

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des produits naturels

THEME

**Contribution à l'étude de l'activité anti-oxydante des composés
phénoliques de six variétés de miels Algérien**

Présenté par : Boutassouna Messaouda

Encadre par :

M^{elle} Boussoussa Hadjer

Mme Khacheba Ihcen

Soutenu publiquement le : 2015-2016

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord ALLAH le tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et la foi en nous même, pour arriver à ce jour. Et avoir aidées à accomplir ce modeste travail.

Et quiconque ne remercie pas les gens, ne remercie pas Allah

Je remercie très chaleureusement mademoiselle Boussoussa Hadjer et Mme Dressi Ihsane. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre encadrement efficace. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous m'avaient témoigné tout au long de cette étude. Malgré vos importantes obligations, vous avaient toujours été présent pour recadrer mes recherches dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de cette mémoire.

Ensuite, c'est avec une grande reconnaissance que je salue les membres du laboratoire de recherche de l'université de Laghouat, et plus particulièrement à monsieur Youssfi et monsieur Harat qui m'ont toujours prêté une oreille attentive et ont répondu à mes attentes avec soin et précision. A madame Baite samira pour leurs aides techniques sa gentillesse et sa disponibilité, à monsieur Hafassi Ahmed, pour son aide précieuse,

*Je teint à témoigner mes profondes reconnaissances à Messieurs les **membres de jury** pour avoir bien voulu présider et examiner cette thèse et y apporter ses critiques constructives, ainsi que sa participation au jury.*

Je tiens à témoigner également mes profondes reconnaissances à tous les personnels de laboratoire de Sadikiya pour leurs soutient.

Dédicace

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds Je dédie ce modeste travail

En premier lieu à la mémoire de mon père Ahmed

A ma fierté, ma raison d'être en reconnaissance de son amour et tendresse, leur sacrifice à mon égard et toute peine qu'elle m'a donnée pour mon éducation.

A ma belle-mère Fatna

A mon mari, Lakhdar, en signe de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.

A mes très chères sœurs, et frères surtout Kheira.

A mes beaux frères et mes belles sœurs.

A mes collègues de laboratoire de sadikia pour leurs soutiens.

A tous ceux qui m'aiment.

Messaouda

ملخص

من الثابت أن العسل يحتوي على مضادات الأكسدة الهامة التي يمكنها حماية مكونات الخلية من الآثار الضارة للجذور الحرة ويمكن لهذه المركبات تعزيز دفاعات الجسم وبالتالي تمنع الأكسدة لدى الإنسان. لذلك، مع مرور الوقت، يمكن للخلايا الضعيفة أن تتراكم وتؤدي إلى الأمراض المرتبطة بالعمر الكثير من البحوث الحالية تركز الاهتمام على دراسة الجزيئات المضادة للأكسدة من أصل طبيعي ولهذا أجريت دراسة لتقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة اختبار DPPH على ستة اصناف من العسل الطبيعي من مناطق مختلفة من الأراضي الجزائرية (العسل الجبلي، الخزامى السدر، الكافور، الزعتر ومتعدد الازهار). عسل الزعتر يحتوي على أعلى محتوى من الفينول ($763,333 \pm 116,328 \mu\text{gEAG/g}$) وثمة علاقة قوية بين الأنشطة المضادة للأكسدة للعسل والمحتوى الكلي للفينول و بين مجموع الفينولات والفلافونيدات

كلمات البحث: مركبات الفينول، مركبات الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة. DPPH.

Résumé

Il est bien établi que le miel contient des composés antioxydants importants qui pourraient protéger les composants cellulaires de l'action néfaste des radicaux libres. On peut spéculer que ces composés peuvent renforcer les défenses de l'organisme et par conséquent de prévenir le stress oxydatif chez les humains. Par conséquent, au fil du temps, les cellules déficientes peuvent accumuler et conduire à des maladies liées à l'âge. Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle donc une étude a été réalisée afin d'évaluer l'activité antioxydante testée au DPPH de six variétés de miel de différentes régions du territoire Algérien (miel montagne, lavande Jujubier, eucalyptus, thym, multi fleur). Le résultat montre que le miel de thym avait le plus haut contenu en phénols totaux avec $763,33 \pm 116,32 \mu\text{gEAG/g}$. Ainsi une forte corrélation entre les activités antioxydantes des miels et leur teneur totale en phénol a été remarquée. et entre le phénol et le total flavonoïde

Mots-clés : antioxydant, composés phénoliques, flavonoïdes, DPPH,

Abstract

It is well established that honey contains substantial antioxidant compounds that could protect cell components from the harmful action of free radicals. One can speculate that these compounds may strengthen the organism defenses and consequently prevent oxidative stress in humans. Therefore, over time, impaired cells can accumulate and lead to age-related diseases. Much of the interest of current research focuses on the study of antioxidant molecules of natural origin. A comparative study was carried out to assess the antioxidant activity tested with the DPPH of six varieties of natural honey from different regions of Algerian territory (mountain honey, jujube lavender, eucalyptus, thyme, multi flower) Thyme honey had the highest phenolic content with $763.333 \pm 116.328 \mu\text{gEAG / g}$ A strong correlation between the antioxidant activities of honeys and their total phenol contents has been noticed. and between phenol and flavonoid totaux

Keywords: honey, antioxidant, Phenolic compounds, flavonoids, DPPH.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale..... 1

Chapitre I : Étude Bibliographique

1.1 Historique de miel.....	3
1.2 Définition de miel	3
1.3 Différents types du miel.....	3
1.3.1 L'origine florale.....	3
1.3.1.1 l'origine monofloraux	4
1.3.1.2 Miels polyfloraux	4
1.3.2 L'origine géographique.....	4
1.4 Composition et propriétés chimiques	4
1.4.2 Les éléments majeurs	5
1.4.2 Les éléments mineurs.....	6
1.4.3 Divers constituants	8
1.5 Les propriétés physiques	9
1.5.1 La cristallisation	9
1.5.2 La viscosité	9
1.5.3 Le pH	10
1.5.4 Couleur	10
1.5.5 Solubilité.....	10
I.6 Valeur thérapeutique et activités biologiques du miel	10
I.6.1 Effets biologiques des composés phénoliques du miel.....	11
I.6.1.1 Effets antimicrobiens, antiviraux et antiparasitaires.....	12
I.6.1.2 Effets anti tumoraux et antimutagènes.....	13
I.7 L'activité antioxydante du miel	13
I.8. Effets antioxydants	13
I.9.Stress oxydant cellulaire.....	14
I.9.1Les espèces réactives d'oxygène(ERO)	14
I.9.2 Systèmes de défenses antioxydants.....	15

I.10 Polyphénols naturels comme antioxydants.....	16
I.11 Activité antioxydante des flavonoïdes.....	16
I.12 Activités antioxydantes du miel.....	17
I.13 Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	18

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Matériels.....	21
II.2 Extraction des composés phénoliques du miel.....	21
II.2.1 La macération à froid.....	22
II.2.2 Extraction liquide-liquide.....	22
II.3 Calcul du rendement	23
II.4 Analyse quantitatives des extraits du miels	24
II.4.1 Dosage des polyphénols.....	24
II.4.1.1 Protocole expérimentale.....	24
II.5 Dosage des Flavonoïdes.....	24
II.5.1 Protocole expérimentale.....	24
II.6 Evaluation de l'activité antioxydante.....	25
II.6.1 Test de DPPH.....	25
II.6.1.1 Protocole expérimentale.....	25

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 Rendement des extractions	26
III.2 Dosage des phénols totaux.....	28
III.3 Dosage des flavonoïdes.....	30
III.4 Résultats du pouvoir antioxydant du radical libre DPPH.....	31
Conclusion générale	41

Références bibliographiques

Annexe

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Composition du miel (toutes les données sont données en g/100g de miel).....	5
Tableau 02 :	Les traces des sels minéraux dans le miel.....	7
Tableau 03:	Composés phénoliques identifiés dans les différents types du miel analysés.....	9
Tableau 04 :	Indications de miels spécifiques en fonction de la pratique en apithérapie.....	10
Tableau 05 :	Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....	14
Tableau 07 :	Description des échantillons du miel utilisés dans notre étude.....	21
Tableau 08 :	La teneur, l'aspect et la couleur des extraits phénoliques de miel obtenus de chaque méthode d'extraction	26
Tableau 09:	Les teneurs en phénols totaux des différents extraits obtenus des variétés de miel choisies dans cette étude.....	29
Tableau 10 :	La teneur en flavonoïdes des extraits obtenus de nos différents échantillons de miel. Flavonoïdes (EQ µg/g).....	30
Tableau 11 :	Les valeurs d'EC ₅₀ en (mg/ml) des différents extraits méthanoliques éthanolique et d'acétate d'éthyle.....	36
Tableau 12 :	Les valeurs d'EC ₅₀ en (mg/ ml) des antioxydants standards.....	36

Liste des figures

Figure 01 :	La construction de l'HMF à l'aide des hexoses.....	7
Figure 02 :	Réaction enzymatique de glucose oxydase.....	12
Figure 03 :	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	15
Figure 04 :	Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène. Le radical formé devient moins dangereux	16
Figure 05 :	Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	17
Figure 06 :	Structure chimique du radical libre DPPH(2,DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle.....	18
Figure 07 :	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	19
Figure 08 :	Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power)..	20
Figure 09 :	Photos illustrant les échantillons de miel utilisés dans cette étude.....	21
Figure 10 :	Différentes étapes d'extraction solide-liquide au méthanol et éthanol.....	22
Figure 11 :	Macération et extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle des différents types des miels.....	23
Figure 12 :	Les rendements des divers extraits du miel.....	28
Figure 13 :	Courbe d'étalonnage représentant de l'acide gallique.....	28
Figure 14 :	Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	30
Figure 15 :	Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations vitamine C	32
Figure 16 :	Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations vitamine E.....	32
Figure 17 :	Courbes représentants la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en composés phénoliques.....	35
Figure 18 :	Corrélation entre les phénols totaux et flavonoïdes des extraits acétate d'éthyle	39
Figure 19 :	Corrélation entre les phénols totaux et flavonoïdes...des extraits méthanolique	39
Figure 20 :	Corrélation entre les phénols toutox-Ec ₅₀	40

Liste des abréviations et symboles

%	Pourcentage
°C	Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
Abc	Absorbance
AcEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AlCl₃	Tri chlorure d'aluminium
EC	électrophorèse capillaire
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EAG	équivalent en acide gallique
EC₅₀	concentration de substrat qui inhibe 50% du radical dpph
EO_R	espèce réactive d'oxygène (reactive oxygen species).
ER	équivalent de la rutine
Eta-OH	Ethanol
FRAP	Essai de la réduction du fer du plasma.
g	Gramme
EAG	équivalent en acide gallique
H	Proton
HO	Hydroxide
H₂O₂	eau oxygénée
HPLC-DAD	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette d'iode
I%	pourcentage d'inhibition
Kg	Kilogramme
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
min	Minute
ml	millimètre
Me-OH	Methanol
N	Azote

nm	Nanomètre
O₂	Dioxygène
O₂⁻	ion d'hydroxide
ONOO⁻	Peroxynitrite
pH	le potentiel hydrogène
R	radicale
R²	coefficient de corrélation
UV/ Vis	ultraviolet-visible
Vit C	vitamine c

Introduction générale

Le miel a été utilisé depuis les temps les plus reculés et jusqu'à présent il est largement apprécié comme la forme concentrée de sucres disponibles dans le monde (Aline et *al*, 2004). Le miel est un produit complexe naturel produit par les abeilles à partir du nectar des fleurs ou d'exsudats d'arbres pour produire des miels de nectar ou miella.

La composition du miel dépend des plantes visitées par les abeilles et des conditions climatiques et environnementales (Rosa et *al*, 2004). Le miel est une solution sursaturée de sucres, qui contient plus de 180 autres constituants tels que les enzymes, les acides aminés et les acides organiques, les caroténoïdes, les produits de la réaction de Maillard, les vitamines, des minéraux et des polyphénols. Les composés mineurs donnent leurs propriétés bioactives, comme des composés d'intérêt biologique (flavonoïdes et des acides phénoliques) (Märghitas et *al*, 2009). Une des particularités des polyphénols réside dans leur incroyable diversité, puisque l'on dénombre à l'heure actuelle plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 pour la sous classe des flavonoïdes. Leurs effets positifs qu'ils exercent sur l'organisme humain en leur qualité d'antioxydants ont commencé à être reconnus, notamment dans le domaine de la médecine préventive (**Boubekri. 2014**).

Le miel frais affiche une activité antioxydante importante, semblable à de nombreux fruits et légumes (Gheldof et *al*, 2002). Les plantes contiennent une variété de dérivés polyphénoliques avec grande diversité et complexité structurale et par conséquent, lorsque les abeilles recueillent le nectar ou de miellat, ces composés bioactifs peuvent être transférés à partir de plantes au miel (Silici et *al*, 2010). Les composés phénoliques dans le miel (en particulier les flavonoïdes) constituent un groupe important pour leurs propriétés fonctionnelles et thérapeutique (Yao et *al*, 2004).

L'objectif de cette étude est de comparer le pouvoir antioxydant de différents extraits phénoliques de quelques échantillons de miel vis-à-vis de leur action sur le phénomène du piégeage des radicaux libres. Cette comparaison permettra de choisir le type de miel le plus adéquat et ayant le critère de qualité optimal : d'une part sa teneur en composés phénoliques et parallèlement, son activité antiradicalaire.

Dans la démarche globale de cette étude, en premier lieu, un constat général sur le miel, ses caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques, son origine et ses différents types a été entamé. En second lieu une description générale sur les composés phénoliques du miel et leurs activités biologiques a été entreprise.

Dans la partie expérimentale ; nous nous sommes intéressés à l'extraction et le dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes de différents échantillons de miel et ceci en adoptant trois méthodes d'extraction. Par la suite, nous avons évalué l'activité antioxydante de nos extraits phénoliques par le biais d'un test chimique, le DPPH.

