



**Université Sidi Mohamed Ben Abdellah**  
**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès**  
**Centre d'Etudes Doctorales**  
**« Sciences et Technologies »**



**Formation Doctorale: Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies**

**Discipline: Biologie**

**Spécialité: Physiologie et Pharmacologie**

**Laboratoire: Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale**

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée par

**IMTARA Hamada Fareh Issa**

**Aromiels du Maroc et de Palestine:  
Caractérisation physicochimique, phytochimique  
et propriétés pharmacologiques**

Soutenue le **14/12/2018** devant le jury composé de :

<b>Pr. Souleimani Abdallah</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar El Mahraz – Fès</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. Bashar Saad</b>	<b>Université Arabe Américaine – Palestine</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Mondher El Jaziri</b>	<b>Université libre de Bruxelles – Belgique</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Benaji Brahim</b>	<b>École Normale Supérieure de l'Enseignement Technique – Rabat</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Abdellaoui Abdelfattah</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar El Mahraz – Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. Lamchouri Fatima</b>	<b>Faculté Polydisciplinaire – Taza</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. El Amri Hamid</b>	<b>Laboratoire de Gendarmerie Royale - Rabat</b>	<b>Invité</b>
<b>Pr. Lyoussi Badiaa</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar El Mahraz – Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>

# Remerciements

Au nom de ce travail, réalisé au Laboratoire de Physiologie - Pharmacologie et Santé Environnementale, Faculté des Sciences Dher El Mehzar, Fès sous la direction du Professeur **Badiaa LYOUSSI**, je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué à sa réalisation.

J'exprime mes remerciements à Madame, **Badiaa LYOUSSI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Fès (FSDM) et responsable du laboratoire de Recherche « Physiologie, Pharmacologie, et Santé Environnementale », qui a accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire. Je suis très sensible à l'honneur qu'il m'a fait pour diriger mon travail. Je souhaiterais ici lui témoigner ma sincère considération pour tous les précieux conseils et les remarques objectives et ses orientations pour faire avancer ce travail et pour l'autonomie qu'a développée en moi. Je suis aussi reconnaissante pour sa constante disponibilité et son profond dévouement.

J'adresse mes remerciements et mes sincères gratitudes à tous les professeurs de l'enseignement supérieur, pour m'avoir honoré de leur présence en acceptant d'être rapporteurs de ce travail et de siéger au jury de cette thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements:

- Monsieur le Professeur **Abdallah SOULEIMANI** de la Faculté des Sciences Dhar Mahraz de Fès, qui me fait l'honneur de juger et de présider le jury de ce travail.
- Monsieur le Professeur **Bashar SAAD** de l'Université Arabe Américaine de Jinin - Palestine, qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.
- Monsieur le Professeur **Mondher EL JAZIRI** de l'Université libre de Bruxelles - Belgique, qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.
- Monsieur le Professeur **Brahim BENAJI** qui de l'École Normale Supérieure de l'Enseignement Technique de Rabat, qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.
- Monsieur le Professeur **Abdelfattah ABDELLAOUI** de la Faculté des Sciences Dhar Mahraz de Fès, qui a accepté de juger ce travail.

- Madame le Professeur **Fatima LAMCHOURI** de la Faculté Polydisciplinaire de Taza, qui a accepté de juger ce travail.

- Monsieur le Professeur **Hamid EL AMRI** directeur de Laboratoire de Gendarmerie Royale -Rabat, qui a accepté de juger ce travail.

J'adresse un remerciement particulier pour tous les membres du laboratoire de l'Université Arabe Américaine de Jinin – Palestine, plus particulièrement Monsieur Dr. **Abdesalam KMAIL** pour son collaboration. Qu'il trouve ici l'expression de mes vifs remerciements surtout pour sa gentillesse et pour son soutien.

Je suis aussi reconnaissante aux conseils et à l'aide du professeur **Soumya TOUZANI** professeur assistante à la Faculté de Médecine et de pharmacie de Fès, pour son intérêt qu'elle a apporté à avancer mon travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son endurance, sa serviabilité et surtout son aide.

Je tiens à remercier également Mr. **Youssef ELAMINE** doctorant à la faculté des sciences Dher El Mehraz qui m'a accompagné de près durant tout ce travail, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'il a su m'accorder et les conseils précieux qu'il m'a prodigués tout au long de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier également Mr. **Abderrazak ABOULGHAZI**, technicien au sien du laboratoire de biochimie à CHU Fès pour leur contribution et leur disponibilité pour l'avancement de ce travail.

Je voudrais également remercier, **Saloua BIYADA, Fatima EL KAMARI, Nawal ELMENYIY et Asmae ELGHOUIZI** doctorantes à la faculté des sciences Dher El Mehraz, peu de mots toute ma reconnaissance ces personnes qui ont consacré de leur temps et de leur énergie, et qui m'ont toujours encouragé dans la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements.

Mes remerciements s'adressent également à mes amis: **Achraf EL ASRI, Mohammed TARAYRAH, Mahoumd JARGON...**

Je ne pourrai terminer mes remerciements sans y associer mes collègues du Laboratoire, Physiologie, Pharmacologie, et Santé Environnementale, merci de m'avoir toujours soutenu.

## **Dédicaces**

Que ce travail témoigne de mes respects :

### **A mes parents :**

Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux. Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

### **A mes sœurs et frères. A toute la famille IMTARA.**

Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

A mon aimable professeur **Lyoussi Badiia** qui m'a encadré, et m'a aidé pour donner le mieux de moi-même.

### **A tous mes professeurs:**

Leur générosité et leur soutien m'obligent à leur témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

### **A tous mes amis sans aucune exception,**

Votre aide et soutien, nos instants de rires aux éclats m'ont aidé à surmonter difficultés et instants pénibles encourus durant l'élaboration de ce travail.

### **A tous ceux qui m'aiment, à tous ceux qui me sont chers**

Un grand merci.

## Résumé

**Introduction:** La recherche scientifique dans le domaine de l'api-aromathérapie se veut prometteuse et vise à développer une nouvelle génération de produits naturels aux propriétés thérapeutiques intéressantes, à une époque où l'utilisation abusive des produits pharmaceutiques disponibles les rend presque peu ou plus efficaces. L'Aromiel, mélange de miel et d'huile essentielle, est un produit qui a fait objet de peu d'études jusqu'à présent et dont le pouvoir synergique de ses composants bien documentés dans la littérature, le rend séduisant.

**Objectifs:** Ce travail s'intéresse à l'Aromiel et a pour objectifs généraux la détermination du profil phytochimique du mélange et la caractérisation des critères de qualité et de standardisation du produit. Un intérêt particulier sera porté au pouvoir antioxydant du mélange via une étude pharmacologique approfondie de la combinaison synergique Miel-Huile essentielle.

**Méthodes:** Les produits naturels utilisés concernent différents échantillons de miel de Palestine et du Maroc ainsi que l'huile essentielle d'Origan. Les paramètres physico-chimiques et le profil phytochimique de ces échantillons ont été déterminés. L'activité antioxydante a été évaluée par les tests DPPH, FRAP et molybdate. Des explorations *in vitro* sur l'effet de l'Aromiel vis-à-vis des souches bactériennes ainsi que des études *in vivo* ont été effectuées sur des rats pour en évaluer l'effet antibactérien et l'effet hépato-néphroprotecteur contre la toxicité induite par le CCl<sub>4</sub>. Cet effet a été comparé à celui du miel et de l'huile essentielle chacun étudié séparément.

**Résultats:** L'étude de qualité a révélé que les miels et les huiles essentielles utilisées répondent aux normes de qualité et de standardisation et sont une source potentielle de molécules bioactives objectivée par un pouvoir antioxydant considérable. Sur le plan microbiologique, l'action synergique entre les miels et l'huile essentielle de *Origanum vulgare* a été objectivée vis-à-vis des bactéries multirésistantes: l'Aromiel (Vs huile essentielle seule) a pu réduire les CMI de 4 fois plus sur les bactéries Gram-positives et de 8 fois plus sur les bactéries Gram-négatives. De plus, il s'est avéré que plus un miel est riche en acides tannique, férulique, gallique, épicatechine galate, et en mélanoïdines, plus il a tendance à établir une synergie avec l'huile essentielle combinée. Sur le plan métabolique, l'Aromiel est doté d'un effet hépato-néphroprotecteur contre les dommages induits par le CCl<sub>4</sub> supérieur à celui du miel ou de l'huile essentielle utilisés séparément. L'administration du mélange d'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et du miel du *Thymus vulgaris* a montré un effet synergique potentiel. Ceci plaide en faveur de l'interaction entre les polyphénols identifiés dans les deux matrices (carvacrol et thymol pour l'huile essentielle et épicatechine gallate et acide férulique pour le miel).

**Conclusions:** Nos résultats démontrent que l'Aromiel, en produit naturel prometteur, est doté d'un pouvoir antioxydant puissant en rapport avec l'action synergique des différentes molécules bioactives présentes dans le mélange.

**Mots clé:** Aromiel; Miel; Huile essentielle; Pouvoir antioxydant; Synergie; CCl<sub>4</sub>; Hépatotoxicité.

## Abstract

**Introduction:** The scientific research in the field of api-aromatherapy is promising and aims to develop a new generation of natural products with interesting therapeutic properties, at a time when the misuse of available pharmaceutical products makes them almost no or more effective. Aromiel, a mixture of honey and essential oil, is a product that has been the subject of few studies so far and whose synergistic power of its components well documented in the literature, makes it attractive.

**Objectives:** This work focuses on the Aromiel and has for general objectives the determination of the phytochemical profile of the mixture and the characterization of the criteria of quality and standardization of the product. A particular interest will be brought to the antioxidant power of the mixture via a thorough pharmacological study of the synergistic combination Honey-essential oil.

**Methods:** The natural products used concern different samples of honey from Palestine and Morocco as well as Oregano essential oil. The physicochemical parameters and the phytochemical profile of these samples were determined. Antioxidant activity was evaluated by the DPPH, FRAP and molybdate tests. *In vitro* investigations on the effect of Aromiel on bacterial strains as well as *in vivo* studies were performed on rats to evaluate the antibacterial effect and the hepato-nephroprotective effect against induced toxicity by CCl<sub>4</sub>. This effect has been compared to that of honey and essential oil studied separately.

**Results:** The quality study revealed that the honeys and essential oils used meet standards of quality and standardization and are a potential source of bioactive molecules objectified by considerable antioxidant power. On the microbiological level, the synergistic action between honeys and the essential oil of *Origanum vulgare* was objectified toward multidrug-resistant bacteria: Aromiel (Vs essential oil alone) was able to reduce MICs by 4 times on Gram-positive bacteria and 8-fold on Gram-negative bacteria. In addition, it has been found that the more honey is rich in tannic acid, ferulic, gallic, epicatechin galate, and melanoidin, the more it tends to synergize with the combined essential oil. Metabolically, Aromiel has a greater hepato-nephroprotective effect against CCl<sub>4</sub>-induced damage than that of honey or essential oil used separately. The administration of the mixture of *Origanum vulgare* essential oil and honey of *Thymus vulgaris* showed a potential synergistic effect. This argues for the interaction between the polyphenols identified in the two matrices (carvacrol and thymol for the essential oil and epicatechin gallate and ferulic acid for honey).

