in hydroxymethylfurfural content in honey . *Czech-Journal-of-Animal- Science*. 43 (8),pp .379-383.
- Lachman J ;Kolihoiva D ;Miholova D ;Kosata J ;Titera D.and Kult K.,2007.**Analysis of minority honey components:Possible use for the evaluation of honey quality.*Food chemistry*,101,pp.973-979.
- Lahouel M ;Boulkour S ;Segueni N ;Fillastre J.P.(2004)**The flavonoids effect against vinblastine,cyclophosphamide and par acetamol toxicity by inhibition of lipide - peroxydation and increasing liver glutathion econcent ration.*Pathologie Biologie*.52,pp.314- 322.
- Lazaridou A ;Biliaderis C-G ;Bacandritsos N;Sabatini A ;Legrand P -J.(2003).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse*.pp.520-521.
- Lhuillier A. (2007)** .Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : libres. *Réanimation*.2008; (17)4 ,pp.387-392.
- Lisu. W; Jui H-Y; Hsiao L-L; Ming J-W. (2003).** Antioxydant effect ofmethanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, 11 (1),pp.60-61
- Lobreau C-D ;Marimion V.and Clément M-C (1999).**Les miels. In «Techniques de l'ingénieur » ,pp1-20.
- Lopes L-D; S. Alviano D; Alviano C-P. (2008).**Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils *Phytochemistry*. 69, pp.132-138.
- Louveaux L.(1985).**Les abeilles et leur élevage.Opiada .pp. 125-207
- Maataoui B-S;Hmyene A; Hilali S. (2006).** Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. 7, pp.3-8.
- Maisuthisakul P ;Pasuk S ; Ritthiruangdej P. (2008)** .Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. 21,pp.229-240.

- Malešev D ; Kuntic V. (2007)** .Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society* 72 (10),pp.921-939.
- Malika N ;Faid M. and EL Adlouni C . (2005 )** .Microbiological and Physico-Chemical Properties of Moroccan Honey. *International Journal Of Agriculture &Biology*.Vol. 7, No.5, 773R776 .pp.33-34.
- Manikis I et. Thrasyvoulou A. (2001)**. La relation entre les caractéristiques physiques et chimiques des miels et leurs paramètres de cristallisation. *Apiacta* . 36 (2),pp.106 – 112.
- Marchenay P ; Berard L .(2007)**. L’homme, l’abeille et le miel. Editions De Borée, Romagnant,pp. 224-230.
- Marfak A.(2003)**. Radiolyse Gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools: formation des depsides, Thèse pour obtenir le grade de docteur de l’université de limoges.p330-333.
- Marfak A. (2003)**. Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools.pp.6-10.
- Mari L ;Maria D ;Nitev C ;Agust O.(2003)**,2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural indicator of honey quality.*J.Aгри.Food Chem*, 51 ,pp.278-283.
- Marini F ;Magri A-L ;Balestrieri F ;Fabretti F ;Marini D.(2004)**.Supervised pattern recognition applied to the discrimination of the floral origin of six types of Italian honey samples *Analytica Chimica Acta*, Volume 515 Issue 1.5 July 2004,pp.117-125.
- Markham K-R. (1982)** Techniques of flavonoids identification.Academic press.london. Chap. 1 and 2,pp.110-113.
- Markowicz B- D. H; Saldanha L-A; Catharino R-R.;Sawaya A-C; Cunha I; Carvalho P ; Eberlin M-N. (2007)** .Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12,pp.423-432.
- Meda A; Lamien C-E;marco R. (2005)**.Determination of the total phenolic, flavonoïde and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, vol. 91, n°3, pp. 571-577.
- Melliou E ;Chinou I .(2011)**.Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobial activity.*Food Chemistry* 129 pp.284-290.

- Meziti A.(2007)**. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L Etude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister Université de Batna,pp.30-67.
- Middleton and Elliott J. (1996)**. Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34 (5),pp.344-348.
- Milane H.(2004)**. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat.pp.100-110.
- Mohammedi Z.(2006)**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister.Tlemcen.
- Molan P-C.(2006)**.Honey and Medicine : Past,Present and Future.First North-South Conference & Workshops on Pharmacogenetics (Beating the Gene :From the Bench to the Bedside) activity.BeeWorld,73 ,pp.5-28.
- Morel Y and Baronki R. (1999)**.Repression of gene expression by oxidatives Stress.Biochem J 342 Pt 3,pp.481-496.
- Nadia Z; 2009**. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinalesd'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation deleur activité antibactérienne, Mémoire de magister (Ecole doctorale) deBiotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine,pp. 17-32.
- Namgoong S-Y ; Son.K-H ;Chang.H-W ;Kang.S-S ; Kim.H-P**. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 1994 54(5),pp.313-20.
- Nandaa V ;Sarkara B-C ;Sharmaa H-K and Bawa A-S.(2003)**. Determination of Some major and minor elements in the east of morocco honeys through inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Comp. Anal ;* 16(5) ,pp.613-619.
- Negueruela A-I.and P- C.(2000)** .Colour Measurement of Rosemary honey in the solid state by reflectance spectroscopy with black background.Journal of AOAC international ,pp.83-669.
- Neuzil J.(2002)**. Radical induced chain oxidation of protein and its inhibition by chain breacking antioxidant .*Biochem .;*9.pp.65-73
- Newman P-R;Timmerman B -N.and Marby T-J .(1974)**. laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.pp.125-130
- Ouchmoukh S;Schwetzter P; Bey M;Djoudad K-H;Louaileche H.(2010)**.HPLC Sugar profiles of Algerian honeys *Food chemistry*, Volume 121,Issue 2,pp.561-568.