La troisième partie de ce mémoire, a été consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Nous terminerons cette étude par une conclusion générale et des perspectives de recherche à venir puis la liste de référence et annexe.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Partie bibliographique

I.1 Historique de miel

Le miel est bien connu de tous et largement consommé par toutes les populations depuis les périodes préhistoriques et la plus haute antiquité, au moins depuis 13 000 ans. Cependant, devant la complexité de sa composition, sa description se révèle délicate. Dans l'ensemble des dictionnaires des XIXe et XXe siècles, le miel est défini comme étant une « substance sucrée, élaborée par certains insectes tels que l'abeille ».

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 (Lobreau-Callen, *et al*, 2000).

I.2 Définition de miel

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par l'abeille *Apis mellifera* (*Apidae*), à partir du nectar des plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butineuses laissées sur les parties vivantes de plantes, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles secrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche (Codex alimentarius, 2001 ; Blanc, 2010).

I.3 Différents types de miel

Le miel est classé en fonction de plusieurs critères ;

I.3.1 L'origine florale

La majorité des miels proviennent d'une flore bien diversifiée. Il est courant que les abeilles visitent à la fois une dizaine ou une vingtaine d'espèces végétales fleurissant en même temps dans leur secteur de butinage indiquent que chaque abeille est intéressée à une seule espèce végétale, mais en considère l'ensemble de la population d'une ruche, qui comporte des milliers de butineuses (Emmanuelle *et al*, 1996).

Le miel peut avoir une origine florale mais aussi animale. Par exemple, la présence de mélézitose est caractéristique du miellat, absente chez les miels de fleurs (Blanc, 2010).

I.3.1.1 Miels monofloraux

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

I.3.1.2 Miels polyfloraux

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

1.3.2 L'origine géographique

Certains miels polyfloraux ont acquis une réputation particulière qui est liée à leur origine géographique, qu'il s'agisse d'une petite région, d'une province ou d'un continent. Par contre, il n'est pas impossible qu'une origine florale soit associée avec une région (**Emmanuelle et al, 1996**).

I.4 Composition et propriétés chimiques

- Le miel est constitué essentiellement de différents sucres mais surtout en fructose et en glucose, ainsi qu'en autres substances telles que des acides organiques, des enzymes et des particules solides provenant de la récolte du miel (**Tableau 01**). La couleur du miel peut aller d'une teinte presque incolore au brun Sombre. Il peut avoir une consistance fluide, épaisse ou cristallisée en partie ou en totalité. Le goût et l'arôme varient mais dépendent de l'origine végétale ; (**Hoyet, 2005**).
- Le miel, comme nous l'avons vu précédemment, est élaboré en plusieurs étapes et chacune influence sa composition chimique. Il n'existe donc pas un miel mais des miels (**Hoyet, 2005**). En effet, la composition qualitative de ce produit est soumise à des nombreux facteurs très variables qu'il est impossible de maîtriser tels que : la nature de la flore visitée par l'abeille et celle du sol sur lequel pousse ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles, l'état physiologique de la colonie....etc (**Rossant, 2011**).

Tableau 01 : Composition du miel (toutes les données sont données en g/100g de miel). (Bogdanov *et al.*, 2006)

	Miel de fleurs		Miel de forêt	
	Moyenne	Min.-max	Moyenne	Min.-max
Eau	17,2	15-20	16,3	15-20
Fructose	38,2	30-45	31,8	28-40
Glucose	31,3	24-40	26,1	19-32
Saccharose	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
Autres disaccharides	5,0	2-8	4,0	1-6
Mélézitose	<0,1	-	4,0	0,3-22,0
Erlose	0,8	0,5-6	1,0	0,1-6
Autres trisaccharides	0,5	0,5-1	3,0	0,1-6
Polysaccharides non déterminés	3,1	-	10,1	-
Total des sucres	79,7	-	80,5	-
Sels minéraux	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2
Acides aminés, protéines	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Acides	0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
Ph	3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

I.4.1 Les éléments majeurs

- **a. L'eau**

La teneur en eau est en moyenne de 17 à 20 %. Cependant, à l'exception des miels de bruyère, l'eau ne devrait pas excéder 18 %. Dans le cas de la callune, le pourcentage en eau est plus élevé (19 à 26 %), en relation avec la thixotropie du miel due à la présence d'une protéine (Lobreau-Callen *et al.*, 2000) .

- **b. Les glucides**

Certains sucres, tel que le saccharose, sont en partie transformés en glucose et fructose. La composition en sucres des miels est au moins aussi diversifiée que celle des nectars ou des miellats et dépend directement de la flore butinée. Cependant, les proportions des différents sucres varient et sont souvent plus élevées en glucose et en fructose. Les miels les plus doux sont les plus riches en fructose : ce sont ceux de châtaignier, sainfoin, robinier faux acacia, Impatiens glandulifera (balsamine de l'Himalaya). Le glucose est dominant dans les miels de bruyère. Le mélézitose, l'erlose, le raffinose sont des tri- et polysaccharides

provenant généralement des miellats (miels de sapin, d'épicéa, de mélèze...) (Lobreau-Callen *et al.*, 2000).

I.4.2 Les éléments mineurs

- **a. Les acides**

Tous les miels sont acides avec un pH de 3,1 à 4,5 (moyenne 3,9). L'acidité est libre ou combinée (lactones provenant de la transformation Des sucres). Parmi l'ensemble des acides présents dans les différents nectars et dans le miel, le plus fréquent est l'acide gluconique dû à la dégradation enzymatique du glucose avec dégagement d'eau oxygénée (Lobreau-Callen *et al.* 2000).

- **b. Les enzymes**

Les miels contiennent des enzymes qui viennent des abeilles ou des insectes qui ont rejeté les miellats (pucerons, cochenilles ...). Les enzymes sont des protéines fragiles qui vont se dégrader lentement et ce processus est accéléré par la chaleur.

En fonction de l'origine botanique du miel, la quantité d'enzymes présentes varie fortement. La mesure de l'activité des enzymes va indiquer si le miel a subi ou non une dégradation. Deux enzymes peuvent être analysées dans le miel : l'amylase et l'invertase. La mesure de leurs activités permet de savoir si un miel a été chauffé ou conservé à une température trop élevée. Normalement, les opérations réalisées par l'apiculteur de la récolte au conditionnement ne portent pas préjudice à ces enzymes (Hoyet, 2005).

- **c. Les sels minéraux**

Le miel contient différents sels minéraux et vitamines. Les miels de miellat sont plus riches en sels minéraux que les miels de fleurs (Tableau 02). Le potassium est le sel minéral le plus fortement représenté. Le miel contient un grand nombre de sels minéraux et d'éléments de trace (Bogdanov *et al.* 2006).

Tableau 02 : les traces des sels minéraux dans le miel **Bogdanov et al. 2011)**

Aluminium(AI)	0.01- 2,4	Plomb (Pb)	0.001-3
Arsenic(AS)	0.014- 0.026	Lithium(Li)	0, 225-1,56
Baryum(BA)	0.01- 0.0 8	Molybdène(MO)	0-0.004
Bore(B)	0.05-0,3	Nickel(Ni)	0-0.051
Brome (Br)	0,4-1,3	Rubidium(Rb)	0.04-0,35
Chlore (cl)	0, 4-56	Silicium(Si)	0.05-24

• **d. L’hydroxyméthylfurfural (HMF)**

La dégradation thermique des hexoses peut , en présence d’un acide, amener à la formation d’un dérivé hétérocyclique à fonction carbonylée: l’hydroxyméthylfurfural, la formule de ce corps a été établie en 1910 par van Ekenstein et Blanksmal (**Gonnet, 1963**).

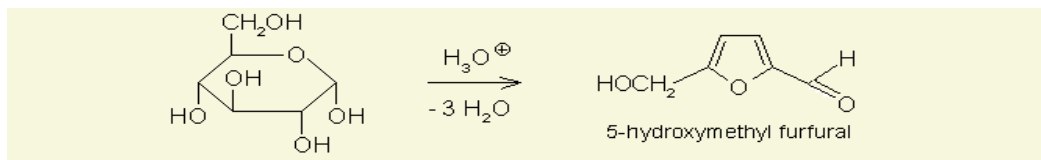


Figure 01 : La construction de l’HMF à l’aide des hexoses (**Bogdanov et al. 2011**).

L’HMF est un produit intermédiaire de la réaction de Maillard, cette réaction est non enzymatique et se rencontre fréquemment en présence des glucides et des amides acides (**Gonnet, 1963**).

L’HMF est présent dans les vieux miels ou dans les miels qui ont subi un chauffage (voire aussi à l’état naturel, comme dans le miel de lavande). Ceci est dû à la déshydratation moléculaire des monosaccharides (principalement du fructose). Cette substance, à forte concentration, dénature la qualité d’un miel, en altérant son goût. Son dosage permet de vérifier la qualité du miel. Cette composition dépend de très

nombreux facteurs : espèces butinées, nature du sol, race d'abeilles, état physiologique de la colonie (**Gonnet et Vache, 1985**).

I.4.3 Divers constituants

- **a. Les vitamines**

Elles sont peu nombreuses et en très faible quantité (Tableau 03). Elles appartiennent au groupe C, très rarement aux groupes A, D et K lorsque les nectars en contiennent et, plus souvent, au groupe B que renferme le pollen (thiamine, biotine, acide folique...) (**Lobreau-Callen et al., 2000**).

- **b. Les substances aromatiques et divers composés**

L'analyse des miels montre qu'une grande diversité de substances entrent en jeu. Il s'agit d'alcools, d'acétone, d'acides, d'esters, d'acétates, d'aldéhydes. L'anthranilate de méthyle est abondant dans les miels de Citrus (orangers, clémentiniers, citronniers), mais présent aussi dans de nombreux autres (miels de colza ou de trèfle) (**Lobreau-Callen et al, 2000**).

Le miel contient également des éléments figurés : grains de pollen, spores de champignons, algues microscopiques, levures, etc., dont l'identification sous le microscope permet d'obtenir des renseignements sur l'origine florale et géographique (analyse pollinique des miels ou méliko-palynologie). L'étude microscopique du miel permet de lui attribuer une appellation : miel toutes fleurs, miel de lavande, de châtaignier... Un miel n'est jamais issu à 100% du même type de fleur ; on donne au miel le nom de l'espèce qui est majoritaire.

Les pigments colorent et aromatisent les miels. Ce sont principalement des caroténoïdes, des xanthophylles et des flavonoïdes (**Hoyet, 2005**).

- **c. Les composés phénoliques du miel**

David et al (2011), ont analysé différents types de miel dans le but de définir clairement leur composition phénolique par **HPLC-DAD** (chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette d'iode) et par électrophorèse capillaire (**CE**). Le tableau 02 résume certains composés phénoliques identifiés dans les différents types du miel analysés (**David et al 2011**).

Tableau 03: Composés phénoliques identifiés dans les différents types du miel analysés. **David et al (2011)**

Type du miel	Technique	Composés phénoliques identifiés
Eucalyptus, bruyère, châtaigne, lavande, tournesol, romarin, acacia, orange	HPLC-DAD	L'acide 4-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide gallique, acide syringique, acide vanillique, acide férulique, acide caféique, acide p-coumarique.
Miel d'eucalyptus (australien)	HPLC-DAD	acide chlorogénique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique.
Agrumes, lavande, thym, romarin	CE-DAD	acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique, acide syringique, acide chlorogénique, acide férulique, acide cinnamique.
Miel d'eucalyptus	HPLC-DAD	Myricétine, tricetin, quercétine, lutéoline, éther, quercétine-3-méthyl, Kaempferol, pinocembrin, chrysin, pinobanksine, genkwanine, isorhamnétine.
Miel de romarin	CE-DAD	Kaempferol, chrysin, acide p-coumarique, pinocembrin, acide férulique.

I.5 Les propriétés physiques

I.5.1 La cristallisation

Le miel consiste en une solution sucrée sursaturée. La cristallisation du miel est ainsi un processus naturel. La vitesse de cristallisation dépend surtout de la teneur en glucose du miel. Les miels dont la teneur en glucose est < 28 g/100 g ou dont le rapport glucose/eau est $< 1,7$ restent plus longtemps liquides. Les miels à cristallisation rapide se cristallisent le plus souvent très finement, alors que les miels à cristallisation lente ont tendance à avoir une cristallisation grossière. Une cristallisation fine peut être obtenue par des procédés spéciaux d'ensemencement (**Bogdanov et al. 2006**).

I.5.2 La viscosité

Elle varie en fonction de la température, de la teneur en eau et de la composition chimique du miel. A 35°C , tous les miels sont fluides. Certains sont thixotropes (c'est-à-dire que ces miels lorsqu'on les agite deviennent liquides mais reprennent leur viscosité première après repos) comme ceux d'*Erica* et surtout de *Calluna*. Ils ont une viscosité anormale, leur consistance étant celle d'un gel (**Hoyet, 2005**).

I.5.3 Le pH

Le pH du miel est acide ; il oscille entre 3 et 6 (Hoyet, 2005).

I.5.4 Couleur

La couleur constitue un critère de classification notamment d'un point de vue commercial. Plus il est clair, moins il est riche en minéraux et inversement (BLANC, 2010) sept catégories de couleurs, elle va du jaune très pâle (presque blanc) au brun très foncé (presque noir) en passant par toute la gamme des jaunes, oranges, marrons et même parfois des verts ;mais le plus souvent le miel est blond. Elle est due aux matières minérales qu'il contient (Chouia .,2013).

I.5.5 Solubilité

Le miel est soluble dans l'eau, l'alcool dilué et insoluble dans l'alcool fort, l'éther, le chloroforme, le benzène (Hoyet, 2005).

I.6 Valeur thérapeutique et activités biologiques du miel

Depuis la nuit des temps, on s'est servi du miel, aussi bien comme d'un aliment que d'un médicament. Les diverses utilisations médicinales du miel semblent être transmises, de façon traditionnelle et empirique, au fil des siècles. Depuis quelques années, les scientifiques se sont davantage penchés sur ce produit et des dizaines d'études ont été réalisées. La plupart d'entre elles ont confirmé les vertus que l'on avait traditionnellement accordées au miel, mais d'autres ont également permis de lui découvrir de nouvelles propriétés thérapeutiques (Tableau 04). (Bogdanov *et al.*, 2006).