**Conclusion:** Our results show that Aromiel, a promising natural product, has a powerful antioxidant power related to the synergistic action of the different bioactive molecules present in the mixture.

**Key words:** Aromiel; Honey; Essential oil; Antioxidant power; synergy; CCl<sub>4</sub>; Hepatotoxicity.

## Articles publiés

- **Hamada Imtara**, Noori Al-Waili, Meryem Bakour, Thia Al-Waili and Badiaa Lyoussi. Evaluation of antioxidant, diuretic and wound healing effect of Tulkarm honey and its effect on kidney function in rats. *Veterinary world*. 2018.
- **Hamada Imtara**, Youssef Elamine, Badiâa Lyoussi. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Science & Nutrition*. 2018.
- **Hamada Imtara**, Youssef Elamine, Badiâa Lyoussi. Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare L.* Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018.
- Meryem Bakour, Noori S. Al-Waili, Nawal El Menyiy, **Hamada Imtara**, Anna Cristina Figuera, Thia Al-Waili, Badiaa Lyoussi. Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. *Journal of Food Science and Technology –Mysore*. 2017.
- Abdalsalam Kmail1, BadiaaLyoussi, Hilal Zaid, **Hamada Imtara**, Bashar Saad. In vitro evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of *Asparagus aphyllus L.*, *Crataegus azarolus L.*, and *Ephedra alata Decne.* in monocultures and co-cultures of HepG2 and THP-1-derived macrophages. *Pharmacogn. Commn.* 2017.

## Articles soumis

- **Hamada Imtara**, Abdalsalam Kmail, Soumaya Touzani, Mira Khader, Hadeel Hamarshi, Bashar Saad and Badiaa Lyoussi. Chemical analysis, cytotoxic and cytostatic effects of twelvehoney samples collected from different regions in Morocco and Palestine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018.
- **Hamada Imtara**, Noori Al-Waili, Abderrazak Aboulghazi, Abdelfattah Abdellaouli, Thia Al-Waili, Badiaa Lyoussi. Chemical composition and antioxidant content of *Thymus vulgaris* honey and *Origanum vulgare* essential oil; their effect on CCL4 - induced toxicity.
- Meryem Bakour, Maria GRAÇA CAMPOS, **Hamada Imtara**, Badiaa Lyoussi. Antioxidant content, free radical scavenging activity and identification of

Phenolic/Flavonoid compounds in pollen of fourteen plants using HPLC-DAD analysis. Journal of Apicultural Research. 2018.

### Communications orales

- **Hamada Imtara**, Youssef Elamine, and Badiâa Lyoussi. Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare L.* Essential Oil. 6<sup>ème</sup> international congress of physiology and environmental biomonitoring (ATPBE'2017). Tunisia. Decembre 2017.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiâa Lyoussi. The protective effect of thymus vulgaris honey, *origanum vulgare* essential oil, and their Aromiel against CCl<sub>4</sub>-induced liver injuries in rats. 4th national days of oncology pharmacy. Rabat, 3-4 Mars 2017.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiâa Lyoussi. Effet synergique du miel et de l'huile essentielle sur l'amélioration de la fonction hépatique. 6th International Symposium on aromatic and medicinal plants SIPAM. Marrakech, 5-6 Mares 2017.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiâa Lyoussi. The protective effect of thymus vulgaris honey, *origanum vulgare* essential oil, and their Aromiel against CCl<sub>4</sub>-induced liver injuries in rats. 5<sup>ème</sup> international congress of physiology and environmental biomonitoring (ATPBE'2016). Hammamet, Tunisia. 18-21 Decembre 2016.

### Communications affichées

- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiâa Lyoussi. The protective effect of thymus vulgaris honey, *origanum vulgare* essential oil, and their Aromiel against CCl<sub>4</sub>-induced liver injuries in rats. 10th scientific days of the ISPITS: health, quality, environment and sustainable development. Oujda, 9-10 May 2017.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiâa Lyoussi. Antimicrobial activity for the Aromials of Morocco and Palestine. 6th International Symposium on aromatic and medicinal plants SIPAM. Marrakech, 5-6 Mares 2017.
- **Hamada Imtara**, Abdalsalam Kmail, Bashar Saad, Hilal Zaid, Badiâa Lyoussi. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of *Asparagus aphyllus L.*, *Crataegus azarolus L.*, and *Ephedra alata Decne.* In monocultures and co-cultures. 4th national days of oncology pharmacy. Rabat, 3-4 Mars 2017.



- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiaa Lyoussi. Physico-chemical parameters and antioxidant properties of twelve Palestinian honeys. 5<sup>ème</sup> international congress of physiology and environmental biomonitoring (ATPBE'2016). Hammamet, Tunisia. 18-21 Decembre 2016.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiaa Lyoussi. Diuretic and wound healing effect of a Palestinian multifloral honey. 5<sup>ème</sup> international congress of physiology and environmental biomonitoring (ATPBE'2016). Hammamet, Tunisia. 18-21 Decembre 2016.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiaa Lyoussi. Diuretic and wound healing effect of a Palestinian multifloral honey. International Symposium: Natural Substances: Stress and Cellular Metabolisms. Stat, Morocco 15-16 December 2016.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Badiaa Lyoussi. The protective effect of thymus vulgaris honey, *origanum vulgare* essential oil, and their Aromiel against ccl<sub>4</sub> -induced liver injuries in rats. International Symposium: Natural Substances: Stress and Cellular Metabolisms. Stat, Morocco 15-16 December 2016.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour. Badiaa Lyoussi. A comparative study of physicochemical characteristics and antioxidant activity of Moroccan and Palestinian honeys. 5th international edition of Young Researcher Days of Therapeutic Chemistry: Place of phytotherapy and medicinal chemistry in the process of drug discovery. 28-29 November, 2016.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Youssef Elamine, Badiaa Lyoussi. Physico-chemical parameters and antioxidant properties of twelve Palestinian honeys. The 13th International Congress of Asian Apicultural Association Conference organized on 24-26 April 2016.
- **Hamada Imtara**, Badiaa Lyoussi. Pharmacological properties of Aromiels from Morocco and Palestine. Second forum of PhD students. Faculty of Medicine and Pharmacy, Fez, Morocco. November 3, 2016.
- **Hamada Imtara**, Meryem Bakour, Achraf El Asri, Badiaa Lyoussi. Diuretic and wound healing effect of a Palestinian multifloral honey. The 13th International Congress of Asian Apicultural Association Conference organized on 24-26 April 2016.

# Sommaire

Introduction Générale.....	1
----------------------------	---

## Première Partie: Synthèse Bibliographique

Chapitre I: Généralités sur les produits étudiés.....	5
---	---

1. Généralités sur le miel.....	5
1.1. Historique.....	5
1.2. Définitions.....	5
1.3. Production du miel.....	6
1.4. Composition du miel.....	9
1.5. Propriétés biologiques du miel.....	12
a. Propriétés nutritives.....	12
b. Propriétés thérapeutiques.....	12
2. Généralités sur les huiles essentielles (HEs).....	14
2.1. Historique.....	14
2.2. Définition.....	15
2.3. Composition chimique des huiles essentielles.....	16
2.4. Utilisations des HEs.....	16
2.5. Toxicité des huiles essentielles.....	17
2.6. La plante étudiée ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	18
a. Origine du nom et Classification d' <i>Origanum vulgare</i> .....	18
b. Description morphologique.....	19
c. Répartition géographique.....	19
d. Activités biologiques et pharmacologiques de l'HE d' <i>Origanum</i> .....	19
3. Généralités sur l'Aromiels.....	21

Chapitre II: Caractérisation physicochimique du miel et de l'huile essentielle.....	24
---	----

1. Contrôle de qualité des miels.....	24
1.1. Propriétés physico-chimiques.....	24
1.2. Propriétés organoleptiques.....	27
2. Contrôle de qualité des huiles essentielles.....	28
2.1. Importance de précision des origines de la matière première des HEs.....	29

2.2. Mode d'extraction .....	29
2.3. Analyses et contrôles réalisés en laboratoire .....	30
2.4. Le chémotype ou chimiotype de la plante (CT) .....	31
<b>Chapitre III: Stress oxydatif et Système de défense antioxydant .....</b>	<b>33</b>
1. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	33
2. Mécanismes de production des ROS dans l'organisme et stress oxydatif .....	33
3. Notion des antioxydants .....	37
3.1. Classification des systèmes antioxydants .....	37
4. Activité antioxydante du miel .....	42
5. Activité antioxydante des HEs .....	43
<b>Chapitre IV: Activité antimicrobienne du miel et de l'huile essentielle.....</b>	<b>44</b>
1. Les antibiotiques et leur mécanisme d'action .....	44
1.1. Définitions et historique .....	44
1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques .....	44
2. La résistance aux antibiotiques et principaux mécanismes de résistance .....	45
3. Les infections nosocomiales .....	46
4. Les bactéries pathogènes étudiées .....	47
4.1. Bactéries à Gram négatif .....	47
4.2. Bactéries à Gram positif .....	48
5. Place des HEs et le miel dans l'activité antibactérienne .....	48
5.1. Activité antibactériennes des huiles essentielles .....	49
5.2. Activité anti bactérienne du miel .....	50
<b>Chapitre V: Fonction hépatique et hépato-toxicité par CCl<sub>4</sub>.....</b>	<b>53</b>
1. Rappel anatomo-pathologique du foie .....	53
2. Fonctions du foie .....	56
3. La fibrose hépatique .....	57
4. Modèles d'étude de la fibrose hépatique .....	58
4.1. Le tétrachlorure de carbone .....	58
4.2. Aspects mécaniques de la toxicité du tétrachlorure de carbone.....	59

4.3. Les traitements de la fibrose du foie induite par CCl <sub>4</sub> .....	60
---	----

## **Deuxième Partie: Etude Expérimentale**

### **Chapitre I: Caractérisations physicochimiques des miels et de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare***

1. Introduction .....	66
2. Matériel et méthodes .....	67
2.1. Analyse des miels.....	67
a. Echantillonnage .....	67
b. Détermination de l'Humidité.....	68
c. Détermination de la Conductivité électrique .....	68
d. Détermination du pH et acidité.....	69
e. Couleur et teneur en mélanoidines .....	69
f. Teneur en Cendres.....	69
g. Teneur en minéraux .....	70
h. Teneur en Proline.....	70
i. Teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF).....	71
j. Analyse statistique .....	71
2.2. Analyse de l'huile essentielle .....	71
a. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation .....	71
b. Détermination du rendement en huile essentielle .....	72
c. Mesure de la densité relative à 20 °C .....	72
d. Mesure de l'indice de réfraction .....	72
e. Mesure de pH.....	72
f. Détermination de l'indice d'acide .....	73
g. Analyse par GC-MS de l'huile essentielle de l' <i>Origanum vulgare</i> .....	73
3. Résultats et discussion.....	74