- Pastre J-O.(2005).** Interret de la supplementation en antioxydants dans les aliments des carnivores domestiques. Thèse de doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse. Pp.14-26.
- Pietta P-G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63,pp.1035-1042.
- Pincemail j ; Bonjean K ; Cayeux, K ; Defraigne j O.(2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16,pp.233-239.
- Portes E. (2008).** Synthèse et Etudes d Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la préservation de Matériaux d'Origine Naturelle .Université de bordeaux 1.pp.244-250.
- Pourtallier J ;Taliercio Y.(1970).**Les caracteristiques physicochimiques des miels en fonction de leur origine florale.Application à un project pour les grandes variétés de miels. *Bull. Aic. Doc. Sci. Techn. Inf.* 13,pp.58-68.
- Prost P.(1999).** Apiculture. Paris .Edition J-B.Baillièrè ,pp.140-150.
- Pyrzynska K. and Biesaga M.(2009).**Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey .*Trends in Analytical Chemistry*,28(7),pp.893-902.
- Radi R.(2004).** Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. USA*. 101,pp.220.230.
- Rehaba W.(2012).** étude des activités biologiques et la toxicité aigue de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera Indica L.* (Anacardiaceae). Thèse de doctorat. Université de Bamako, (2002).128psanté. *Glycoscience & Nutrition*. 4 (6),pp.66-70.
- Ravazzi G.(2003).**Les autres produits de la ruche In « Abeilles et apiculture ».Ed :VECCHI ,pp.118-121.
- Read, M. A.** Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *Am. J.Pathol.* 1995 147(2),pp.235-240.
- Sanz M.L ;Gonzalez M ;de Lornzo Sanz C -J. and Martinez C-I.(2005).** A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey .*Food Chemistry*, 91,pp.313-317.
- Schweitzer P .(2005).**Encore des miels hors normes Revues.Revue l'abeille de France N°917.laboratoire d'analyse et d'écologie apicale,pp.10.15.
- Serrano S;Villarejo M;Espejo R;Jodrl M-I.(2007).**Diastase and invertase activities in Andalusian honeys, *Int.J.food Sci.Technol.*42,pp.76-79

- Seyoum A ; Asres K ;and El-Fiky F-K. (2006).** Structure – radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 67,pp.2058– 2070.
- Soulère L ; Viodé C ;Périé J ;and Hoffmann P.(2002).** Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50,pp.578-582.
- Tapas A-R; Sakarkar D. M; Kakde R-B. (2008).** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research* 7(3),pp.1089-1099.
- Terrab A ;Diez M-J ; Heredia F-J.(2003).**Characterisation of moroccan uniforal honeys by their physicochemical characteristics,*Foodchem*;79,pp.337-73
- Tiqwari A-K. (2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science* 81(9),pp.1179-1181.
- Tsimogiannins D-I ;Oreopoulou V. (2006).** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members.pp.90.99.
- Turrens J-F.(2003).**Mitochondrial formation of reactive oxygen species *JPhysiol* 552,pp.335-344.université Toulouse III-Paul SABATIER, Limoges-2004 ,pp .24-42.
- Turkmen N ; Velioglu Y-S ;Sari F ;Polat G. (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black. 1978 ,pp.17 -20.
- Valko M ; Rhodes C- J ;Moncol J ; Izakovic M ; Mazur M.(2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 16,pp.30.40.
- Van Acker; Van G-P ;Van den Berg, D.J ; Bast, A ;Van D-V.(1998).** Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Activity of Flavonoids,pp.150-155.
- Vanhanen ;Andrea E ; Geoffrey P. Savage .(2011).** Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey . *Food Food Chemistry*,Volume 128,Issue 1,pp.236-240.
- Vindis C.(2000).**Etude de l'effet prolifératif du peroxyde d'hydrogène produit par les monoamine oxydase rénales. Université Paul Sabatier, Toulouse, pp.220-222.
- Voidarou C ;Alexopoulos A ;Plessas S ;Karapanou A ;Mantzourani I ;Stavropoulou E ;Fotou K :Tzora A ;Skoufos I ;Bezirtzoglou E.(2011).**Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria.*Anaerobe* 17,pp.375-379.