Tableau 04 : Indications de miels spécifiques en fonction de la pratique en apithérapie. (Bogdanov *et al.*, 2006)

Sorte de miel	Applications
Acacia Liquide et doux	Bon édulcorant pour les diabétiques de type II. Stimule la digestion. Indiqué dans le cas de troubles de l'estomac, de l'intestin, du foie et des reins.
Sarrasin Foncé et corsé	Stimule la digestion; indiqué en cas de grossesse et d'allaitement.
Eucalyptus Foncé et corsé	Indiqué en cas d'infections, d'affections des voies respiratoires et des voies urinaires. Immuno-stimulant

Bruyère Foncé et corsé	Renforce les défenses immunitaires en cas de fatigue et de convalescence; indiqué en cas de problèmes rénaux et vésicaux.
Châtaignier Foncé et corsé, fort en arôme	Stimule la circulation; indiqué en cas d'anémie et d'inflammations des reins et de la vessie.
Trèfle Clair et doux	Calmant et relaxant.
Lavande Clair et aromatique	Convient bien au traitement des blessures, des brûlures et des piqûres; indiqué en cas d'affections des voies respiratoires, de migraines et d'états dépressifs.
Tilleul corsé et aromatique	Stimule la transpiration, diurétique, soulage l'irritation, stimule l'appétit; indiqué en cas de refroidissement, de toux, d'inflammation des sinus, de maux de tête, d'insomnies et d'angoisse.
Dent-de-lion Jaune doré, corsé et aromatique	Nettoie le sang; indiqué en cas d'affections de l'estomac, des reins, du foie et de la bile; en cas d'inflammations des reins et de la vessie.
Fleurs d'oranger Clair et doux	Indiqué en cas de troubles de la digestion et du sommeil.
Colza Clair et doux	Calmant, équilibrant et relaxant.
Romarin Clair et doux	Indiqué en cas d'insuffisance hépatique et circulatoire; en cas de troubles de la digestion, de la bile et du foie.
Tournesol jaune doré, doux	Spasmolytique en cas d'asthme, de coliques stomacales et intestinales.
Sapin Foncé et corsé	Indiqué en cas d'affections des voies respiratoires.
Thym Foncé et corsé	Indiqué en cas d'affections des voies respiratoires.

I.6.1 Effets biologiques des composés phénoliques du miel

La composition du miel en composés phénoliques lui confère des propriétés antimicrobiennes, notamment des bactéricides et bactériostatiques, des virucides et des antiparasites, antioxydants, anti tumoral et antimutagènes et des différentes effets sur la santé (**Kwakman *et al.* 2010**).

I.6.1.1 Effets antimicrobiens, antiviraux et antiparasitaires

Avec l'augmentation de la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques, le miel est de plus en plus apprécié pour son activité antibactérienne. On ne connaît pas encore précisément toutes les composantes antibactériennes du miel et ses vertus curatives constituent partiellement une énigme (**Kwakman *et al.* 2010**).

Les principaux facteurs de cette activité microbienne sont divers.

- **a. L'osmolarité**

Elle est la conséquence de la forte teneur en sucre du miel. Le miel agit donc de manière osmotique, en provoquant une forte déshydratation des germes qui n'ont plus alors suffisamment d'eau pour survivre. (**Rossant, 2011**)

- **b. Le système peroxyde d'hydrogène (inhibine)**

La principale « inhibine » que contient le miel est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) encore appelé eau oxygénée. C'est un très bon antiseptique. Il est produit 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 :

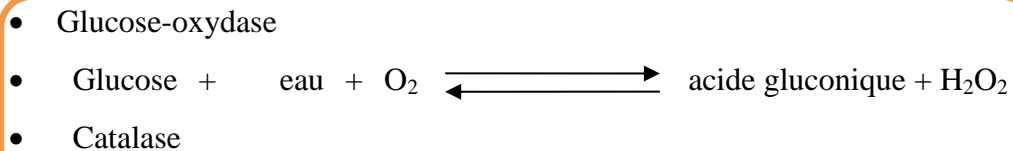


Figure 02 : Réaction enzymatique de glucose-oxydase (**Descottes, 2009**).

L'acide gluconique formé accroît l'acidité du miel et le rend peu favorable au développement de colonies bactériennes (**Descottes, 2009**).

- **d. La défensine-1**

Il s'agit d'une protéine fabriquée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles. Elle est retrouvée dans le miel et la gelée royale. Chez l'homme, les défensines constituent une famille de peptides

antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité spécifique, ou innée (Kwakman *et al.*, 2010).

1.6.1.2 Effets anti tumoraux et antimutagènes

Dans notre vie quotidienne, nous sommes en permanence au contact de composés dangereux et toxiques. Certains de ces composés dit tumoraux, participent au développement et à la prolifération anarchique des cellules, pour aboutir au cancer. Ces composés mutagènes attaqueront le code génétique, ce qui peut entraîner des mutations dangereuses voire létales pour l'organisme.

Le miel montre des propriétés anti-cancéreuses. Les composés du miel limitent la prolifération des cellules cancéreuses mais également, leur propagation par voie sanguine ou lymphatique. Egalement prouvé, le miel lutte efficacement contre le cancer de la vessie (Anos, 2012) .

I.7 L'activité antioxydante du miel

Les antioxydants sont des substances qui, présentes à faible concentration, sont capables de supprimer, retarder ou ralentir le processus d'oxydation et ses conséquences (Genot *et al.*, 2004).

En règle générale, les miels foncés et les miels ayant une forte teneur en eau ont une capacité anti-oxydante plus grande que celle des autres miels. De plus, l'activité anti-oxydante des miels est très variable d'un miel à un autre, et elle dépend essentiellement de son origine botanique (Rossant, 2011).

I.8 Effets antioxydants

Les antioxydants présents dans le miel sont : les oxydases du glucose, les catalases, l'acide ascorbique, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les caroténoïdes, les acides organiques, les acides aminés et protéines (Anos, 2012). L'action des antioxydants consiste à neutraliser les radicaux libres, molécules hautement réactives causant des dommages importants aux protéines, à l'ADN et aux membranes cellulaires (Tomczak ., 2010).

I.9 Stress oxydant cellulaire

Les molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives à l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont

cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (**Boubekri, 2014**).

I.9.1 Les espèces réactives d'oxygène (ERO)

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (**Bartosz, 2003**), (**Halliwell et al, 2004**) (**Tableau 05**).

Tableau 05 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (**Bartosz, 2003**).

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	1O_2
Peroxydinitrite	$ONOO^-$

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes (**Lehucher-Michel et al, 2001**). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (**Koechlin-Ramonatxo C., 2006**).

I.9.2 Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 4). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et non enzymatiques. (Goudable et Favier, 1997)

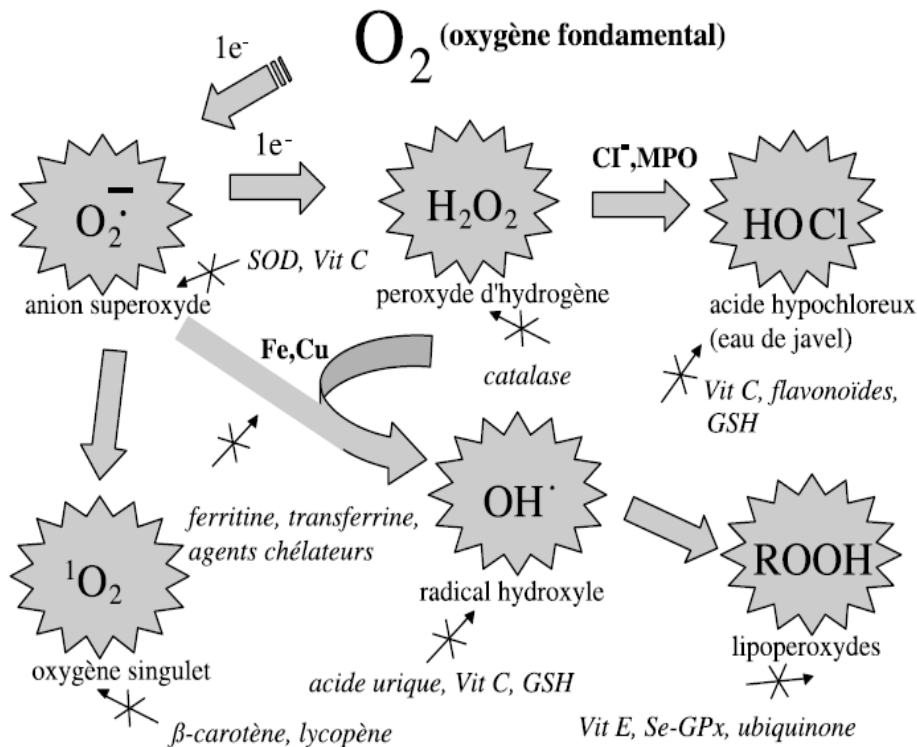


Figure 03 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et al., 2002).

I.10 Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène (**Apak, R. et al, 2007**)

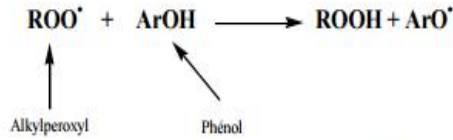


Figure 04 : Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène.

Le radical formé devient moins dangereux (**Apak .et al 2007**)

Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupements hydroxyles des composés phénoliques sont des donateurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les ERO et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants (**Tsao.,(2010)., Pereira ., 2009**).

1.11 Activité antioxydante des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent une forte activité antioxydante qu'est le principe de plusieurs activités biologiques douées par ces molécules .L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, pour les flavonoïdes, ce mécanisme est lié à leur structure et de l'arrangement des groupements hydroxyles (**Djemai Zoughlache., (2008)**).

Des études faites sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois 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 double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo ;
- La présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (figure 05). (Djemai Zoughlache S.(2008).)

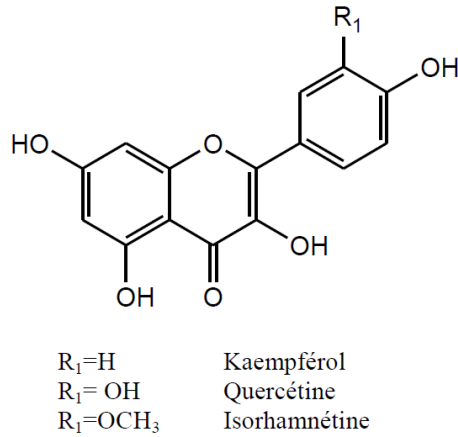


Figure 05 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Marfak, 2003).

I.12 Activités antioxydantes du miel

De nombreux auteurs ont démontré que le miel est une source d'antioxydants naturels, qui sont efficaces pour réduire le risque des maladies cardiaques, le cancer, le déclin du système immunitaire ainsi que différents processus inflammatoires. Les facteurs qui contribuent à l'activité antioxydante du miel sont lysozyme, des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les flavonoïdes contenus dans le miel sont divisés en trois classes avec structure semblable: flavonols, les flavones et flavonols en fonction de leur structure chimique. Ceux-ci sont importants en raison de leur contribution à la couleur de miel, le goût et la saveur et aussi en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé. Ils sont prouvés qu'il y a une forte corrélation entre la teneur du miel en composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Les miels sont riches en flavonoïdes. Ce sont des pigments présents dans les végétaux et qui constituent une protection contre les rayons ultra-violet et la photooxydation. Ils sont aussi protecteurs vis-à-vis des radicaux libres. Il existe un lien entre la couleur et le pouvoir antioxydant d'un miel: plus ce dernier est foncé, plus il contient de pigments protecteurs.

La quercétine est un des plus représentatifs flavonoïdes dans le miel. La meilleure propriété décrite de la quercétine est sa capacité d'agir comme anti-oxydant. Ce

composé, semble être le plus puissant flavonoïde pour la protection du corps contre les ERO (Ahmed M. et al., (2012)).

I.13 Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydant, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH⁺ (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) etc. Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires. (Georgieva et al., 2010).

I.13. a Test au DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois., 1958; Brand-Williams- et al., 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 07) Popovici et al., 2009).