### **Chapitre II: Etude de l'activité antioxydante des miels et de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare***

1. Introduction .....	89
2. Matériel et méthodes .....	89
2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	90

2.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	90
2.3. Dosage les flavonols totaux .....	91
2.4. Test Molybdate: Capacité antioxydante totale (TAC) .....	91
2.5. Activité anti-radicalaire par la méthode DPPH.....	92
2.6. Détermination du pouvoir réducteur: Test de la réduction du fer FRAP.....	93
2.7. Identification et détermination des composées phénoliques par HPLC-UV.....	94
2.8. Analyses statistiques .....	95
3. Résultats et discussion.....	96

**Chapitre III: Activité antibactérienne des miels, de l'huile essentielle de l'Origanum vulgare et leur mélange (Aromiels)**

1. Introduction .....	110
2. Matériel et méthodes .....	111
2.1. Préparation des Milieux de culture.....	111
2.2. Souches microbiennes .....	111
2.3. Préparation de l'inoculum bactérien.....	112
2.4. Activité antibactérienne par méthodes de disque (Diffusion sur gélose).....	112
2.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	113
2.6. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec des miels .....	114
3. Résultats et discussion.....	116

**Chapitre IV: Effets protecteur du miel, de l'huile essentielle et leur mélange (Aromiel) sur la toxicité de tétrachlorure de carbone chez le rat**

1. Introduction .....	128
2. Matériel et méthodes .....	129
2.1. Animaux d'expérience .....	129
2.2. Induction de l'hépto- néphrotoxicité par la CCl <sub>4</sub> .....	129
2.3. Traitement des animaux .....	129
2.4. Analyses biochimiques.....	130
2.5. Analyses statistiques.....	131
3. Résultats et discussion.....	131

<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>140</b>
--	------------

<b>Références .....</b>	<b>143</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>167</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> A/Récolte du nectar; B/ Récolte du miellat par l'abeille butineuse .....	7
<b>Figure 2:</b> Phénomène de trophallaxie et dépôt du miel dans les alvéoles .....	7
<b>Figure 3:</b> Ventilation des cadres et operculation des alvéoles remplies de miel mature.....	8
<b>Figure 4:</b> Principales étapes du processus de la récolte du miel .....	8
<b>Figure 5:</b> A/ Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan ; B/ Glande d'origan chargée d'huile .....	15
<b>Figure 6:</b> Planche descriptive d' <i>Origanum vulgare</i> .....	19
<b>Figure 7:</b> Une description graphique simplifiée des effets mono- et multi-cibles générés par le produit naturel contenant divers constituant dirigé vers une cible ou des cibles différentes de cellules.....	22
<b>Figure 8:</b> La roue des odeurs et des arômes du miel .....	28
<b>Figure 9:</b> Les principales étapes de l'obtention d'une huile essentielle.....	30
<b>Figure 10:</b> La formation des radicaux libres .....	33
<b>Figure 11:</b> Principales voies de production des ROS.....	34
<b>Figure 12:</b> Balance anti- et pro-oxydants .....	35
<b>Figure 13:</b> Schéma général de biodisponibilité des polyphénols .....	40
<b>Figure 14:</b> Résumé de la formation des métabolites gastro-intestinaux et hépatiques et des conjugués de polyphénols chez l'homme .....	41
<b>Figure 15:</b> Mécanismes d'action antioxydante des polyphénols.....	42
<b>Figure 16:</b> Mode d'action des antibiotiques .....	45
<b>Figure 17:</b> Mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	46
<b>Figure 18:</b> Effets des HEs et de leurs constituants sur la cellule bactérienne .....	50
<b>Figure 19:</b> Faces viscérales du foie .....	53
<b>Figure 20:</b> Les lobules hépatiques.....	54
<b>Figure 21:</b> Structure tridimensionnelle du lobule du foie .....	54
<b>Figure 22:</b> les cellules du foie .....	55
<b>Figure 23:</b> Biotransformation des xénobiotiques. ....	57
<b>Figure 24:</b> Les stades de la fibrose hépatique .....	57
<b>Figure 25:</b> Activation métabolique du tétrachlorure de carbone à l'origine de son hépatotoxicité .....	59
<b>Figure 26:</b> Mécanismes des dommages au foie induits par le tétrachlorure de carbone.....	63

<b>Figure 27:</b> Résultats de l'Humidité des échantillons.....	74
<b>Figure 28:</b> Conductivité électrique des miels analysés .....	77
<b>Figure 29:</b> Teneur en cendres des échantillons de miel .....	78
<b>Figure 30:</b> Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques .....	81
<b>Figure 31:</b> Analyse en composantes principales des paramètres évalués. ....	83
<b>Figure 32:</b> Chromatogramme analytique de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> .....	86
<b>Figure 33:</b> Réaction des composés phénoliques avec les réactifs Folin-Ciocalteu .....	90
<b>Figure 34:</b> Réaction des flavonoïdes avec l' $AlCl_3$ .....	91
<b>Figure 35:</b> Voie de réaction chimique pour le molybdate.....	91
<b>Figure 36:</b> structure du DPPH et sa réduction par des antioxydantes .....	92
<b>Figure 37:</b> Schéma illustrant la réaction de test FRAP .....	93
<b>Figure 38:</b> Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance .....	94
<b>Figure 39:</b> Chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	95
<b>Figure 40:</b> Inhibition du DPPH par l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> .....	96
<b>Figure 41:</b> Teneurs en polyphénols des miels analysés .....	98
<b>Figure 42:</b> Teneur en flavonoïdes et flavonols totaux des miels analysés .....	99
<b>Figure 43:</b> Comparaison de la capacité antioxydante totale des miels.....	99
<b>Figure 44:</b> Séparation des composés phénoliques des miels par HPLC (à droite) de Palestine et de Maroc (à gauche) .....	100
<b>Figure 45:</b> Inhibition du DPPH par les miels .....	104
<b>Figure 46:</b> Graphique du pouvoir réducteur des échantillons de miel .....	105
<b>Figure 47:</b> Analyse en composantes principales (PCA) de la teneur en antioxydants et des propriétés anti oxydantes des miels.....	107
<b>Figure 48:</b> Résumé des étapes de la préparation des suspensions bactériennes.....	112
<b>Figure 49:</b> Etapes de la technique de diffusion sur gélose .....	113
<b>Figure 50:</b> La réduction de la coloration de TTC d'une coloration blanche à une coloration rouge.....	113
<b>Figure 51:</b> Combinaison sur microplaque de 96 puits .....	114
<b>Figure 52:</b> Interprétation des résultats de la combinaison.....	115
<b>Figure 53:</b> Diamètres des zones d'inhibition (mm) générées par l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> contre différentes souches bactériennes. ....	116
<b>Figure 54:</b> ACP des échantillons de miel analysés en utilisant le CFI résultant de la combinaison de miels avec de l'HE comme intrant. ....	123



<b>Figure 55:</b> Intégration des valeurs r de la corrélation entre les CFI et les composés phénoliques illustrée en échelle de couleur d'un côté, et la capacité de regroupement du dendrogramme.....	125
<b>Figure 56:</b> Taux plasmatique en AST et ALT (marqueur hépatique) chez les différents groupes de rats traités.....	133
<b>Figure 57:</b> Taux plasmatique en ALP (marker hépatique) chez les différents groupes de rats traités .....	134
<b>Figure 58:</b> Taux plasmatique en cholestérol, triglycéride, LDL, VLDL et HDL chez les différents groupes de rats traités.....	135
<b>Figure 59:</b> Taux plasmatique en protéines totales chez les différents groupes de rats traités....	136
<b>Figure 60:</b> Taux plasmatique en bilirubine totale et bilirubine directe chez les différents groupes de rats traités.....	137
<b>Figure 61:</b> Taux plasmatique en créatinine, urée, sodium potassium et calcium (marker rénal) chez les différents groupes de rats traités.....	139

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Exemples de produits de l'oxydation.....	36
<b>Tableau 2:</b> Le stress oxydant et pathologies .....	37
<b>Tableau 3:</b> Les antioxydants enzymatiques .....	38
<b>Tableau 4:</b> Principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques.....	38
<b>Tableau 5:</b> Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires.....	39
<b>Tableau 6:</b> Présentation des échantillons des miels analysés.....	67
<b>Tableau 7:</b> Conversion de l'indice de réfraction des miels en pourcentage d'humidité.....	68
<b>Tableau 8:</b> pH et acidités (libre, combinée et total) des échantillons de miels.....	75
<b>Tableau 9:</b> Détermination de la couleur et de la teneur en mélanoidines des miels .....	79
<b>Tableau 10:</b> Teneur en minéraux dans des échantillons de miel étudié (mg/kg).....	80
<b>Tableau 11:</b> Caractérisation physicochimique d'autres miels Palestiniens .....	82
<b>Tableau 12:</b> Propriétés physique d'huile essentielle étudiée .....	85
<b>Tableau 13:</b> Analyse par GC-MS de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> .....	87
<b>Tableau 14:</b> Moyenne de la concentration en mg/100 g de composés phénoliques dans les échantillons de miel.....	101
<b>Tableau 15:</b> IC <sub>50</sub> de l'essai DPPH des échantillons du miel.....	104
<b>Tableau 16:</b> IC <sub>50</sub> des échantillons du miel étudié par test du pouvoir réducteur .....	105
<b>Tableau 17:</b> Coefficients de corrélation entre les composés.....	106
<b>Tableau 18:</b> Liste des antibiotiques résistants à chaque type de bactérie .....	111
<b>Tableau 19:</b> Valeurs les CMI des échantillons de miel (mg/ml) et CMI de HE (%) utilisés individuellement.....	118
<b>Tableau 20:</b> Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre <i>E. coli</i> 87.....	119
<b>Tableau 21:</b> Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre <i>E. coli</i> 97.....	120
<b>Tableau 22:</b> Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre <i>E. coli</i> 57.....	120
<b>Tableau 23:</b> Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	121
<b>Tableau 24:</b> Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre <i>Streptococcus faecalis</i> .....	121
<b>Tableau 25:</b> Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre <i>staphylococcus aureus</i> .....	122

<b>Tableau 26:</b> Coefficients de Pearson corrélation entre les paramètres physico-chimiques du miel et le CFI des combinaisons les miels et l'HE.....	124
<b>Tableau 27:</b> Coefficients de corrélation de Pearson entre la CMI des échantillons de miel et le FIC des combinaisons de miel et d'HE.....	125
<b>Tableau 28:</b> Groupes de rats traités (n=45).....	130