- Vuorela S. (2005)** Analysis, isolation. and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.p,100.105.
- Wong C-C; Li H-B;Cheng K-W; Chen F. (2006)** .A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay12,pp120-130.
- Yao L-H., Jiang Y-M ; SHI J ; Tomas B-A ; Datta N ; Singanusong R ; Chen S-S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59,pp.113-122.
- Yrjonen T. (2004)** .Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at Viikki info center. Faculty of pharmacy of the university Helsinki. 64,pp50.55.
- Yu R; Mandlekar, S; Tony K-A. (2000).** "Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c.*Molecular Pharmacology*, 58,80.88.431-437.
- Zappala M ;Fallico, B ;Arena E. and Verzera A. (2005).** Methods for the determination Of HMF in honey : a comparaisn .*Food Control*,16 ,pp.273-277.
- Zerrouk H-S ; Fallico B-G ; Arena E-A ; Gabriele F-B. and Larbi A-B.(2011).** Quality Evaluation of Some Honey from the Central Region of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, Vol. 4, N°. 4,pp. 243-248.

## Annexe 1 :

- **Tableau de CHATWAY** : Relation entre la teneur en eau et l'indice de réfraction du miel (Bogdanov, 2002)

W (g /100g)	R.I (20°C)	W (g /100g)	R.I (20°C)	W (g /100g)	R.I (20°C)
13.0	1.5044	17.2	1.4935	21.4	1.4830
13.2	1.5038	17.4	1.4930	21.6	1.4825
13.4	1.5033	17.6	1.4925	21.8	1.4820
13.6	1.5028	17.8	1.4920	22.0	1.4815
13.8	1.5023	18.0	1.4915	22.2	1.4810
14.0	1.5018	18.2	1.4910	22.4	1.4805
14.2	1.5012	18.4	1.4905	22.6	1.4800
14.4	1.5007	18.6	1.4900	22.8	1.4795
14.6	1.5002	18.8	1.4895	23.0	1.4790
14.8	1.4997	19.0	1.4890	23.2	1.4785
15.0	1.4992	19.2	1.4885	23.4	1.4780
15.2	1.4987	19.4	1.4880	23.6	1.4775
15.4	1.4982	19.6	1.4875	23.8	1.4770
15.6	1.4976	19.8	1.4870	24.0	1.4765
15.8	1.4971	20.0	1.4865	24.2	1.4760
16.0	1.4966	20.2	1.4860	24.4	1.4755
16.2	1.4961	20.4	1.4855	24.6	1.4750
16.4	1.4956	20.6	1.4850	24.8	1.4745
16.6	1.4951	20.8	1.4845	25.0	1.4740
16.8	1.4946	21.0	1.4840		
17.0	1.4940	21.2	1.4835		

## Annexe 2 :

- **Tableau :** Normes pour certains paramètres physicochimiques du miel selon le codex alimentarius (2001) et le Journal Officiel de l'Union Européenne(2002)

<b>Paramètre physicochimique</b>	<b>Valeurs limites</b>
Teneur en eau	Miel en général : <20%
Teneur en sucre : -glucose et fructose  -saccharose -sucre réducteurs	Miel de fleur général : >60% Miel de miellat ou mélange avec miel de fleur : >45% Miel en général : <5 % Miel de fleur: >65% Miel de miellat ou mélange avec miel de fleur : >60%
Acidité libre	Miel en général <50 meq/kg
Teneur en HMF	Miel en général <40 meq/kg
Teneur en cendres	Miel de nectar : <0.6% Miel de miellat ou mélange avec miel de fleur : <1%
Conductivité électrique	Miel de nectar : <0.8mS/cm Miel de miellat : >0.8mS/cm

## الملخص

العسل منتج واسع الانتشار والاستعمال في بلادنا. هذا المنتج الطبيعي هو مصدر لا ينضب من المواد والمركبات الطبيعية النشطة بيولوجيا.

دراستنا هذه تتعلق بالميزات الفيزيوكيميائية واختبار النشاط المضاد للأكسدة من خلال دراستنا لنوع من العسل الطبيعي لمنطقة بوحمامة (خنشلة).