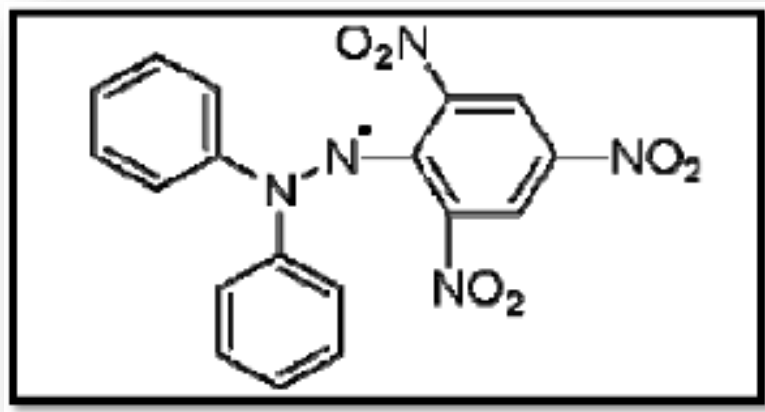


Figure 06 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (Popovici et al., 2009)

Principe

La réduction du radical libre DPPH[°] (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants 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 (Figure 08)(Maataoui.*et al.* ,2006)

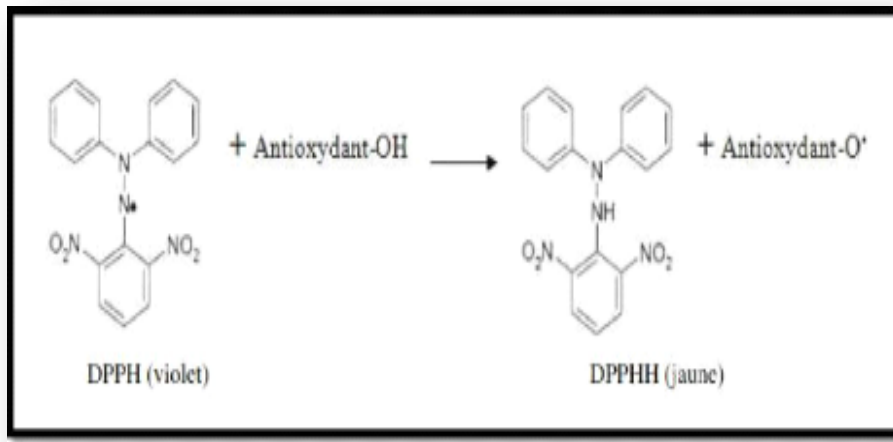


Figure 07 : Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Congo., 2012)

I.13. bTest de la reduction du fer FRAP(Ferric reducing-antioxidant power)

Principe

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par OYAIZ (1986) (Bougandoura N, 2013). La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu selon la figure 09. (OU *et al.*, 2001)

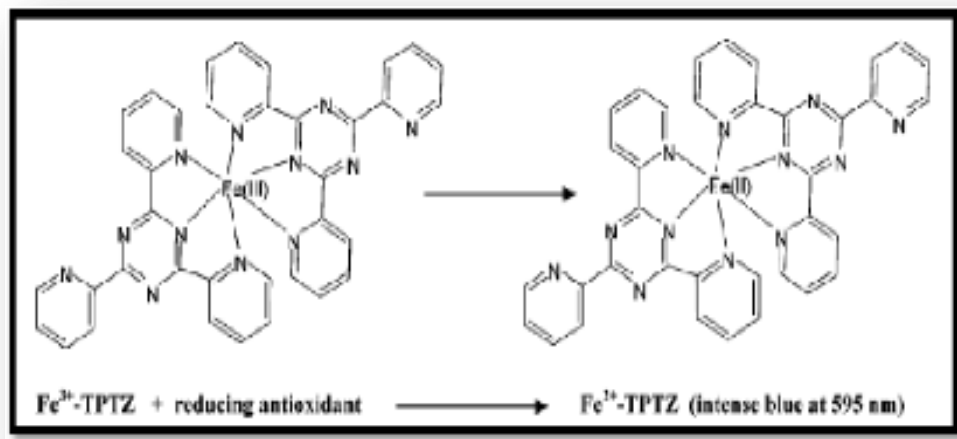


Figure 08 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (**Prior et al.**, 2005).

I.13. c Méthode de TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)

Principe

Cette méthode est basée sur la protection fournie par les antioxydants sur la décroissance de la fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE) au cours d'une réaction de peroxydation contrôlée. La fluorescence de R-phycoérythrine est désactivée par ABAP (2,2' - azo-bis (2 - amidino- propane) de chlorhydrate en tant que générateur de radicaux. Ce stoppage de la réaction est mesuré en présence d'antioxydants. Le potentiel antioxydant est évalué en mesurant la décroissance de la décoloration selon **(Nur Alam et al., 2013)**

I.13.d Test ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Principe

La mesure ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet de déterminer si une source organique possède un effet antioxydant en le comparant à un analogue de la vitamine E : le trolox. Dans cet essai, l'AAPH (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) est utilisé comme source génératrice de radicaux peroxydes. L'addition de fluorescéine comme sonde fluorescente permet de quantifier, à l'aide d'une analyse spectrophotométrique, en fonction du temps, la perte de fluorescence associée à la réaction avec les radicaux libres fournis par l'AAPH par un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène. La présence d'antioxydants empêche ou ralentit la perte de fluorescence qui est calculée par l'aire sous la courbe en fonction du temps. Celle-ci peut être détectée à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm. Il s'agit donc d'une méthode permettant de mesurer la capacité antioxydant contre les radicaux peroxydes (OU et al., 2001). Lorsqu'un capteur de radicaux libres est incorporé dans le milieu, les radicaux libres sont captés, et la fluorescence persiste, donnant ainsi une idée précise du pouvoir anti-radical libre, donc antioxydant de l'échantillon. **(Rolland, 2004)**

Chapitre II : Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériels

Notre travail est basé sur l'étude de l'activité antioxydante du miel, six variétés différentes ont été utilisées. Celles-ci ont été collectées en 2015 de différentes régions du territoire Algérien (tableau 07).

Tableau 07 : Description des échantillons du miel utilisés dans notre étude. (Hafassi.A, 2016)

Echantillon	Région	Année de récolte
Montagne	Aflou	2015
Thym	Biskra	2015
jujubie	Hassi Rmel	2015
Lavande	Tizi-Ouzou	2015
Multi fleur	Blida	2015
Eucalyptus	Constantine	2015



Figure 09 : Photos illustrant les échantillons de miel utilisés dans cette étude. (Hafassi.A, 2016)

II.2 Extraction des composés phénoliques du miel

Nous avons réalisé notre travail au laboratoire de recherche scientifique de science fondamentale de l'Université Amar Thlidji de Laghouat.

Pour l'extraction des composés phénoliques de nos échantillons de miel (montagne, lavande, thym, eucalyptus, jujubier, multi-fleure), nous avons choisi deux méthodes d'extraction.

II.2.1 La macération à froid

Cette méthode consiste à une extraction solide-liquide, une procédure couramment utilisée pour l'extraction des polyphénols du miel. Deux solvants ont été utilisés dans cette étape : le méthanol et l'éthanol, les deux qualifiés par leur forte polarité.

II.2.1.1 Protocole expérimental

Une quantité de 50 g de chaque type du miel est macérée dans 200 ml de méthanol ou d'éthanol absolu avec agitation pendant 24h à température ambiante. Après filtration, l'extrait obtenu est ensuite concentré par évaporation rotative dans un Rotavapeur (BÜCHI), la figure 10. Illustre les étapes suivies dans cette extraction.

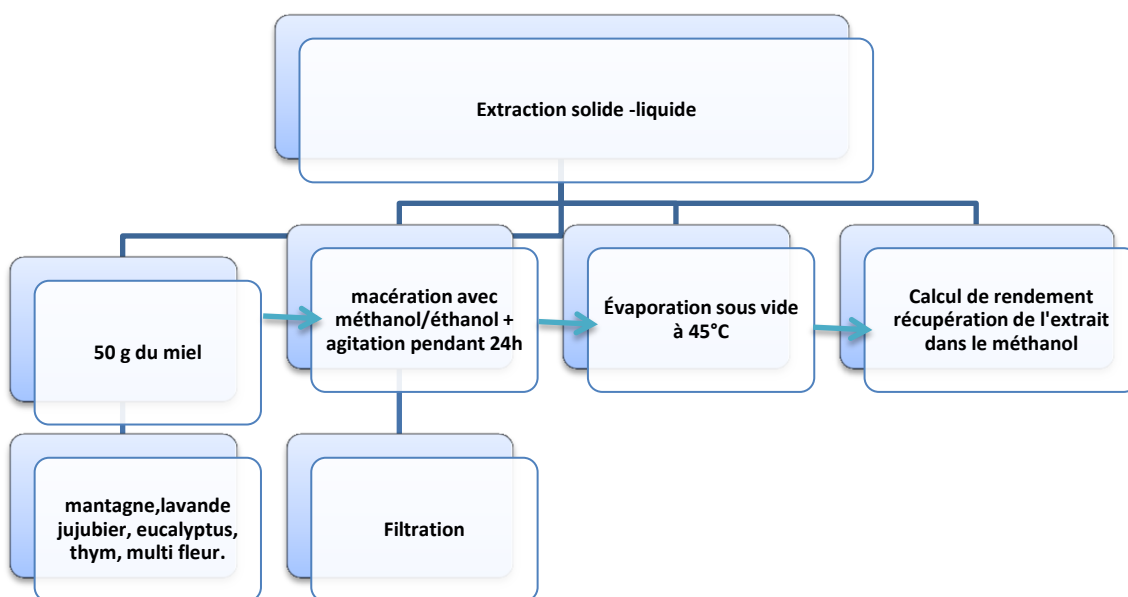


Figure 10 : Différentes étapes d'extraction solide-liquide au méthanol et éthanol.

II.2.2 Extraction liquide-liquide

II.2.2.1 Protocole expérimental

Une quantité 50 g de chaque type du miel est macéré dans un mélange (méthanol-eau) [80 :20 V/V] avec agitation pendant 24 heures. Après filtration et évaporation sous pression réduite à 45C⁰, la phase aqueuse restante a subit une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle capables d'extraire les composés

phénoliques. Les phases organiques obtenues sont déshydratées par le sulfate de sodium anhydre, filtrées puis évaporées pour obtenir les extraits d'acétate d'éthyle. Les résidus secs pesés sont repris dans 5 ml de méthanol et conservés à 4°C jusqu'à leurs utilisation. Les étapes d'extraction utilisées dans cette méthodes sont résumées ci-dessous (**Figure 11**).

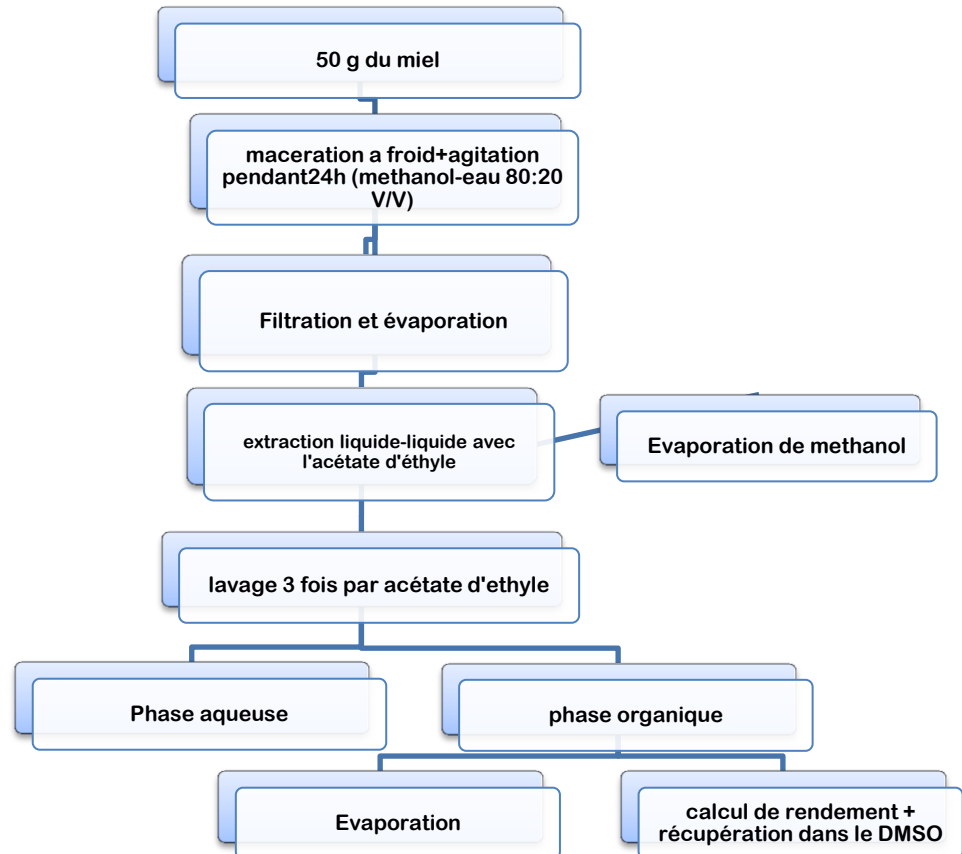


Figure 11 : Macération et extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle des différents types des miels

D'après l'extraction des miels par les deux méthodes on observe le changement des couleurs et aussi l'aspect de l'échantillon du miel.

II.3 Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est déterminé par rapport du poids de l'échantillon initial pour les différents échantillons des miels en appliquant les formules suivantes.

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{Pr}{Pm} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

Avec :

Pr : poids du résidu obtenu après extraction et évaporation

P_m : Poids de l'échantillon de miel utilisé pour l'extraction.

II.4 Analyse quantitatives des extraits du miels

II.4.1 Dosage des polyphénols

Le dosage des phénols totaux a été effectué avec le réactif commercial Folin-Denis selon la méthode citée par Folin et Denis en 1912 (Zhang et al., 2006). La teneur en phénols totaux est habituellement déterminée par spectrophotométrie UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀), lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite, dont l'absorption maximum est à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans nos extraits (Vuorela, 2005).

II.4.1.1 Protocole expérimentale

100 µl de chaque extrait [Lavande, multifleur et montagne dissous dans le méthanol] sont ajoutés à 500 µl de Folin Denis après 2 min, 2 ml de solution de carbonate de sodium sont ajoutés [Les expériences sont répétées 2 fois].

L'absorbance est mesurée à 760 nm après 30 min d'incubation. Les concentrations sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide gallique (0.03-0.3 g/l) et sont exprimées en milligramme par gramme d'extrait.

II.5 Dosage des Flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes ont été mesurées par une méthode adaptée de Lamaison et Carnat 1991 en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) comme réactif qui a la capacité de se complexer avec les oxygènes des groupements hydroxyles des flavonoïdes, produisant ainsi un complexe de couleur jaune, dont l'absorbance maximale est enregistrée à 409 nm.

II.5.1 Protocole expérimentale

Un volume de 500 µl de chaque dilution d'extrait de miel est ajoutés à 500 µl d'une solution méthanolique de AlCl₃ (1%), après une incubation de 20min de tous les extraits, l'absorbance est lue à 409 nm. chaque expérience est répétée deux fois.

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercitrine (0,005-0,05g/l) et sont exprimées en milligramme par gramme d'extrait.

II.6 Evaluation de l'activité antioxydante

II.6.1 Test de DPPH

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune. (Maataoui B S et al., 2006).

II.6.1.1 Protocole expérimentale

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0,0098mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, différentes concentrations de solutions échantillons et témoin sont ajoutées à 1ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

Le paramètre EC₅₀ défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH a été calculé pour chaque extrait. Les valeurs d'EC₅₀ qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Le pouvoir d'inhibition est exprimé en % et déterminé en appliquant la formule suivante (Mansouri et al, 2005).

$$\text{d'activité antioxydante \%} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100 \quad (\text{II.2})$$

Chapitre III : Résultats et discussions

III Résultats et discussion

III.1 Rendement des extractions

Les valeurs des rendements obtenus pour chaque extrait par les trois méthodes d'extraction sont consignées dans le Tableau (08) avec l'aspect et la couleur de chaque extrait.