## Abréviations

**AC:** Acide caféique

**ACP:** Analyse en composantes principales

**AFNOR:** Association française de normalisation

**AG:** Acide gallique

**AGPI:** Acides gras polyinsaturés

**ALP:** Phosphatase alcaline

**ALT:** Alanine aminotransférase

**AST:** Aspartate aminotransférase

**BGP:** Bactéries à Gram positif

**BGN:** Bactéries à Gram négatif

**CCl<sub>3</sub>\*:** Radical libre trichlorométhylé

**CCl<sub>3</sub>OO\*:** Radical libre trichlorométhyl peroxy

**CCl<sub>4</sub>:** Tétrachlorure de carbone

**CCM:** Chromatographie sur couche mince

**CE:** Conductivité électrique

**CFI:** Concentration fractionnaire inhibitrice

**CHC:** Carcinome hépatocellulaire

**CMI:** Concentration minimum inhibitrice

**CLHP:** Chromatographie liquide à haute performance

**CPG:** Chromatographie en phase gazeuse

**CT:** Chémotype

**CYP:** Cytochromes P450

**DL<sub>50</sub>:** Dose létale

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

**EGTA:** Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

**FRAP:** Réduction du fer

**GPs :** Glycoprotéines

**HDL:** Lipoprotéine de haute densité

**HE:** Huile essentielle

**HMF:** Hydroxyméthylfurfural

**IL-1:** Interleukine-1

**IL-6:** Interleukine-6

**IL-10:** Interleukine-10

**IN:** Infection nosocomiale

**JC:** Jésus-Christ

**PFG:** Produits finaux de glycosylation

**LAB:** Bactéries lactiques

**LDL:** Lipoprotéines de basse densité

**MGO:** Méthylglyoxal

**MHA:** Mueller Hinton Agar

**MHB:** Mueller-Hinton Broth

**NCCLS:** National Committee for Clinical Laboratory Standards

**NIST:** National Institute of Standards and Technology

**NO:** Oxyde nitrique

**PT:** Protéines totales

**RL:** Radical libre

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**RNOS:** Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

**ROS:** Espèces réactives de l'oxygène

**SARM:** Staphylocoques résistants à la méthicilline

**TGF- $\alpha$ :** Facteur de croissance transformant alpha

**TGF- $\beta$ :** Facteur de croissance transformant bêta

**TNF $\alpha$ :** Facteur de nécrose tumorale alpha

**UA:** Unités d'absorbance

**VLDL:** lipoprotéines de très basse densité

**$\rho$ :** Masse volumique

# **Introduction Générale**

La recherche scientifique, dans les domaines alimentaire, cosmétique et thérapeutique, est de plus en plus orientée vers les produits naturels, produits de la ruche et huiles essentielles entre autres. Le miel est d'utilisation très répandue. Il s'agit d'un produit de la ruche 100% naturel, obtenu sans intervention humaine mais dont la manipulation durant la récolte peut en affecter significativement la qualité finale. Le miel est constitué essentiellement de sucres, fructose et glucose, ainsi que d'acides organiques, d'enzymes et de particules solides provenant de la récolte du miel [1].

L'huile essentielle, produit 100% naturel, est un concentré de molécules bioactives issu d'une plante. Ceci lui confère une valeur extrêmement importante à travers le monde entier [2]. Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante, souvent colorées, altérables et sensibles à l'oxydation, de caractère volatil, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool [3].

La composition des produits susmentionnés leur confère des propriétés biologiques diversifiées, allant du plus simple par piégeage des radicaux libres au plus complexe via des mécanismes moléculaires complexes impliqués dans les cas de cancer et de maladies infectieuses et métaboliques [4–7]. N'empêche, la concentration élevée de l'huile essentielle en molécules bioactives peut en faire un poison une fois utilisée à l'état brut et à des doses abusives [8].

Bien que l'une des voies dans les applications des produits naturels soit la recherche et l'isolement des composés actifs, une tendance au mélange de composés bioactifs est apparue. Elle vise un effet thérapeutique plus élevé résultant de la synergie entre les mono-substances. D'une manière générale, le mélange de deux substances peut être bénéfique et peut être expliqué comme suit : un des constituants du mélange améliore la biodisponibilité de l'autre par augmentation de sa solubilité ; un effet multi-ciblé généré par les constituants du mélange d'une manière agoniste ou synergique ; les deux produits du mélange agissent en additivité : un supprime partiellement ou totalement les mécanismes de résistance bactérienne envers le deuxième ; un des deux produits élimine ou neutralise l'effet indésirable du deuxième [9].

Partant de ce principe de synergie, le choix de l'objet de la présente thèse s'est porté sur un mélange de produits naturels connu sous le terme d'Aromiel. Il s'agit d'un mélange

d'huiles essentielles (Racine : Arom) et de miel. Les effets précédemment cités seront envisagés lors de la recherche d'une possible synergie.

Cette étude, assez complexe vu la composition très diversifiée des produits incriminés dans le mélange, soulève plusieurs questionnements: 1/ l'analyse de la composition des miels et de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* avant et après mélange dans l'optique d'identifier le rôle des paramètres physicochimiques et antioxydants dans l'effet synergique de ces deux produits naturels. 2/ la caractérisation des produits du mélange est elle déterminante dans le choix de l'Aromiel adapté à une affection particulière. 3/Tenant compte de la toxicité potentielle des huiles essentielles, quelle dose minimale efficace de l'huile essentielle pour un effet bénéfique optimal de l'Aromiel ? 4/ L'effet bénéfique obtenu *in vitro*, serait il garanti *in vivo* ?

La présente thèse comportera deux parties principales dont chacune sera divisée en chapitres.

La première partie sera consacrée à une revue de la littérature sur les travaux publiés afin de faire un état des lieux. Les deux premiers chapitres traiteront de la caractérisation en terme de composition des produits naturels choisis pour le présent travail alors que les trois derniers seront réservés à leur utilisation dans la gestion du stress oxydatif, dans la lutte anti-infectieuse et comme agents hépato-néphroprotecteurs.

La deuxième partie traitera de l'approche pratique du travail en quatre chapitres: 1- Caractérisation et analyse physico-chimique de nos échantillons. 2- Détermination du pouvoir anti-oxydant de nos échantillons. 3- Analyse de l'effet anti microbien des produits séparément puis mélangés et détermination de l'effet synergique. 4- Détermination *in vivo* du pouvoir hépato-néphroprotecteur des produits séparés et mélangés sous forme d'Aromiel.



# **Première Partie**

## **Synthèse Bibliographique**

# Chapitre I : Généralités sur les produits étudiés

## 1. Généralités sur le miel

### 1.1. Historique

Le miel est un produit que l'humanité connaît depuis la nuit des temps. De nombreux fossiles d'abeilles sociales qui récoltaient le nectar et stockaient le miel bien avant l'apparition de l'Homme sur terre ont été retrouvés. Tous les peuples de l'Antiquité connaissaient le miel, l'appréciaient et l'utilisaient, en le considérant un don des dieux. Ainsi, en Egypte, l'abeille était exploitée dès 2 400 ans avant Jésus-Christ, pour la production du miel. Ce dernier était alors largement utilisé comme édulcorant, offrande pour les dieux; il entrait aussi dans la composition des médicaments et dans celle des parfums préparés dans les temples. Aussi, Les premiers manuscrits datant d'avant JC et s'intéressant aux médicaments incluait certaines préparations à base de miel contre certaines blessures et maladies [10, 11].

Les Grecs et les Romains appliquaient le miel sur la peau pour ses propriétés adoucissantes, régénératrices, nourrissantes et hydratantes. Au Moyen Age, le miel était utilisé pour la fabrication du pain d'épices, mais aussi pour la réalisation de pansements pour les blessures. Dans la tradition chrétienne, la Terre promise est un « pays ruisselant de lait et de miel ». Il est bien plus qu'un symbole de douceur et de plaisir: il évoque aussi la sagesse, la connaissance, la vérité. Dans la religion musulmane, tout un chapitre du coran est nommé abeille et certains versets avancent les bienfaits du miel [12].

Actuellement, le miel est surtout utilisé en alimentation et en diététique. Il convient de plus de citer son action favorable dans la cicatrisation des plaies, des ulcères gastriques, des crevasses, des brûlures, en relation avec ses propriétés bactéricides dues à sa forte concentration en glucides, à des substances auxiniques d'origine végétale... [13].

*« Le miel, ce cadeau de la nature est le symbole à la fois de la vie, de l'abondance, de la pureté et de la sagesse » [14].*

### 1.2. Définitions

Selon DIRECTIVE 2001/110/CE et Codex Alimentarius, le miel est une substance naturelle sucrée produite par les abeilles *Apis mellifera* à partir du nectar / sécrétions des plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butinants retrouvées sur la plante. Après butination,

le matériel collecté par l'abeille et combiné avec ses propres sécrétions sera déposé dans les rayons de la ruche pour y être déshydraté, mûrir et y être emmagasiné [1, 15].

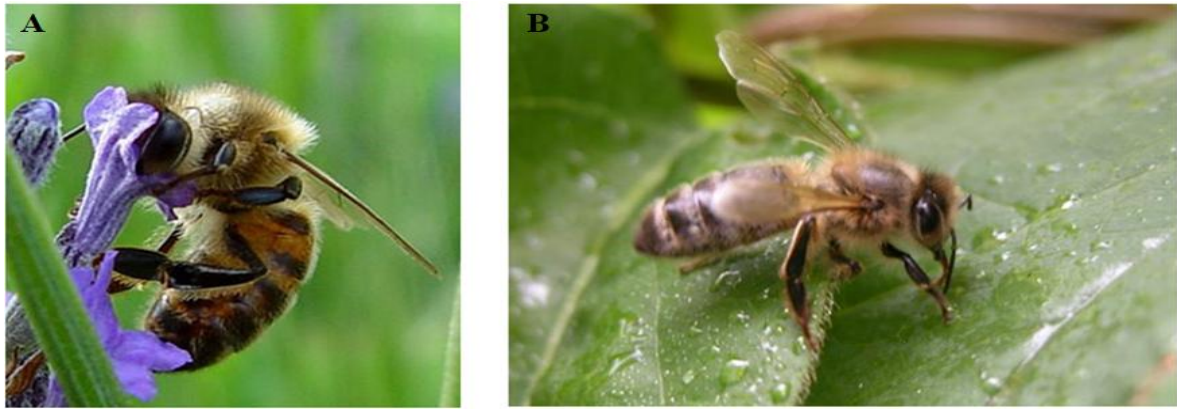
Le miel provient de deux sources principales:

- Du nectar, qui est sécrété par les glandes nectarifères des nectaires de la plante. On distingue les nectaires extra-floraux (situés sur les parties végétatives de la plante: bractées, feuilles, pétioles, stipules et tiges) des nectaires floraux [16]. En termes de composition chimique, le nectar est un mélange chimique complexe constitué d'eau, de sucres et d'autres substances (protéines, lipides, minéraux, etc.). Dans la majorité des nectars floraux, les sucres constitutifs sont le glucose, le fructose et le saccharose. Leurs proportions relatives sont propres à chaque espèce végétale [17].
- Du miellat, qui est un liquide épais et visqueux constitué par les excréments liquides des homoptères (psylles, cochenilles et surtout pucerons). Il est plus dense que le nectar, plus riche en azote, en acides organiques, en minéraux et sucres complexes. Il est récolté par les abeilles et produit un miel plutôt sombre, moins humide que le miel du nectar. La récolte du miellat par les abeilles est très aléatoire, se réalisant essentiellement sur les arbres forestiers ou d'ornement (sapin, épicéa, pin sylvestre, tilleul, chêne) [18].