المميزات الفيزيوكيميائية نسبة الماء، نسبة السكريات، نسبة الرماد، درجة الحموضة، الناقلية الكهربائية ودرجة تغيير مسار الضوء المستقطب وHMF. أظهرت أن عسل بوحمامة ذو حموضة ضعيفة مما يدل على انها من اصل زهري متعدد وغني بالفركتوز .

كشفت الفحص الكيميائي النباتي أن هذه العينة غنية بالمواد الفعالة وهي الصابونين، التينينات والفلافونويدات بالإضافة إلى ذلك بينت الدراسة النوعية باستعمال كروماتو غرافيا الطبقة الرقيقة لمستخلصات العسل أنها غنية بالفلافون والفلافونول .

تظهر نتائجنا أن مستخلصات الميثانول والبيتانول وخلات الايثيل غنية بالبوليفينول والفلافونويدات .

النشاط المضاد للأكسدة للعسل الطبيعي يعتمد على تركيبة الكيميائية، والدراسة المضادة للأكسدة باختبار جذر DPPH اكدت ان الفلافونويدات المكونة للعسل تملك خاصية كبح الجذور الحرة، حيث ان مستخلص الميثانول يملك نشاط مضاد للأكسدة يصل الى % 37.38 يليه مستخلص البيتانول بقيمة

% 36.94 علما أن النشاط المضاد للأكسدة يعتمد على نسبة الجرعة .

وفي الختام يظهر جليا أن عسل بوحمامة يملك نشاط مضاد للأكسدة، لذلك يمكن أن يكون مورد طبيعي للدراسات المستقبلية .

**الكلمات المفتاحية :** الكروماتو غرافيا الخصائص الفيزيوكيميائية، DPPH، الفلافونويدات، العسل الطبيعي.

## **Abstract**

Honey is a widely known and used product in our country. This natural product is an inexhaustible source of bioactive substances and natural compounds. Our study involved the characterization and physico-chemical looking for antioxidant activity from a variety of natural Honey of Bouhmama region in Khenchela.

The physico-chemical characteristics ( water content, sucroses content, ash content ,pH, and electrical conductivity and it's HMF content ) have shown that the variety of Bouhmama is a low pH of honey nectar, polyfloral and high fructose.

The phytochemical screening revealed that this sample is a rich set of active substances namely saponins, tannins and flavonoids. In addition, the TLC performed on organic extracts of honey has confirmed flavones and flavonols wealth.

Our results show that methanol and n-butanol and ethyl acetate extracts have a wealth of total polyphenols and flavonoids.

The antioxidant activity of natural honey largely depends on their chemical composition, studying the antioxidant power by DPPH method confirmed the powerful properties that have flavonoids, characterizing our extracts honey trap free radicals whose methanol extract has an anti-radical activity of 37.38 % followed by n-butanol extract with an inhibition of 36.94 % knew that the anti-radical activity is dose dependent.

In conclusion; honey of Bouhmama is endowed with a remarkable antioxidant activity. Therefore it can be a natural resource for future studies on oxidative stress and its complications.

**Keywords :** TLC, physico-chemical characteristics, DPPH, Flavonoids, natural honey

---

## Résumé

Le miel est un produit largement connu et utilisé dans notre pays. Ce produit naturel constitue une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. Notre étude a concerné la caractérisation physico-chimique et la recherche d'activité antioxydante à partir d'une variété du miel naturel de la région de Bouhmama à Khenchela.

Les caractéristiques physico-chimiques ( teneur en eau, teneur en sucre , teneur en cendre, pH, conductivité électrique et l'HMF ) ont montré que la variété de Bouhmama est un miel du pH faible à origine de nectar, polyfloral et riche en fructose.

Le screening phytochimique a dévoilé que cet échantillon constitue un ensemble riche en substances actives à savoir les saponosides, les tanins et les flavonoïdes. En plus, la chromatographie sur couche mince effectuée sur les extraits organiques issus du miel a confirmé une richesse en flavones et flavonols.

Nos résultats montrent que les extraits méthanolique et n-butanolique et acétate d'éthyle présentent une richesse en polyphénols totaux et flavonoïdes.

L'activité anti oxydante du miel naturel dépend largement de leur composition chimique, l'étude du pouvoir antioxydant par la méthode du DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les flavonoïdes, caractérisant nos extraits du miel, à piéger les radicaux libres dont l'extrait méthanolique présente une activité antiradicalaire de 37.38% suivis par l'extrait n-butanolique avec une inhibition de 36.94% sachant que cette activité antiradicalaire est dose-dépendante.

En conclusion; le miel de Bouhmama est doué d'une activité antioxydante remarquable. De ce fait il peut constituer une ressource naturelle pour les futures études sur le stress oxydant et ses complications.

**Mots-clés:** CCM, Caractéristiques physico-chimiques, DPPH, Flavonoïdes, Miel naturel.

---