Tableau 08 : Le rendement, l'aspect et la couleur des extraits phénoliques de miel obtenus de chaque méthode d'extraction.

Echantillon		Le rendement (%)	La couleur	L'aspect
Les extraits d'acétates d'éthyles	Montagne	0,096	Jaune	Patte
	Eucalyptus	0,22	Jaune pale	Patte
	Thym	0,318	Jaune claire	Patte
	Multi fleur	0,067	Marron	Visqueux
	Lavande	2,02	marron claire	Visqueux
	Jujubier	0,072	Vertes	Visqueux
Les extraits méthanoliques	Montagne	97,82	Brune foncé	Visqueux
	Thym	97,58	Brune foncé	Visqueux
	Multi fleur	97,86	Brune claire	Visqueux
	Lavande	97,98	Brune claire	Visqueux
	Jujubier	98 ;82	Brune foncé	Visqueux
	Montagne	97,82	Brune foncé	Visqueux
	Eucalyptus	98,35	Brune foncé	Visqueux
Les extraits éthanoliques	Montagne	25,18	Une belle couleur jaune	Patte
	Eucalyptus	45,83	Brune	Visqueux
	Thym	39,7	Brune	Visqueux
	Multi fleur	42,60	Brune	Visqueux
	Lavande	20,01	Une belle couleur blanchâtre	Patte
	Jujubier	37,83	Brune	Visqueux

Comme mentionné sur le tableau (08), nous observons, que le miel de lavande a donné les meilleurs rendements d'extraction (2,52%) Suivis du miel de thym (0,318%).les faibles rendement d'extractions reviennent aux miels du jujubier sauvage (0 ,072%) et des miels de multi-fleur (0,067%).

Les rendements d'extraction méthanoliques des différents types des miels étudiés (tableau 08), montrent que l'extraction par le méthanol a donné des rendements d'extraction allant jusqu'à 98%. Pour les extractions éthanoliques, les résultats montrent que le miel d'eucalyptus a le meilleur rendement (45,23%) suivis des miels de multi-fleur (42,60%), le thym (39,7%), jujubier (37,83%), le miel de montagne (25 ,18%) cependant les faibles rendements d'extraction reviennent aux miels de lavande (20,01%) .

Nous avons obtenu de très faible rendement pour les extraits d'acétate d'éthyle, ceci, pourrait être expliqué par la diversité structurale responsable de grande variabilité des propriétés physicochimiques influençant l'extraction des polyphénols. Ainsi, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant .

L'éthanol reste le meilleur solvant d'extraction, la macération semble être meilleure pour l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes (**Mahmoudi et al.,2013**).

L'éthanol possède l'avantage d'être moins toxique par rapport au méthanol aussi d'être plus facilement éliminé sous vide, il évite l'extraction de la cire qui se trouve mélangée. (**Ribéreau et al., 1968**).

Les travaux de Helilou et al.,2015 sur les extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle de différentes variétés de miel en particulier : multifleurs, d'eucalyptus (85,465%)et de montagne(82,238%) ont conduit à des rendements similaires à ceux obtenus par nos échantillons de miel.

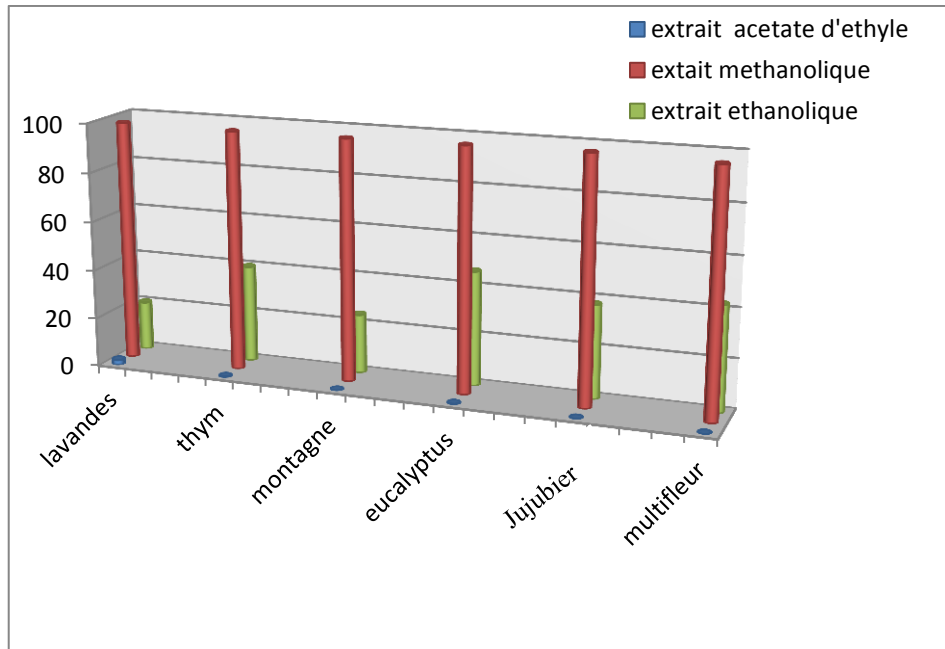


Figure 12 : Les rendements des divers extraits du miel

III.2 Dosage des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de miel a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en grammes équivalent acide gallique par gramme de miel (gEAG/g) pour les trois méthodes d'extractions (Tableau 09 et Figure 14).

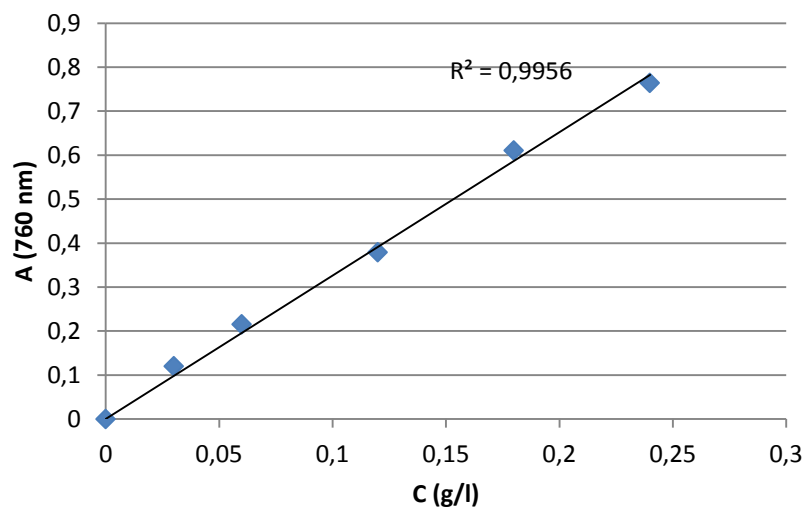


Figure 13 : Courbe d'étalonnage représentant de l'acide gallique

Tableau 09: Les teneurs en phénols totaux des différents extraits obtenus des variétés de miel choisies dans cette étude.

Phénols totaux ($\mu\text{gEAG/g}$)			
Échantillons du miel	Ac-Et	Eta-OH	Me-OH
Lavande	11,88\pm1,202	48,5\pm10,606	11,38\pm0,593
Montagne	17,08\pm1,405	99,666\pm20,84	30,15\pm4,454
Jujubier	12,646\pm1,280	513\pm40,951	230,566\pm15,409
Thym	29,966\pm5,353	763,333\pm116,328	81\pm15,556
multifleures	25,5\pm1,212	300\pm26,286	14,515\pm0,586
eucalyptus	36,666\pm12,227	585\pm77.781	528\pm4,242

D'après le tableau ci-dessus, nous remarquons que les teneurs en phénol totaux des extraits méthanoliques de miel présentent des valeurs variables dont l'eucalyptus et jujubier ont des taux les plus élevés (528 $\mu\text{gEAG/g}$) et (230,56 $\mu\text{gEAG/g}$) respectivement. Par contre, celui de la lavande a le taux le plus faible (11.38 $\mu\text{gEAG/g}$). En ce qui concerne les extraits éthanoliques, nous observons que ceux-ci présentent les teneurs en phénols totaux les plus élevées par rapport aux extraits méthanoliques et d'acétate d'éthyle. La valeur la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait de thym (763,33 $\mu\text{gEAG/g}$).

Les extraits d'acétate d'éthyle, montrent les plus faibles teneurs en phénols totaux, la valeur la plus importante est celle du miel d'eucalyptus (36,666 $\mu\text{gEAG/g}$).

D'après les résultats du dosage nous remarquons que malgré que la macération par le méthanol donne des rendements plus élevés, l'utilisation de l'éthanol comme solvant donne des teneurs en phénol totaux plus élevées.

Des constatations similaires ont été obtenues par Bertoncej et *al.*, (2007), qui ont montré que les valeurs du contenu phénolique total de certains extraits des miels Slovènes (Le miel d'acacia, miel de châtaignier, miel multi floral, Le miel de forêt) varie entre 44,8-233,9 $\mu\text{gEAG/g}$. Ainsi, les études de Jose et *al.*, (2010), déterminent des valeurs des phénols totaux variées entre 213-347,6 $\mu\text{g GAE/g}$ pour des Cinq miels monofloral de la Cuba.

Nous constatons que nos résultats sont similaires aussi à ceux mentionnés par Amiot et *al.*, (1989) sur huit miels d'origine florales différentes varie entre (58-960 $\mu\text{g GAE/g}$).

III.3 Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits du miel étudiés ont été calculées et exprimées en microgrammes équivalent quercétine par gramme de miel (Tableau 10. et figure 15).

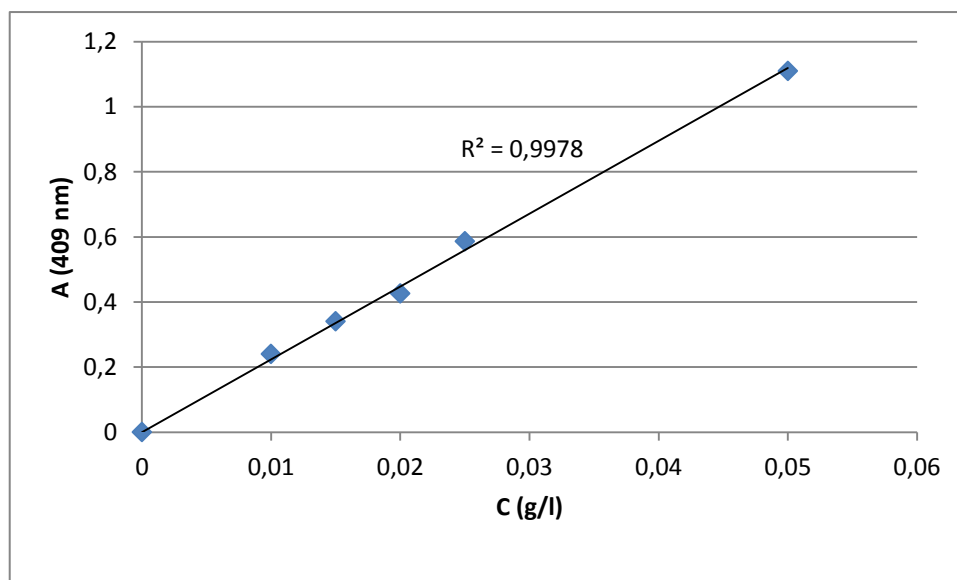


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Tableau 10 : La teneur en flavonoïdes des extraits obtenus de nos différents échantillons de miel. Flavonoïdes ($\mu\text{gEQ/g}$)

Échantillons du miel	Ac-Et	Eta-OH	Me-OH
Lavande	5,58±1,542	7,1±0,565	5,333±2,672
Montagne	1,8675±0,484	35,935±	9,716±1,189

jujubier	4,41±1,243	43,65±8,414	65,633±4,990
Thym	9,512±2,005	69,55±2,050	70,8±10,305
Multifleures	4,357±1,827	22,25±1,343	8,155±1,059
Eucalyptus	7,97±1,831	55,7±30,122	39,033±4,823

En analysant les résultats de Tableau 10. Nous remarquons que les teneurs en Flavonoïdes des extraits d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'éthanol varient entre (1,86 à 9,51), (5,33 à 70,8µgEQ/g) et de (7,1 à 46,866 µgEQ/g) respectivement.

Ainsi, nous observons que l'extrait d'acétate d'éthyle issu du miel de thym contient une teneur élevée en flavonoïdes par rapport à son rendement qu'est faible de (0,318 %).

Pour les extraits méthanoliques et éthanoliques nous constatons que les teneurs en flavonoïdes sont proches pour tous les extraits malgré que les extraits méthanoliques ont présenté des rendements plus élevés. En générale, les extraits du thym présentent des teneurs élevées en flavonoïdes dans les trois méthodes d'extraction 9,512 ; 70,8 et 69,55 µgEQ/g. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Meda et *al.*, (2004), sur différentes variétés de miels multif floraux et monofloraux (3,7 à 61,4 µgEQ/g).

Les flavonoïdes sont reconnus par leurs fortes activités biologiques comme piègeurs de radicaux (**Saba et al, 2011**). L'intérêt récent pour ces substances a été stimulé par ces avantages potentiels pour la santé découlant de leurs activités antioxydantes et contre les maladies coronariennes ainsi que le cancer (**Saba et al, 2011**).

Les miels choisis pour notre étude sont caractérisé par un taux élevé en composés phénoliques, ce qui laisse à envisager leur capacité antioxydante.

III.4 Résultats du pouvoir antioxydant du radical libre DPPH

Les valeurs des pourcentages d'inhibition obtenues (I% de chaque extrait), nous ont permis de tracer les graphes illustrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction

de la concentration en composés phénoliques issus de l'extraction par le méthanol, éthanol et l'acétate d'éthyle.

Les Figures 15 et 16 représentent la variation des pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations en $\mu\text{g/ml}$ des deux antioxydants standards choisis pour cette étude à savoir, la vitamine C et vitamine E. Les valeurs obtenues (I% de chaque extrait), nous ont permis de tracer les graphes illustrant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en extraits phénoliques issus de l'extraction au méthanol et éthanol et l'acétate d'éthyle.