### **1.3. Production du miel**

#### **a. Récolte de la matière première**

La récolte de la matière première du miel (nectar et miellat) se fait par des abeilles dites butineuses. Ces dernières doivent visiter un nombre considérable de fleurs (environ 1 million) pour produire 100g de miel [19]. Le nectar est aspiré par la trompe de l'abeille puis emmagasiné dans le jabot de la butineuse pour y subir une transformation par les enzymes produites par l'abeille. Lorsque le jabot est plein, la butineuse regagne la ruche où elle transmet sa charge en cours de transformation à une autre ouvrière qui continue le processus de transformation du nectar (Figure 1A). Le miellat, est récolté quant à lui par léchage de la surface des plantes contenant du miellat sous forme de gouttelettes sirupeuses (surtout au niveau des feuilles) (figure 1B) [20].



**Figure 1:** A/Récolte du nectar; B/ Récolte du miellat par l'abeille butineuse

### **b. Maturation du nectar et miellat en miel**

La maturation du nectar en miel consiste en une transformation des sucres et une diminution de la teneur en eau. Elle commence dès la récolte du nectar par l'abeille et se poursuit lors de son stockage dans la ruche grâce au travail des ouvrières [21]. Lorsque la butineuse rentre à la ruche, elle régurgite de son jabot le liquide récolté et le transmet à d'autres ouvrières par la gouttière linguale, puis des échanges successifs entre abeilles vont permettre un enrichissement de ce liquide en enzymes et sa déshydratation: c'est le phénomène de **trophallaxie** (Figure 2). Quand la teneur en eau de la matière première est de 40 à 50%, elle est déposée dans une alvéole [22]. Les enzymes intervenant dans la maturation du miel sont nombreuses dont la plus importante est l'**invertase** qui dégrade le saccharose en glucose, fructose et autres sucres [23]. Cette réaction d'hydrolyse est appelée « inversion du saccharose ». Une autre enzyme appelée glucose-oxydase catalyse l'oxydation de certaines molécules de glucose en acide gluconique, ce qui confère au miel son acidité. Lors de cette réaction, du peroxyde d'hydrogène est également produit [16, 20, 23].



**Figure 2:** Phénomène de trophallaxie et dépôt du miel dans les alvéoles

Enfin, pour amener le miel à sa teneur en eau idéale (soit une valeur inférieure à 20%) [1], les abeilles ventilent les cadres par un mouvement rapide des ailes, puis c'est la phase d'évaporation passive de l'eau qui dure pendant 1 à 3 jours (Figure 3). Dès lors, les abeilles cirières operculent l'alvéole à l'aide d'une fine couche de cire, imperméable à l'air, pour une longue conservation du miel pendant la période estivale (Figure 3) [14].



**Figure 3:** Ventilation des cadres et operculation des alvéoles remplies de miel mature

### c. Récolte du miel

Avant la récolte, il est conseillé de placer un chasse-abeilles entre les hausses et le corps de la ruche. Ensuite, l'apiculteur transporte les cadres remplis à la miellerie pour désoperculation (éliminer la cire), puis centrifugation (extraire le miel) et enfin filtration (enlever les impuretés) (Figure 4) [24].



**Figure 4:** Principales étapes du processus de la récolte du miel

#### **d. Classification des miels d'après leur origine botanique**

Sur le plan botanique, on distingue:

- **Les miels monofloraux:** sont élaborés majoritairement à partir du nectar et/ou du miellat provenant d'une espèce végétale. Généralement, on considère un miel monofloral lorsque les grains de pollen de la plante principale excèdent un seuil de 45%. Des exceptions peuvent être citées: comme le cas du miel de châtaignier qui nécessite une représentation pollinique > 90% ou le cas de la lavande où le seuil de 15% est suffisant pour attribuer la monofloralité [25].
- **Les miels polyfloraux:** sont élaborés à partir du nectar provenant de plusieurs espèces végétales, qui participent par différents pourcentages dont aucun n'est prédominant. La nomination de ce type de miel est dépendante soit de l'aire de production (région, département, massif), soit du type de paysage faisant référence à une flore identifiée (garrigue, maquis, forêt) [12, 14, 23].

#### **1.4. Composition du miel**

La composition du miel varie en fonction de sa provenance, de la saison de récolte, des plantes butinées, des modalités de son recueil et de sa conservation [26]. Le miel est constitué principalement d'eau, de glucides, d'acides organiques (libres ou combinés sous forme des lactones), de protides et d'éléments minéraux. Il contient également les enzymes provenant des sécrétions salivaires de l'abeille: la diastase ou amylase (dégradation de l'amidon en dextrine puis en maltose) et l'invertase (dégradation du saccharose), des vitamines, des arômes, des lipides, du glycérol, des grains de pollens, des grains d'amidon, des micro-organismes... etc. On y trouve aussi le 5-hydroxy-2-méthylfurfural (HMF), un composant retrouvé systématiquement à l'état de traces dans le miel provenant de la dégradation du fructose. Sa proportionnalité à la durée de stockage et au traitement thermique en font un excellent indicateur de la qualité du miel [27].

##### **a. Les glucides**

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel, mais aussi le composant le plus difficile à analyser. Les monosaccharides (glucose et fructose) représentent 85% à 95% des sucres du miel avec une prédominance en teneur pour le fructose (38% Vs 31% pour le glucose). On y trouve également du saccharose et du maltose ainsi que d'autres sucres présents à l'état de trace. La présence de fructose et de glucose provient en grande partie de l'action de l'invertase sur le saccharose [23].

### **b. Le contenu en eau (= Humidité)**

Il est quantitativement la deuxième composante la plus importante du miel. Son contenu est essentiel, car une quantité inadéquate affecte la qualité du miel en augmentant le risque de fermentation. Il dépend des conditions météorologiques lors de la production et de l'humidité dans la ruche, mais aussi des conditions de récolte [23]. Les recommandations internationales ont fixé une limite à 20% d'humidité pour la majorité des miels [1].

### **c. Les protides**

Ils ne sont présents qu'en très petite quantité (environ 0,3%) sous forme d'acides aminés et de protéines. Ils proviennent du nectar des plantes, des sécrétions des abeilles et de la présence des grains de pollen, sources de peptones, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines. Plus de 19 acides aminés sont présents, avec une représentation majeure de proline et d'hydroxyproline, sécrétées par les glandes salivaires de l'abeille. Le miel contient la bee-defensin 1, d'intérêt dans l'activité antibactérienne [23, 28].

### **d. Les lipides**

Les stérols forment la très grande majorité des lipides présents dans les miels, sous forme de cholestérol libre ou d'esters de cholestérol. Les autres lipides présents sont les triglycérides et les acides gras libres (acide palmitique, oléique et linoléique). Les lipides proviennent également des microparticules de cire qui composent le miel [23, 29].

### **e. Sels minéraux**

Ils ne sont présents qu'à un taux d'environ 0,26%. Le potassium en représente environ la moitié [30]. Plus de 30 oligoéléments ont été décelés. La teneur en minéraux des miels est fortement corrélée à l'origine géobotanique de la matière première (nectar et miellat) [23, 31]. En règle générale, les miels de miellat contiennent deux fois plus de minéraux que les miels de nectar. De plus, plus un miel est foncé, plus il est riche en minéraux [32].

### **f. Vitamines**

Elles sont majoritairement apportées par les grains de pollen. Les vitamines liposolubles A, D, E et K sont présentes à l'état de traces et ne sont quasiment pas détectées par les méthodes de dosage habituelles. Les vitamines hydrosolubles sont composées essentiellement par les vitamines du groupe B: B1, B2, B3, B5, B6, B8 et B9. La vitamine C peut également être retrouvée de façon occasionnelle [23, 33].

### **g. Enzymes**

Les enzymes, avec leur rôle principal dans la composition des miels, proviennent majoritairement de la salive de l'abeille (Invertase, Amylase, Glucose-oxydase) ou encore du nectar (la catalase et les phosphatases acides) [23, 33].

### **h. Pigments**

Les caroténoïdes et les flavonoïdes sont principalement responsables de la coloration du miel. Les flavonoïdes appartiennent aux groupes des polyphénols et possèdent des propriétés antioxydantes très intéressantes en neutralisant les radicaux libres. La quantité et le type des flavonoïdes varient selon la source florale. Les miels les plus riches en pigments sont ceux de couleur foncée (comme ceux issus du tournesol, du sarrasin et de miellat) [30, 34].

### **i. Acides organiques**

Le miel contient de faibles quantités d'acides mais en large gamme, ce qui lui confère un faible pH. L'acide gluconique résultant de l'activité du glucose oxydase est l'acide principal du miel. On peut retrouver aussi: l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide oxalique, l'acide butyrique, l'acide pyroglutamique et l'acide succinique [35].

### **j. Composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires dont les principales sources sont les sécrétions végétales. On retrouve les acides phénoliques (acides benzoïques et cinnamiques) et les flavonoïdes (flavones et les flavanones) en proportions très variables [36]. Les phénols influencent la couleur par l'intermédiaire des flavonoïdes susceptibles de contribuer à la coloration jaune [37].

### **k. Les colloïdes**

La teneur en colloïdes des miels varie de 0.1 à 1% (les miels les plus foncés étant les plus riches). Les colloïdes sont constitués de protéines, de substances cireuses, de pigments et de pentosans [38]. La turbidité observée à la solubilisation du miel dans l'eau est due à la précipitation des colloïdes [39].

### **l. 5-hydroxy-2-méthylfurfural (HMF)**

L'HMF est un composé organique dérivé de la déshydratation directe des sucres dans des conditions acides (caramélisation) pendant les traitements thermiques des aliments ou pendant de longues périodes de stockage. La quantité de HMF formée dépend de la



température, du type de sucre, du pH, de la teneur en eau, de l'activité et la concentration en cations divalents de support [40–42].

### **m. Micro-organismes**

Un certain nombre de micro-organismes a été répertorié dans certains miels. Cette présence s'explique par une contamination via les pollens, le contenu digestif des abeilles, la poussière, l'air et les fleurs. L'autre source de contamination est attribuable à l'Homme via les équipements, les récipients et l'atmosphère lors de la récolte et du conditionnement. La plupart des microbes ne peuvent pas se développer ou se reproduire dans le miel en raison de l'activité antibactérienne de ce dernier (effet bactériostatique) [43].

## **1.5. Propriétés biologiques du miel**

En plus de sa valeur comme aliment très riche en éléments nutritifs, le miel est considéré comme médicament grâce à ses nombreuses propriétés biologiques. Ces dernières dépendent essentiellement de sa composition, elle-même dépendante des plantes butinées et des conditions climatiques et environnementales [43].

### **a. Propriétés nutritives**

Le miel est composé de sucres simples et est donc facilement assimilé par l'organisme. Il passe dans le sang très rapidement et la glycémie décroît ensuite lentement. Il est souvent utilisé par les sportifs pour sa valeur énergétique : 310 kCal / 100g. Le miel assure ainsi un meilleur rendement physique, prolonge l'effet d'endurance, permet une plus grande résistance à la fatigue. A l'opposé, le saccharose utilisé pour le sucre de cuisine a une valeur calorique de 400 kcal/100g et son pouvoir sucrant (1,0) est moins important que celui du miel (1,3) [26]. Le miel est également recommandé en cas de carence en tant que complément alimentaire, pour l'assimilation d'autres éléments [23]. Il favoriserait l'assimilation du calcium et la rétention de magnésium dans notre organisme [44].

### **b. Propriétés thérapeutiques**

Les produits de la ruche ont toujours été utilisés à des fins médicinales. On leur attribuait de nombreux pouvoirs thérapeutiques, souvent liés à des valeurs spirituelles et sacrées. Aujourd'hui, les recherches scientifiques témoignent des effets thérapeutiques incontestables qui ouvrent de nouvelles voies de recherche en médecine et confèrent à l'apithérapie une place importante parmi les thérapies complémentaires et la médecine moderne. De nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques du miel ont été

rapportées dans la littérature et notamment: antibactériennes, antifongiques, anti parasitaires, anti virales, anti-inflammatoires, antioxydantes, immunomodulatrices et anticancéreuses, cicatrisantes...etc [4, 5]. Ceci peut s'expliquer par la présence de métabolites secondaires et de molécules bioactives émanant des plantes [45] et par certaines propriétés physicochimiques (l'effet antimicrobien dû au pH, l'effet osmotique des sucres) [28]. La relation entre la composition et les propriétés du miel sera élaboré plus loin dans ce travail.

Néanmoins, certains cas d'intoxication peuvent être notés. Ils sont généralement liés :

- Aux espèces des plantes que butinent les abeilles : certaines plantes produisent des éléments toxiques qui peuvent se retrouver dans leur nectar: les Rhododendrons: *Rhododendron luteum* et *R. ponticum* en Asie, *R. maximum* dans certains états d'Amérique du Nord ; Les andromèdes: *Pieris* ; Kalmie: *Kalmia* ; Les Azalée : *Azalea nudiflora* ; Datura stramoine : *Datura stramonium* aux Etats Unis ; Rewarewa: *Knightia excelsa* en Nouvelle-Zélande. Belladone : *Atropa belladonna* [23].
- Aux conditions d'hygiène lors de la récolte du miel. Un exemple est celui des spores et des formes végétatives de *Bacillus sp* ou de *Clostridium botulinum* qui peuvent se retrouver, par contamination accidentelle, dans le miel au cours de l'extraction par l'apiculteur. Ces spores n'ont pas la capacité de germer dans le miel pur mais le peuvent après ingestion ou application locale où une dilution s'effectue par les liquides digestifs ou les exsudats de plaie [46].

## 2. Généralités sur les huiles essentielles (HEs)

### 2.1. Historique

L'utilisation des plantes était toujours étroitement liée à la vie de l'être humain. Dans ce contexte, les plantes aromatiques étaient utilisées dans plusieurs domaines: alimentaires, domestiques, rituels, cosmétiques ou thérapeutiques. Au début, les gens utilisaient les plantes à l'état brut à des fins alimentaires ou lors des rituels religieux. Au fil de années, leur usage s'est vu développé via l'extraction de leurs essences [47].

Les **égyptiens** de l'époque pharaonique utilisaient l'embaumement, avec notamment un mélange d'huiles aromatiques composé d'huile de cèdre et de basilic. En plus, des « recettes » d'huiles essentielles ont été utilisées par les médecins de l'époque. En **Chine** aussi, plusieurs années av. J.-C., des traités de médecine ont été publiés, dans lesquels sont répertoriées des plantes aromatiques utilisées notamment en infusions et macérations huileuses [48, 49]. Cependant, les vrais fondateurs de l'aromathérapie sont les **Arabes** qui, avec l'invention de l'alambic ont affiné la technique de la distillation. **Avicenne** (980-1037), produit la première huile essentielle pure, l'huile essentielle de *Rosa centifolia*, et décrit plusieurs autres dans son fameux ouvrage « Al-Canon fi Teb » ou le Livre de la Loi en médecine. Depuis la fin du XVI<sup>ème</sup> siècle, les propriétés thérapeutiques de plus d'une centaine d'huiles essentielles sont identifiées et de nombreuses préparations sont utilisées à des fins préventives et thérapeutiques [50].

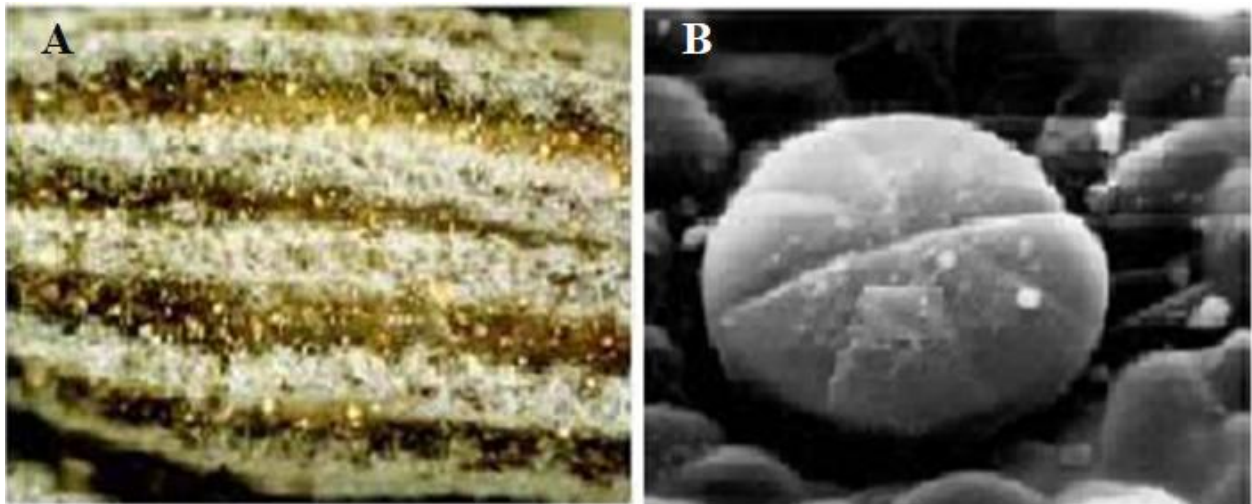
A partir des années 1880, les progrès de la chimie aboutissent à extraire les composants des huiles essentielles, ce qui lèvera le voile sur leur rôle thérapeutique. Parmi les premiers travaux publiés: ceux de Koch en 1881 sur l'huile essentielle de térébenthine, de Michel en 1883 sur le pouvoir bactéricide du thymol, de Chamberland en 1887 et de Cadéac et Meunier en 1888 sur les propriétés antiseptiques des huiles essentielles d'origan, de cannelle et du girofle. Cependant, le terme aromathérapie ne verra le jour qu'en 1928 par le chimiste et pharmacien français "René-Maurice Gattefossé". À partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par chercheurs et médecins (Valnet, Belaiche, Duraffourd, Sevelinge, Pellecier, Penoël, Franchomme, Mailhebiau...) ont permis à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation traditionnelle. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux molécules qu'elles contiennent des propriétés thérapeutiques [51, 52].

De nos jours, l'orientation vers l'utilisation des huiles essentielles est devenue de plus en plus importante.

## 2.2. Définition

Selon l'AFNOR et la pharmacopée européenne, une huile essentielle (HE) est « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, par entraînement à la vapeur d'eau ou par hydrodistillation puis par séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques » [53]. Dans la plante, les HEs peuvent être stockées dans divers organes: fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi). La synthèse et l'accumulation des HEs se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées à la surface de la plante [53].

L'accumulation des constituants des HEs peut s'effectuer dans des cellules isolées banales de teinte jaunâtre et à parois épaisses légèrement subérifiées. Les HEs peuvent former des gouttelettes fines dispersées dans le protoplasme des cellules épidermiques. En général les épidermes des pétales de fleurs odorantes sont dépourvus d'essences. La vaporisation des essences se fait, généralement, d'une façon continue au cours de leur formation (Figure 5) [54].



**Figure 5:** A/ Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan ; B/ Glande d'origan chargée d'huile [56]

On considère les composants des huiles essentielles issus du métabolisme secondaire, comme des molécules actives, impliqués dans les mécanismes de défense des plantes. Ils ne

participent pas directement à la croissance des plantes, mais fournissent une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes [55].

### **2.3. Composition chimique des huiles essentielles**

Les HEs sont constituées par un mélange complexe de composés volatils. La plupart des molécules identifiées sont caractérisées principalement par leur faible poids moléculaire (au-dessous de 300 Daltons) et par leur hydrophobicité [57]. On note des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), des composés minoritaires et un certain nombre de constituants en traces [58, 59]. Ces composés appartiennent à deux familles chimiques bien distinctes: les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes. Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires volatiles dérivant d'un précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphat. Cette classe est la plus variée au niveau structural et la plus abondante dans les HEs [57]. Les phénylpropanoïdes, ou les composés phénoliques, sont des métabolites volatils biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques, tels que la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle [58]. Dans les HEs, on trouve plusieurs fonctions chimiques issues des deux voies métaboliques notamment les carbures (ex. limonène), les alcools (ex. géranol), les aldéhydes (ex. cinnamaldéhyde), les cétones (ex. carvone), les acides (ex. l'acide cinnamiques), les esters (ex. acétate de bornyle), les éthers (ex. 1,8-cineole), les peroxydes (ex. ascaridole) et phénols (ex. thymol et carvacrol) [57].