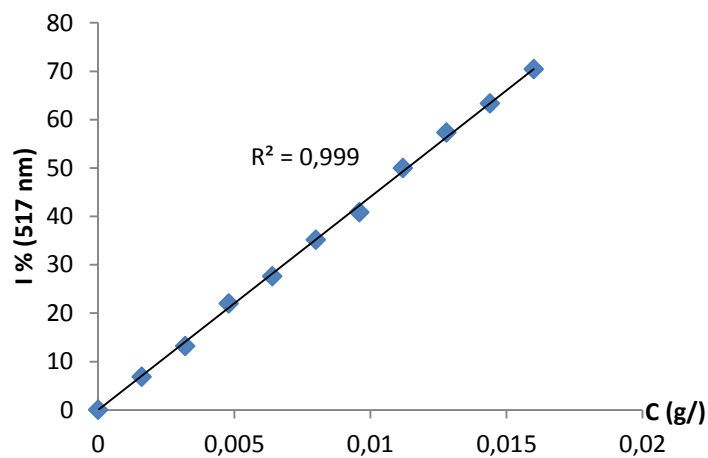


Figure 15 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations vitamine C

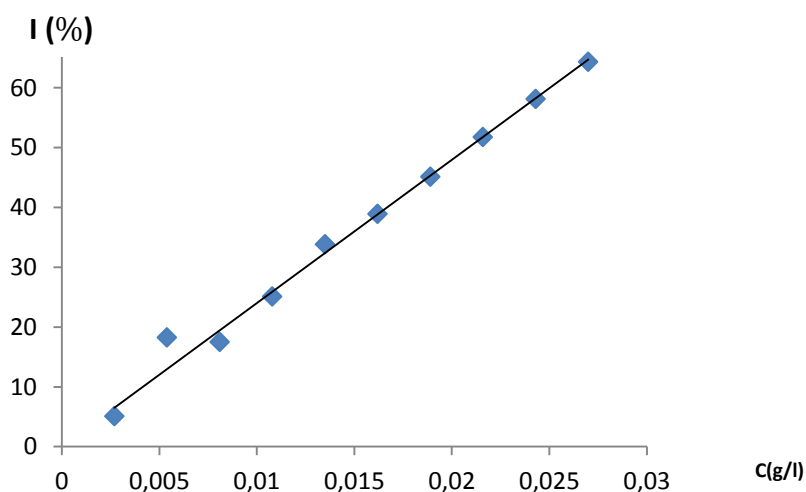
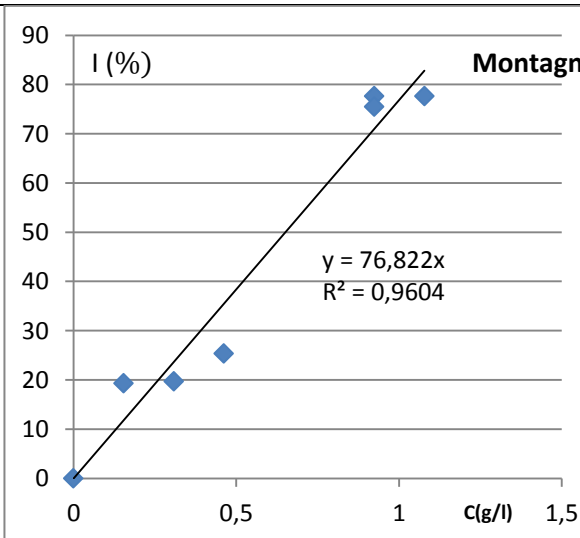
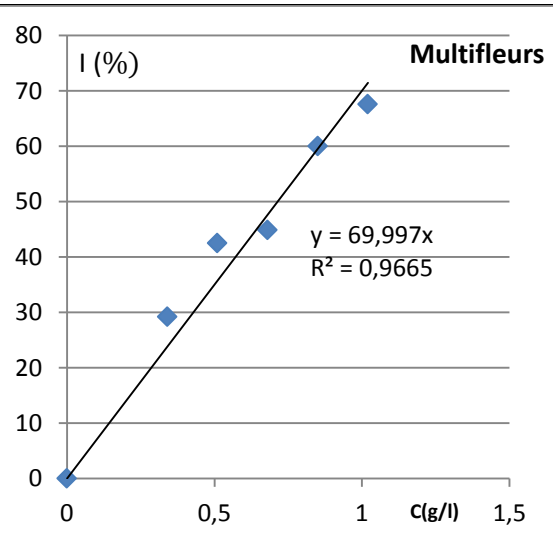
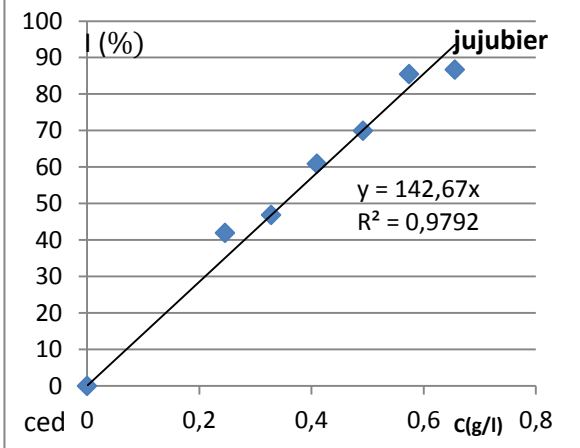
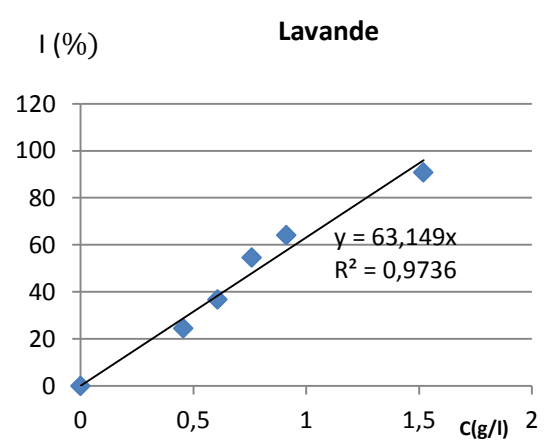
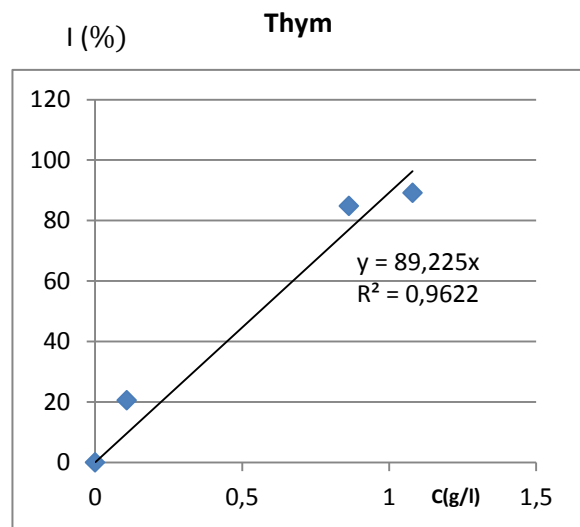
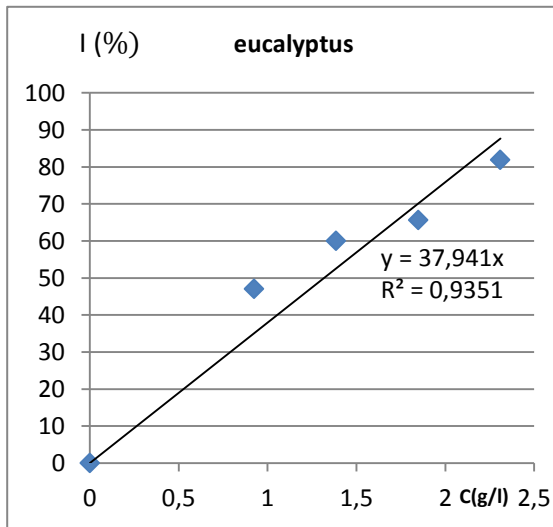
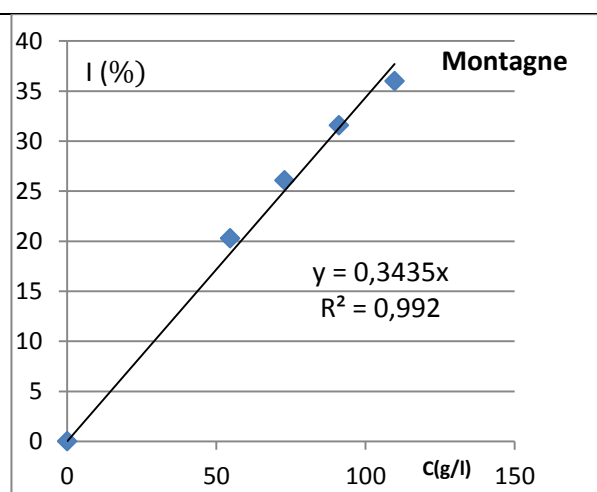
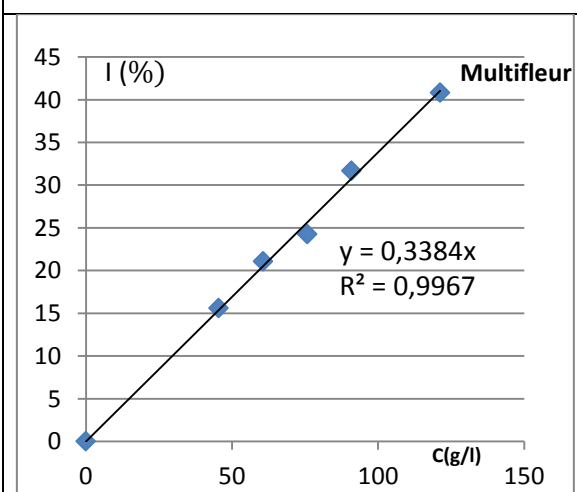
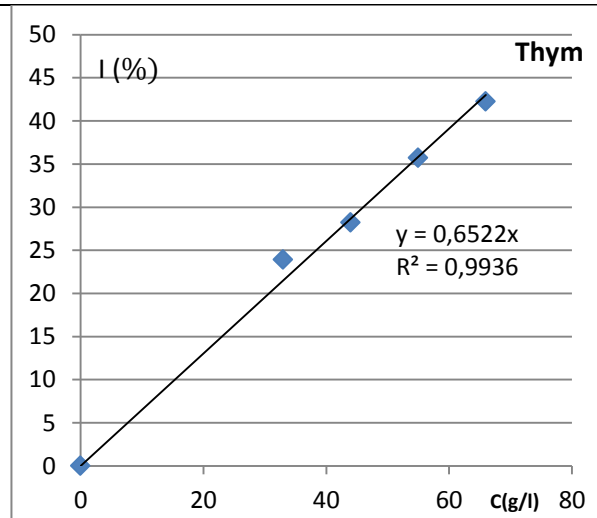
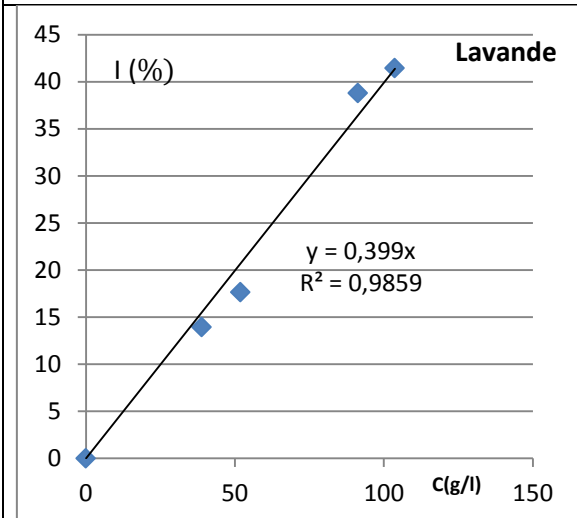
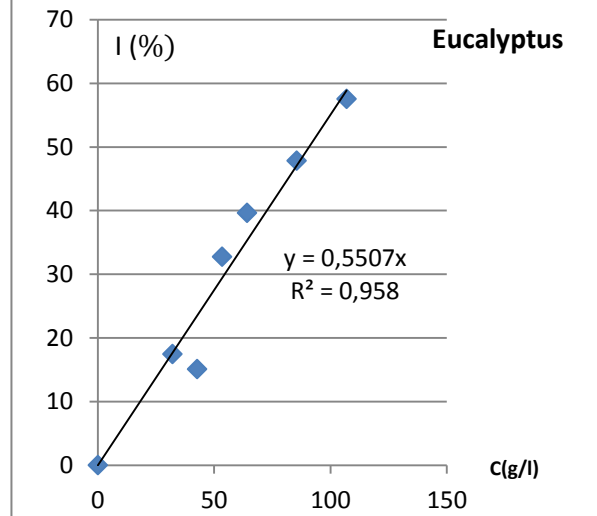
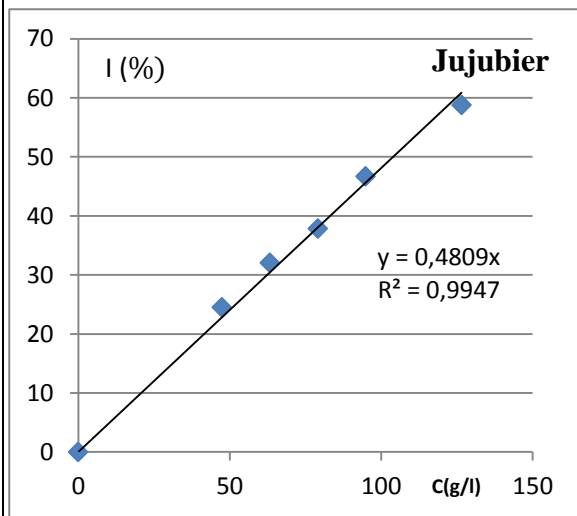


Figure 16 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations vitamine E.

Extraits acétate d'éthyle



Extraits methanolique



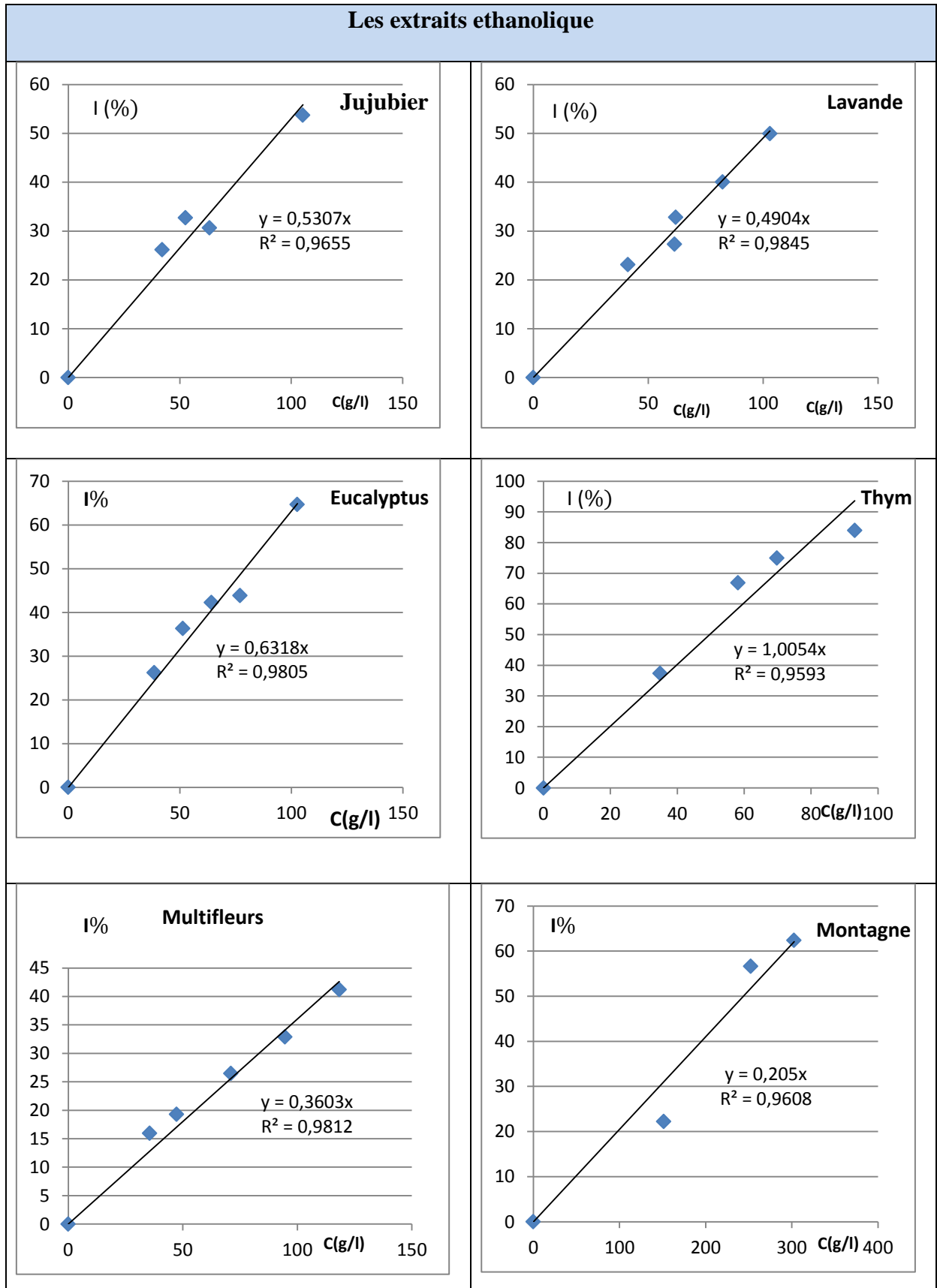


Figure 17 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration en composés phénoliques.

Les résultats exprimés en EC₅₀ (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH) qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de EC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici et al. 2009). De même, nous avons calculé les EC 50 de la vitamine C et de vitamine E choisis comme antioxydants standard dans ce test (Tableau 12)

Tableau 11 : Les valeurs d'EC₅₀ en (mg/ml) des différents extraits méthanoliques éthanolique et d'acétate d'éthyle

extrait	Acetate éthyle	Extrait méthanolique	Ethnolique
eucalyptus	1,401±0,411	88,621±19,218	79,138±10,167
Thym	0,485±0,195	76,663± 1,261	49,731±11.996
montagne	0,65± 0,141	145,56±24,393	52,039±46,654
lavande	0,845± 0,043	125.313±14.973	101,957±5,623
Jujubier	0,350±0,0376	103,972±5,446	94.215±9,928
multifleur	0,769± 0,214	147,754±34,612	138,773±24.312

Tableau 12 : Les valeurs d'EC₅₀ en (mg/ ml) des antioxydants standards

Antioxydants standard	EC 50 « mg/mL »
Vitamine C	0,011±0,002
Vitamine E	0,0208±±0,0006

Les valeurs d'EC₅₀ des extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction varient globalement entre 0,35 et 145,56 g/ml.

Les valeurs d'EC₅₀ des extraits d'acétate d'éthyle varient entre 0,35 et 1,40g/ml et entre 76.66 et 147.75g/ml pour les extraits méthanoliques ; 49,731 et 49,731 g/ml pour les extraits éthanoliques donc, nous remarquons que les valeurs d'EC₅₀ les plus faibles ont été obtenues dans les extraits d'acétate d'éthyle par rapport aux extraits méthanoliques et éthanoliques.

Pour les extraits d'acétate d'éthyle, la valeur plus élevée d'EC₅₀ était de 1,401g/ml pour l'échantillon du miel d'eucalyptus par contre la valeur la plus faible était de 0,35 g/ml pour l'extrait du miel jujubier cela confirme la possibilité qu'il contient la plus grande quantité des composés accepteurs de radicaux libres et le plus grand potentiel antioxydant (**Beretta et al., 2005**). Nos extraits d'acétate d'éthyle ont prouvé leur fort pouvoir antioxydant par le test du DPPH.

Selon plusieurs auteurs, le contenu phénolique de plusieurs miels est fortement corrélé avec son activité antioxydante (**Beretta et al, 2005**; **Bertoncelj et al, 2007**, **Meda et al., 2005**), ce qui peut être utilisé comme un paramètre fiable pour indiquer les activités antioxydantes dans le miel (**Beretta et al, 2005**; **Bertoncelj et al, 2007**, **Meda et al, 2005**).

D'après les résultats obtenus dans le dosage des phénols totaux, nous pouvons constater que nos extraits d'acétate d'éthyle malgré qu'ils sont moins riches en phénols totaux par rapport aux extraits méthanoliques et éthanoliques leurs capacité anti radicalaire est nettement plus élevée.

En comparant nos résultats avec les études menées par Meda et al, (2004), sur l'activité de piégeage des radicaux DPPH sur 27 variétés du miels de Burkina-Faso (IC₅₀ varies entre 1,37-29,13mg/g) et d'après les travaux des Escuredo et al, (2013) sur des extrais des miels européens (IC₅₀ varies entre 8.6-17.8mg/g). Nos extraits d'acétate d'éthyle ont prouvé leur fort pouvoir antioxydant par rapport à celles des miels de Burkina Fasan ; et certains miels européens.

L'activité de piégeage des radicaux DPPH par nos extraits de miel testés varie en fonction du type de miel utilisé, en raison de la complexité de la composition chimique qui dépend de l'origine florale, les facteurs environnementaux et les conditions de stockage,

Dans le miel, les composants responsables de l'effet antioxydant sont les flavonoïdes et les acides phénoliques. La quantité de ces composants varie largement en fonction de

l'origine florale et géographique du miel. En outre, la transformation, la manutention et le stockage du miel peuvent influencer sur sa composition. Il existe une relation étroite entre la concentration en composés phénolique du miel et origine des espèces végétales visitées par l'abeille (**Gheldof et al., 2002**).

D'après l'étude de corrélation entre les différents EC₅₀ et le contenu en phénols totaux des extraits méthanoliques, éthanoliques et d'acétate d'éthyle. Dans les figures ci-dessous (Figure 18-20) nous remarquons qu'il y a une corrélation positive uniquement entre les valeurs d'EC₅₀ et phénols totaux des extraits d'acétate d'éthyle. (R=0,58). Les travaux de Sudhanshu et al, (2009) sur les variétés des miel indiens ont conduit à un coefficient de corrélation (R=0.5) similaires à ceux obtenus par nos des extraits d'acétate d'éthyle. D'une manière générale toutes les figures montrent une faible corrélation entre d'EC₅₀ et phénols totaux, Ricet al.,(1996) ont indiqué que les composés phénoliques ne possèdent pas la même activité antioxydante par conséquent, ce n'est pas la quantité, mais la qualité des polyphénols, qui sert de déterminer la capacité antioxydante des nourritures. Cela peut expliquer la corrélation négative observée entre la teneur en phénol totaux et EC₅₀ (activités antioxydants) des extraits méthanoïques et extraits éthanoïques (**Sudhanshu S et al., 2009**).

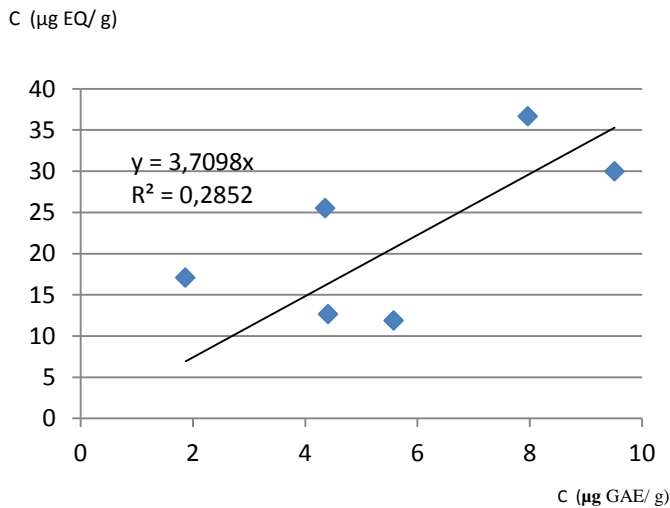
Marghitas et al (2009) ont utilisé le méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques du miel. Dans cette étude, aucune corrélation n'a été affichée entre la teneur en composés phénoliques et de l'activité anti-oxydante. En outre, Silva et al. 2006 a vérifié que les activités antioxydants ont été différentes pour chaque solvant testé (acétate d'éthyle > éthanol > hexane) et étaient pas clairement lié à leur teneur en composés phénoliques totaux.

Le contenu des flavonoïde dans notre étude, a cependant montré des corrélations faible (R 0,263) pour l'extrait acétate d'éthyle, et de bonne corrélation négative (R = -0,540) pour les extraits éthanoliques, et une corrélation moyenne pour les extraits méthanoliques (R= 0.405), ceci peut être expliqué en partie par la sous-estimation qui se produit lorsqu'on utilise la méthode de chlorure d'aluminium pour une quantification total des flavonoïdes (**Aline et al, 2005**).

D'autres auteurs ont également connu que seuls les flavonoïdes présentant une certaine structure moléculaire, en particulier ceux qui ont une certaine position hydroxyle, déterminera les propriétés antioxydantes. En général, ces propriétés dépendent de la

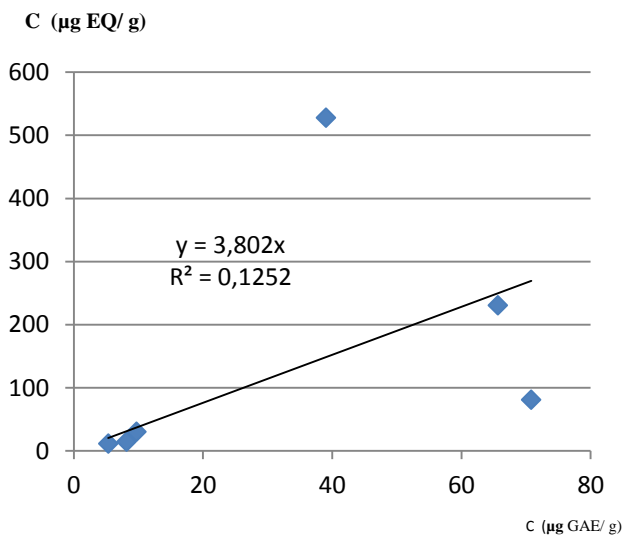
capacité de donner un atome d'hydrogène ou d'électrons à un radical libre. Les mêmes auteurs ont constaté que les flavonols avaient une corrélation plus élevée avec une activité anti radicalaire dans des extraits de plantes que flavonoïdes. (Aline et al, 2005).

Nous remarquons qu'il y a une corrélation positive uniquement entre les valeurs phénols totaux et flavonoïdes des extraits d'acétate d'éthyle.