### **2.4. Utilisations des HEs**

Les domaines d'application des huiles essentielles diffèrent selon la plante d'origine mais surtout de la partie du végétal dont elles sont extraites (la fleur, la feuille, les racines et la graine). D'une manière générale, les essences extraites des racines sont reconnues pour leur action sur le système nerveux, celles extraites des graines et des fleurs pour leur impact sur l'ensemble du système digestif et celles issues des feuilles pour leur bien fait sur les systèmes respiratoire et cardiaque [60]. Actions antibiotiques, antivirales, antiseptiques, fongicides, cicatrisantes, digestives, anti-inflammatoires, sédatives, anticancéreuses, cytotoxicité, ont été attribuées par les différentes recherches aux HEs [3, 6].

Dans notre société moderne, la médecine courante, d'orientation allopathique, se trouve confrontée à des problèmes majeurs: l'inefficacité des antibiotiques face à certains germes pathogènes devenus résistants, le manque de substances antivirales, l'augmentation des

déficiences immunitaires des individus, la prescription continue de médicaments psychotropes. L'aromathérapie propose des solutions alternatives à ces problèmes [59–61].

Une autre utilisation, toujours en relation avec la capacité antiseptique des HEs, fait appel à leur caractère volatil pour lutter contre les contaminations des surfaces et de l'air. Un exemple est le « paragerm », une solution volatile à base d'HEs qui possède une activité bactéricide et fongistatique [62].

Les HEs sont utilisées également comme agents naturels de conservation des aliments. Ceci est attribué à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

Elles sont également employées comme agents aromatisants naturels [63]. Un nombre important d'huiles essentielles est utilisé dans la production des parfums et produits de toilette. Grâce à leur activité antiseptique déjà citée avant, ces huiles essentielles servent à préserver les produits cosmétiques tout en leur donnant une odeur agréable [62].

## **2.5. Toxicité des huiles essentielles**

Contrairement au miel, le sujet de toxicité des HEs devient important, vu que se sont des concentrés en molécules hautement actives et à faible concentration. Cependant, de nombreuses recherches ont été menées sur leurs modes d'action et leurs effets toxicologiques probables afin d'optimiser leurs utilisations potentielles principalement dans le domaine de la santé humaine, la chimie verte et l'agriculture durable.

### **a. Toxicité par ingestion**

En général, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible avec des  $DL_{50} > 5$  g/kg. En ce qui concerne la sarriette et l'origan la toxicité est un peu plus élevée avec une  $DL_{50}$  autour de 1,4 g/kg (chez l'animal) [64]. Chez l'homme des intoxications aiguës sont aussi possibles, et les intoxications graves, les plus souvent observées chez les petits enfants, sont provoquées par l'ingestion en grande quantité des huiles essentielles de girofle (eugénol), d'eucalyptus et de la gaulthérie (salicylate de méthyl) [65].

### **b. Toxicité dermique**

L'usage des huiles essentielles dans la parfumerie et la cosmétique a amené à de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aigüe ou chronique) par application locale. Le

thym, l'origan, la sarriette présentent un pouvoir irritant, alors que la cannelle est dermocaustique et allergisante pour les peaux sensibles [66].

### **c. Toxicité selon la composition**

Certains auteurs se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Des études ont montré qu'une utilisation prolongée des huiles essentielles à thuyones (thuya, absinthe, sauge officinale) est neurotoxique. Ces huiles, dont la liste n'est pas exhaustive, sont inscrites dans un décret du Code de la Santé Publique Française datant de 1986 visant à interdire leur vente en France. Certaines d'entre elles sont néanmoins en vente libre dans d'autres pays européens moins restrictifs [58, 67].

### **d. Toxicité sur cellules animales ou humaines**

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles de thym et de lavande [68], sont cytotoxiques pour des cellules normales du hamster chinois. Cependant, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules cancéreuses humaines [69].

## **2.6. La plante étudiée (*Origanum vulgare*)**

Historiquement, plusieurs auteurs utilisaient le nom de marjolaine pour décrire à la fois l'espèce *Origanum vulgare* et *Origanum majorana*, tous deux appartenant au genre *origanum* et ayant des similitudes morphologiques. Ceci rendit difficile de distinguer l'origan de la marjolaine [69]. L'origan présentait un caractère sacré et légendaire, aux vertus purificatrices, dans plusieurs religions [70]. Il trouvait aussi place importante dans des ouvrages très anciens qui lui attribuaient des usages thérapeutiques diverses [69]. Au III<sup>ème</sup> siècle, les termes grecs *Tragoriganum* et *Heraclium* désignaient l'origan et il était utilisé pour les morsures de scorpions, d'araignées et de serpent [71, 72]. Les utilisations anciennes de l'origan comprenaient: le soulagement des douleurs iliaques (médecine grecque), la désinfection et la conservation des aliments (Egypte), pouvoir apéritif remarquable en facilitant la digestion et en stimulant les estomacs paresseux [71, 72]. A l'époque moderne, dans la médecine populaire, l'infusion d'origan est utilisée contre l'asthme et dans les affections broncho-pulmonaires en tant que fluidifiant des muqueuses. Au XX<sup>ème</sup> siècle, son usage est également rapporté dans les cas de jaunisses et d'atteintes hépatiques, ainsi que pour son action diurétique [72].

### **a. Origine du nom et Classification d'*Origanum vulgare***

Le terme origan provient du latin *origanum*, issu du grec *origanon*. Le terme français apparaît au XIII<sup>ème</sup> siècle : *oros*, pour montagne, et *ganos*, pour éclat ou aspect riant, d'où la signification « *qui se plaît sur la montagne* ». En effet, l'origan ornait les montagnes méditerranéennes en abondance et assurait leur beauté [73].

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Origanum*
- Nom binominal *Origanum vulgare* L.



**Figure 6:** Planche descriptive d'*Origanum vulgare* [74]

### **b. Description morphologique**

L'origan est une plante herbacée ou sous-ligneuse à la base, d'une hauteur de 30 à 90 cm, avec des tiges carrées portant une quarantaine de branches à feuilles petites et ovales vert foncé (figure 6). Les inflorescences sont en épis et réunies en inflorescences composées [61]. Le calice de l'origan est tubuleux à cinq dents courtes, bilabié ou non. La corolle quant à elle est blanche, rosée ou bien violette [75].

### **c. Répartition géographique**

Le genre *origanum* est principalement réparti autour du bassin Méditerranéen. 81% (35 sur 43 espèces) des espèces se trouvent exclusivement dans l'Est Méditerranéen, essentiellement en Turquie, en Grèce et au Moyen Orient. L'espèce *O. vulgare* est aussi largement retrouvée en Euro-asie et en Afrique du Nord. L'aire géographique de l'*Origanum* s'étend jusqu'aux Açores, îles Canaries, Bretagne, Scandinavie et Chine et Taiwan [76].

### **d. Activités biologiques et pharmacologiques de l'HE d'*Origanum***

L'origan est largement utilisé pour les vertus thérapeutiques de son HE.

- **Activité antimicrobienne**



Les vertus antimicrobiennes de l'HE d'origan ne cessent de se confirmer. La composition de l'HE, et en particulier la nature de ses composés majoritaires sont responsables de cette activité antimicrobienne [77]. Le carvacrol s'est révélé être un puissant inhibiteur de la croissance des bactéries. Cependant, l'effet des composés quantitativement minoritaires n'est pas négligeable. Une étude consacrée au pouvoir bactéricide des HES d'origan et de leurs constituants a permis de conclure que le mode d'action de l'HE d'origan est similaire à celui de la polymyxine B, antibiotique réputé pour son effet contre les infections membranaires [78].

#### - **Activité antifongique**

Les phénols sont des antimicrobiens puissants, suivis des alcools, cétones et éthers. Ainsi, l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, riche en carvacrol et en thymol, possède un effet antifongique puissant contre les souches *Aspergillus niger*. L'augmentation du contenu en carvacrol de l'huile essentielle permet ainsi d'augmenter le potentiel antifongique de l'huile essentielle, d'où l'intérêt de choisir un chémotype riche en carvacrol. Utilisé en quantité suffisante, le carvacrol peut donc inhiber la croissance et la production de toxines d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* [79].

Une étude consacrée à l'activité antifongique des HES d'*Origanum* a montré que cette dernière exerce une activité inhibitrice importante vis-à-vis des champignons *Alternaria Aterna*, *Penicellium Roqueforti*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Parasiticus*, *Fusarium Semitectum*, *Fusarium Oxysporum*, *Mucor Racemosus*, et contre les pathogènes humains (*Malassezia Furfura*, *Trichophyton Robrum*, *Trichosporon Beiyelii*) [80, 81].

#### - **Activité antioxydante**

En général, Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est liée à leur structure phénolique. Ces composés phénoliques ont des propriétés redox et jouent ainsi un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et également dans la décomposition des peroxydes [82].

#### - **Activité anticancéreuse**

L'HE d'origan a été évalué pour son effet anticancéreux sur différentes lignées cellulaires et sur des modèles animaux. Les résultats obtenus ont montré une puissante inhibition des proliférations cellulaires. Ceci pourrait s'expliquer par le potentiel de l'HE à

inhiber la pénétration des agents mutagènes dans les cellules; à inactiver des agents mutagènes par piégeage; à capturer directement les radicaux produits par un agent mutagène ou à activer des enzymes antioxydantes cellulaires; à inhiber la conversion métabolique du cytochrome P450 par des promutagènes; ou d'activer le processus enzymatique de détoxification des mutagènes [83].

- **Autres activités**

Selon plusieurs études, l'HE d'origan s'est révélée analgésique, emménagogue, décongestionnante, diaphorétique, vermicide, antipyrétique, anti-inflammatoire, sédative, antimutagénique, larvicide, laxative, nacrifique, pectorale, tonique et diurétique [84]. De ce fait, l'HE d'origan rentre dans la composition de plusieurs préparations pharmaceutiques et parapharmaceutiques [85].

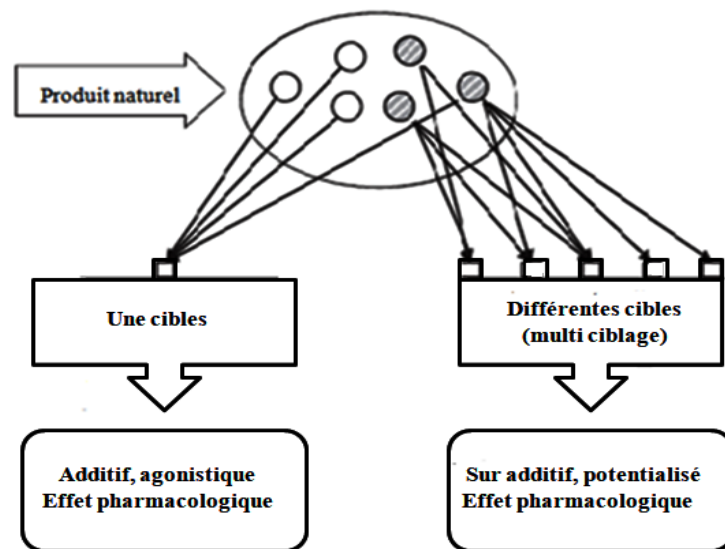
**e. Autres utilisations**

L'HE d'origan est largement utilisé dans l'industrie alimentaire comme aromatisant et antioxydant. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que l'HE d'origan exerce un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries, champignons et mycotoxines responsables des infections alimentaires. L'HE d'origan est un excellent élément de conservation des aliments avec une efficacité particulière contre le rancissement des nourritures riches en lipide [86]. Différentes parties de la plante (feuilles, sommités fleuries huiles essentielles) sont actuellement employées autant qu'épices. Elle est considérée comme étant l'une des épices les plus répandues dans la région méditerranéenne [87].