Coefficient de corrélation Acétate d'éthyle- Phénols -flavonoïdes
 $R=0,66066072$

Figure 18 : Corrélation entre les phénols totaux et flavonoïdes extraits acétate d'éthyle



Coefficient de corrélation des extraits méthanolique Phénols - flavonoïdes
 $R=0,40574973$

Figure 19 : Corrélation entre les phénols totaux et flavonoïdes des extraits méthanolique

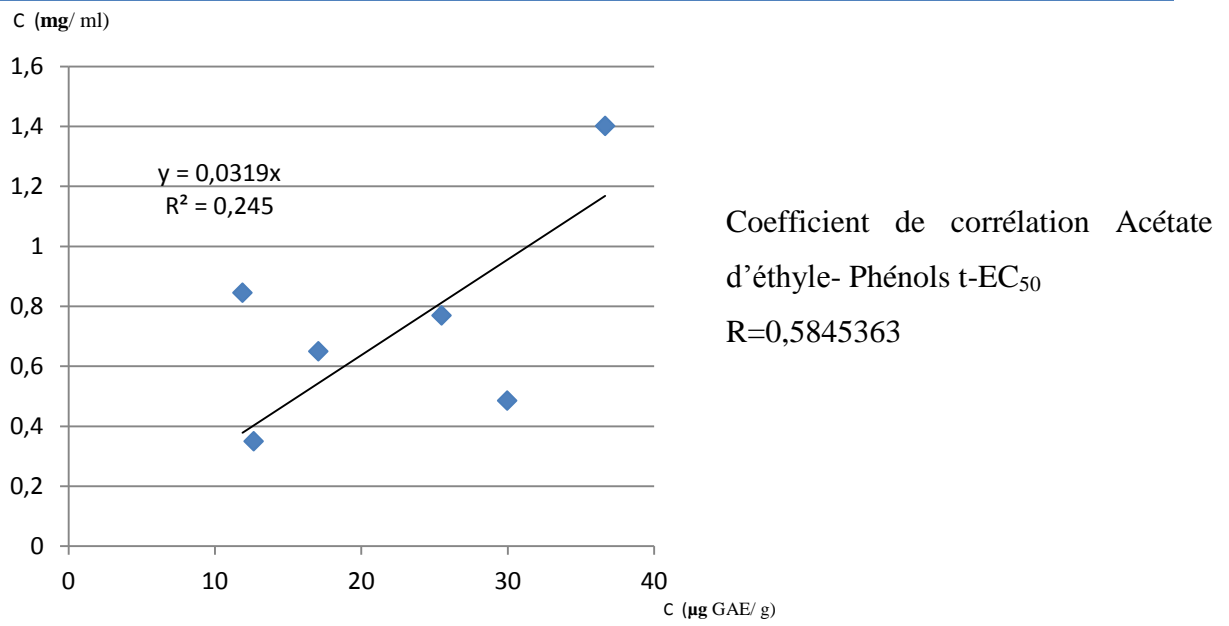


Figure 20 : Corrélation entre les phénols toutox-EC₅₀

Conclusion générale

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation du miel à des fins thérapeutiques a été réévaluée dans un cadre plus scientifique, et plusieurs propriétés ont été identifiées. Le miel frais affiche une activité antioxydante importante, semblable à de nombreux fruits et légumes. De ce fait, notre travail vise à évaluer l'activité antioxydante de différentes variétés de miel produit en Algérie.

En comparant nos résultats avec des travaux réalisés par plusieurs auteurs sur différents types de miel, nous pouvons conclure que nos échantillons ont des rendements différents en phénols totaux et en flavonoïdes qui varient selon les types de solvant utilisé avec une capacité antioxydante différente d'un extrait à l'autre. Le miel de jujubier ; représente le meilleur miel car sa capacité à piéger les radicaux libres testée par DPPH ($EC_{50} = 0,350$ mg/ml), son contenu en phénols totaux (12,64, 513, 23,57) et flavonoïdes sont élevés dans les trois extraits acétates d'éthyle ; éthanoliques et méthanoliques malgré son rendement qu'est très faible de 0,072% (extrait acétate d'éthyle).

Le miel de thym et d'eucalyptus sont aussi riches phénols totaux avec des teneurs qui varient entre 9,512 et 763,33 μ gEAG/ g et en flavonoïdes entre 7,97 et 39,03 μ g /g pour les trois types des extraits, Le miel de thym ayant une activité antioxydante moyennement élevée $EC_{50} = 0,485$ mg/ml.

Il est remarquable aussi, que l'extrait d'acétate d'éthyle issu du miel d'eucalyptus possède l'activité antioxydante la plus faible ($EC_{50} = 1,401$ mg/ml).

Nous avons constaté aussi que les valeurs d' EC_{50} les plus faibles ont été obtenues dans les extraits d'acétate d'éthyle par rapport aux extraits méthanoliques et éthanoliques.

Une bonne corrélation a été uniquement obtenue entre les activités antioxydantes testées au DPPH et les teneurs en phénols totaux des extraits d'acétate d'éthyle ($R = 0,584$).

Nous pouvons conclure à la fin de ce mémoire, que les miels d'Algérie sont riches en composés phénoliques et flavonoïdes spécialement le miel du thym ; eucalyptus et jujubier mais c'est ne pas la quantité, mais la qualité des polyphénols, qui sert de déterminer la capacité antioxydante des miels.

Les miels Algériens, étant une source riche en antioxydants naturels, peuvent être utilisés dans la prévention de diverses maladies. De nombreux composants de miel, en particulier des acides phénoliques et les flavonoïdes, se sont avérés contribuer de manière

significative à la capacité antioxydante. Ces résultats ont conduit à la conclusion que plusieurs antioxydants peuvent agir en synergie dans le miel ceci nous encourageons à continuer les recherches sur le miel afin d'aboutir à plus d'informations sur le mécanisme d'action des différents constituants des miels tel que les enzymes et autres composés phénoliques et leurs activité antioxydante.

Références bibliographiques

Ahmed, M.1 , Aissat, S. and Djebli, N.(2012). How Honey Acts as an Antioxidant?. Access Journal Volume 1 , P2

Aline ,M., Charles, E., Marco ,R. , Jeanne ,M. and Odile, G.(2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry ,P571–577.

Amiot , M.J., Aubert ,S., Gonnet , M., Tacchini ,M. (1989).Les composés phénoliques des miels étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles.ElsevierV 2, P115-125.

Anos , J., (2012) . Du miel à volonté. D2A, V 1, P 23.

Apak , R., Güçlü ,K., Demirata ,B., Özyürek, M., Çelik , E. et al. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the Cuprac assay. *Molecules* V12,P1496.

Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*V9,P5-21.

Beretta ,G ., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M .and Facino, R .M. (2005). antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics, Anal Chim. Acta ,V 533, P 185-191.

Berger , M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*V20 , 48-53.

Bertoncelj, J., Dobersek, U. , Jamnik, M . Golob T.(2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chemistry ,V105 ,P822–828

Bland, M., (2010).Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de doctorat, Université. Limoges ,P 142.

Blois, M .S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*V181,P1199-1200.

Bogdanov , S. (2011). Bee Product Science, the Honey Book ,P 29.

Bogdanov S., Gallmann, P., Stangaciu, S. and Cherbuliez ,T. (2006). Produits apicoles et santé. ED. Station de Recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP Schwarzenburgstrasse CH-3003 Berne V161, P 52

Boubekri , C.(2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Doctorat en sciences,Chimie P176.

- Bougandoura, N., Bendimerad N.** (2013) .Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.)* Briq. Nature & TechnologieV9 ,P 15.
- Chouia A.,**(2013). Analyses polliniques et caractérisations des composés phénoliques du miel naturel de la région d'Ain zaâtout. Thèse de doctorat, biologie appliquée, Université Bskra , P 62.
- Codex alimentarius.** (2001).Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires.Commission du Codex Alimentarius Alimentarius.AIINORM 01/25, P1-31.
- Congo, M.,** (2012) .Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L. (Salvadoraceae)*.Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso, P 42.
- David, H., Carlos, A. U., and Goetz-Cordoves, C.** (2011). Role of honey polyphenols in health. Journal of Api Product and Api Medical Science 3V4 , P 141 – 159.
- Descottes, B.** (2009). Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 ans, Limoges Cedex, France. Phytothérapie, V7, P112 -116.
- Djemai Zoughlache S.**(2008). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus L.*Tèse de magistraire, Biochimie Appliquée,université. Université de Batna P 56.
- Emmanuelle, H., Julie, C. and Laurent, G.**(1996). Les Constituants Chimiques du Miel. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. Apiservices, Galerie Virtuelle apicole.
- Escuredo, O., Montserrat, M., Fernandez-Gonzalez, M, M, Carmen Seijo, C.** (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. Food Chemistry V138P851–856
- Genot, C., Eymard, S.and Viau, M.** (2004). Comment protéger les acides gras polyinsaturés à longues chaînes oméga 3 vis-à-vis de l'oxydation ? Oléagineux, corps gras, lipides, V2 P 133 – 141.
- Georgieva, S., Boyadzhiev, L.and Angelov, G.**(2010). Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. Revue de génie industrielV5 ,P124-132.
- Gheldof, N., Wang, X. H.and Engeseth, N.** (2002) . Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. Journal of Agricultural and Food Chemistry, V21, P5870–5877.

Gonnet, M. Vache ,J. (1985). Le gout du miel. Edition. U.N.A.F., ParisP:140..

Gonnet ,M. (1963). L'hydroxyméthylfurfural dans les miels, mise en point d'une méthode de dosage. Ann Abeille, V6 ,P:53-67.

Goudable, J ., Favier , A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*.V11,P115-20.

Halliwell , B., Whiteman , M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology* P 142.

Hoyet, C. (2005).Le miel :De la source a la therapeutique .Tese de docteur en Pharmacie .Université Henri Poincare –Nancy,P32-36.

JOSE, M., Ana, M., Celestino , S. and Maurizio, B.(2010). Antioxidant Characterization of Native Monofloral Cuban Honeys.Agricultural and Food Chemistry, V58 ,P 9817–9824

Koehlin-Ramonatxo , C. (2006). Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*.V 20 ,P165-177.

Kwakman , P .H., Te Velde, A-A. and Boer, L. (2010). How honeykillsbacteria. FASEB journal, 24, V7, P2576 – 258.

Lehucher-Michel , M.P.et al . (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*.V30 , P1076-1081.

Lobreau-Callen , D., Marie-Claude, C. and Marmion, V. (2000). Les miels. Technique de l'ingénieur, traité Agroalimentaire, F 7000:20.

Maataoui , B S., Hmyene , A. and Hilali , S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Lebanese Science Journal.V1 ,P3-8.

Mahmoudi, S. , Khali , M . and Mahmoudi, N .(2013).Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). Revue Nature & TechnologieV9, P35-40.

Mansouri , A ., Ennbarek, G ., Kokkalou, , E . and Kefalas P.(2005).Phenolic profile and antioxidant activity of tfe Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*).*Food Chemistry*V89 ,P411-420

Marfak A., (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les

Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES,P187 .

Marghitas, L., Dezmirean, D., Adela, M., Otilia B., Laura Let al. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania; *Food Chemistry* V112 ,P863–867.

Meda, A., Charles, E. L., Marco, R., Jeanne, M., Millogo, J. et al. (2005).

Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* V91 , P 71–577

Nur Alam M., Bristi N. and Rafiquzzman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. (21) :145-149.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R L. (2001) . Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V49 ,P4619-4626.

Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A. and Andrade, B. P. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules* V14 ,P 2202-2211.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. and Defraigne J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. V 16 ,P233-239.

Popovici, C., Saykova, I. and Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité poantioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*. V4 ,P8.

Prior, R L., WU, X. and Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . *Agric. Food Chem*. V53 , P4290-4302.

Rebah N. Helilou H.(2014). activité antioxydante des extraits phénoliques de quelques échantillons de miel locaux .memoire de master ; Université de Laghouat.

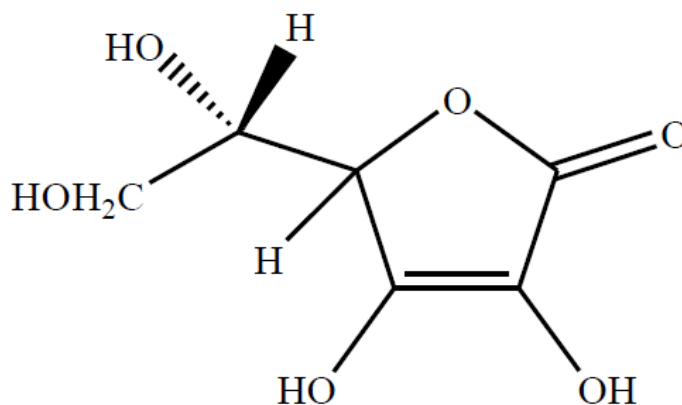
Ribéreau G.,1968.les composes phénoliques des végétaux .ed.Dunod Paris ,P:254.

Ricet-Evans, C., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, V 20P 933–956.

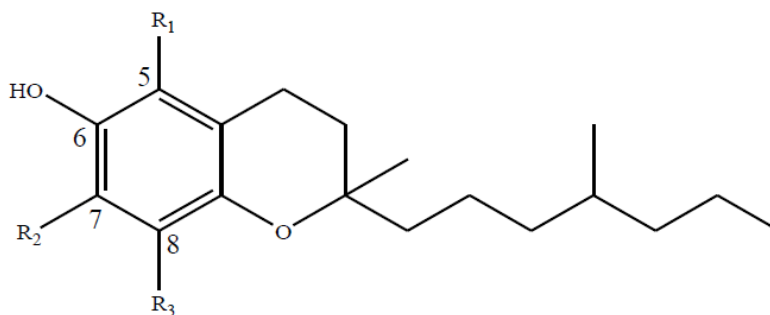
- Rolland , Y.** (2004) Actualités des lipides en cosmétique .Antioxydants naturels végétaux. OCL. Vol 11(6), P 419 – 424.
- Rossant , A.,**(2011). Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse de doctorat, .Université de Limoges : 132.
- Saba, Z.H.,Yusoff, K.M., Makpol, S and Yusoff, M.** (2011).Capacities and total phenolic contents Increase with Gamma irradiation into types of Malaysian Honey.Journal moleculaire
- Silici, S., Sagdic, O., Ekici, L.** (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. Food Chemistry 121V1,P238–243.
- Silva, T.M.S., Câmara , C.A., Lins, A.C., Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.M.S., et al.**(2006) . Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. Journal of Food Composition and AnalysisV1 ,P 507–511.
- Sudhanshu , S., Satyendra , G., Arun , S.** (2009). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys; Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys; Food Chemistry V118, P391–397.
- Tomcza , C.** (2010) . Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire, Université de. Lyon, :185.
- Tsao , R.** (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*V 2 ,P1231-1246.
- Vuorela, S.** (2005) .Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics.
- Zhang ,Qing, Zhang, Junzeng, Shen, et al.** (2006). A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. Journal of Applied PhycologyV18,P 445-450.

Annexes

Annexe 01 : Acide ascorbique' (Boubekri. ,2014)



Annexe 02 : Structures des tocophérols.(Boubekri.,2014)



$R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$	α - Tocophérol
$R_1 = R_3 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$	β - Tocophérol
$R_2 = R_3 = \text{CH}_3, R_1 = \text{H}$	γ - Tocophérol
$R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{CH}_3$	δ - Tocophérol

Annexe 03 : structure de l'acide gallique (web)