**3. Généralités sur l'Aromiels**

Bien que la guérison puisse paraître magique, il est difficile de croire qu'il existe un effet thérapeutique sans mécanisme d'action moléculaire. Par conséquent, dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques puissants, les travaux devraient évoluer vers l'étude de la combinaison de substances pour atteindre l'efficacité. Le fait de mélanger deux produits pour aboutir à une activité supérieure à celle de la somme des deux utilisés séparément est appelé synergie. Cette dernière est définie comme étant une action conjointe de deux molécules (ou plus) de telle manière que l'une améliore l'action de l'autre pour produire un effet supérieur à celui qui pourrait être obtenu avec l'une ou l'autre des molécules en quantité équivalente ou produire des effets qui ne pourraient pas être obtenus avec une quantité sûre de l'une ou l'autre molécule, ou les deux. Plusieurs mécanismes sont évoqués :

- Effets pharmacocinétiques ou physicochimiques: Certains composants qui ne possèdent pas d'effets pharmacologiques spécifiques peuvent augmenter la solubilité et / ou le taux de résorption d'autres constituants, améliorant ainsi leur biodisponibilité et entraînant une plus grande efficacité du mélange par rapport au composé isolé.
- Interactions avec les mécanismes de résistance des bactéries: certains métabolites secondaires des produits naturels sont capables de supprimer partiellement ou totalement les mécanismes de résistance bactérienne.
- L'élimination ou la neutralisation des effets indésirables par les composés dans le mélange: même s'il ne s'agit pas d'un effet synergique réel, il génère une meilleure efficacité thérapeutique. Il se produit lorsqu'un constituant du mélange neutralise ou détruit un autre composé possédant une toxicité.
- Effets synergiques multi-cibles: Les constituants uniques d'un mélange naturel affectent non seulement une seule, mais aussi plusieurs cibles; coopérant donc de manière agoniste et synergique (Figure 7) [88, 89].



**Figure 7:** Une description graphique simplifiée des effets mono- et multi-cibles générés par le produit naturel contenant divers constituant dirigé vers une cible ou des cibles différentes de cellules [89]

Notre travail présent découle de ce principe de synergie. Le mélange objet de la thèse est connu sous le terme d'Aromiel (Arom: Huile essentiel + miel). Le miel est considéré comme vecteur pour les huiles essentielles, et facilite ainsi leur pénétration dans l'organisme ainsi que leur assimilation [13, 18, 23].

La notion d'Aromiel désigne donc un mélange synergique de miel et d'une ou plusieurs huiles essentielles. Il y a eu peu d'études pratiques concernant ce mélange [18]. Certaines

précautions sont néanmoins à prendre dans la préparation de ces mélanges par des spécialistes [13, 18] afin d'en optimiser l'efficacité, mais surtout d'éviter tout risque d'incompatibilité ou de toxicité.

## **Chapitre II: Caractérisation physicochimique du miel et de l'huile essentielle**

### **1. Contrôle de qualité des miels**

#### **1.1. Propriétés physico-chimiques du miel**

Les caractéristiques physico-chimiques des miels sont essentielles. Certaines participent à l'identification de l'origine florale d'un miel, d'autres déterminent sa qualité et sa stabilité dans le temps ou dans certains cas peuvent être utilisés pour détecter certaines falsifications, notamment celles concernant l'ajout d'eau ou de sucres. Un autre point intéressant concerne la satisfaction des consommateurs, comme pour les cas de cristallisation.

##### **a. La densité (Le poids spécifique)**

La densité, ou encore le rapport de la masse d'un miel avec le même volume d'eau se détermine de préférence au densimètre. Il s'agit d'un indicateur de la teneur en eau et à moindre degré de la composition chimique du miel. Par conséquent, la densité peut servir comme moyen de connaître la teneur en eau d'un miel. La valeur de la densité varie entre 1,39 et 1,44 à 20 °C, faisant donc du miel un produit relativement dense [90, 91].

##### **b. La viscosité**

La viscosité est l'une des caractéristiques physiques les plus intéressantes, car elle affecte la qualité du produit et la conception des équipements de traitement. Elle dépend de la température, de la teneur en eau et de la composition chimique. Elle se détermine par viscosimètre. Les miellats accroissent la viscosité en raison des dextrines qu'ils contiennent. A densité égale, humidité analogue, un miel riche en lévulose est plus fluide qu'un miel riche en glucose [91, 92].

##### **c. Humidité**

C'est le critère de qualité le plus utilisé pour déterminer la relation matière solide / teneur en eau. Elle détermine la capacité d'un miel à rester stable et à résister à la fermentation. Plus un miel est humide plus la probabilité de fermentation lors du stockage est grande. La méthode de mesure la plus rapide et la plus sûre se fait au réfractomètre. Selon les réglementations internationales, l'humidité dans le miel ne doit pas dépasser 20% [1, 93].

#### **d. Conductivité électrique**

Cette mesure dépend des cendres et des acides contenus dans le miel. Plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée. La conductivité est un bon critère de détermination de l'origine botanique du miel et est souvent utilisée dans le contrôle de routine des miels [94]. En général, les miels d'origine florale ont une conductivité électrique inférieure à celle des miellats [95].

#### **e. pH**

Le pH ou le potentiel d'hydrogène est la mesure du coefficient caractérisant l'acidité d'un milieu, il représente la concentration des ions  $H^+$  d'une solution. Il se situe entre 3.5 et 4.5 pour les miels de nectar et entre 4.5 et 5.5 pour les miels de miellat [93, 94, 96]. C'est un autre caractère d'importance déterminante concernant la possibilité de développement de germes indésirables. Plus un miel est acide plus il résiste à la croissance des espèces microbiennes susceptibles d'y être présentes accidentellement [97].

#### **f. Acidité**

L'acidité est un critère de qualité important: tous les miels contiennent des acides organiques, dont certains volatils, et des lactones. Le problème de l'acidité des miels est très complexe, certains acides présents dans le miel proviennent sans aucun doute du nectar ou du miellat, mais leur origine principale est à rechercher dans les sécrétions salivaires de l'abeille et dans les processus enzymatiques et fermentatifs.

- L'acidité libre est l'acidité titrable par l'hydroxyde de sodium jusqu'au pH du point équivalent: pHe (point de neutralisation de tous les acides libres).
- L'acidité des lactones correspond à l'acidité combinée non titrable directement.
- L'acidité totale est la somme de l'acidité libre et l'acidité des lactones.

Un miel de bonne qualité ne doit pas avoir une acidité libre supérieure à 50 m équivalents pour 100 g. L'acidité naturelle des miels peut s'accroître lorsque le miel vieillit, lorsqu'il est extrait des rayons fortement propolisés ou encore à la suite de l'effet d'une fermentation [98].

#### **g. HMF**

L'HMF, ou hydroxyméthylfurfural est l'un des principaux indicateurs de la qualité du miel. Ce composé est le résultat de la transformation des sucres simples, plus particulièrement le fructose, en 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde. L'acidité et une teneur en eau élevée favorisent cette transformation. Au moment de la récolte du miel, la teneur en HMF est pratiquement nulle puis elle augmente. L'HMF est un indicateur de la fraîcheur et de

l'absence du sur chauffage du miel [41]. Selon l'IHC (comité international du miel) un taux maximal de 40 mg/kg s'est révélé acceptable [93].

#### **h. La teneur en sucres**

Chaque miel est susceptible de contenir une dizaine de sucres: mono, di, tri ou polysaccharides représentant plus de 80% du poids total du miel.

Les critères de qualité du miel concernant les sucres sont:

- La quantité totale glucose et fructose, sucres majoritaires et dont le rapport détermine la tendance des miels à la cristallisation [90, 93, 94, 98].
- La teneur en saccharose, qui permet de détecter une possible adultération par des sucres d'autres origines. Les sucres à contribution faibles sont généralement de bons indicateurs de l'origine florale des miels [99].

#### **i. La teneur en cendres**

Les cendres représentent le résidu minéral du miel après incinération. La détermination des cendres offre la possibilité de connaître la teneur en matière minérale globale du miel [100]. Ce contenu dépend fondamentalement et quantitativement des caractéristiques du sol et du climat de la région géographique [101–104]. En plus, la teneur en cendres est un critère de qualité permettant l'identification de l'origine végétale du miel. En comparaison avec les miels du miellat, les miels de nectars sont moins riches en cendres, ce qui explique la différence en conductivité électrique [105].

#### **j. Sels minéraux**

La teneur en minéraux est l'un des paramètres utilisés pour l'évaluation des valeurs nutritionnelles du miel. Il peut être considéré comme un indicateur potentiel de l'origine géographique du miel ainsi qu'un bio-marqueur important pour la pollution environnementale du miel avec des métaux lourds. Cette analyse est importante pour les apiculteurs et les consommateurs car elle les aide à éviter toute contamination éventuelle lors du traitement du miel et leur assure que le produit est de bonne qualité. Les sels minéraux sont présents en faible proportion dans les miels; la teneur est comprise entre 0,020 et 1,028 g/100 g [106]. Les éléments les plus courants sont: K, Cl, S, Ca, Na, P, Mg, Si, Fe, Mn et Cu. Il est à noter que certains éléments sont essentiellement utiles pour la détermination de l'origine florale tels que le sodium et le potassium alors que d'autres tels le plomb et le cadmium sont des indicateurs d'une contamination de l'écosystème [107].

## 1.2. Propriétés organoleptiques

Après la caractérisation physico-chimique, l'analyse sensorielle est la deuxième composante de l'évaluation de la qualité du miel [108]. Selon leurs origines, les différents miels présentent des caractères visuels, olfactifs, et gustatifs particulièrement diversifiés. L'examen organoleptique d'un produit est la fiche descriptive donnée par l'ensemble des perceptions sensorielles ressenties par le consommateur. Il peut ainsi apprécier ses qualités essentielles mais aussi ses défauts. Cet examen constitue une analyse complémentaire qui ne remplace cependant pas les analyses physico-chimiques et polliniques mais intervient pour confirmer une appellation d'origine botanique et géographique d'un miel [109].

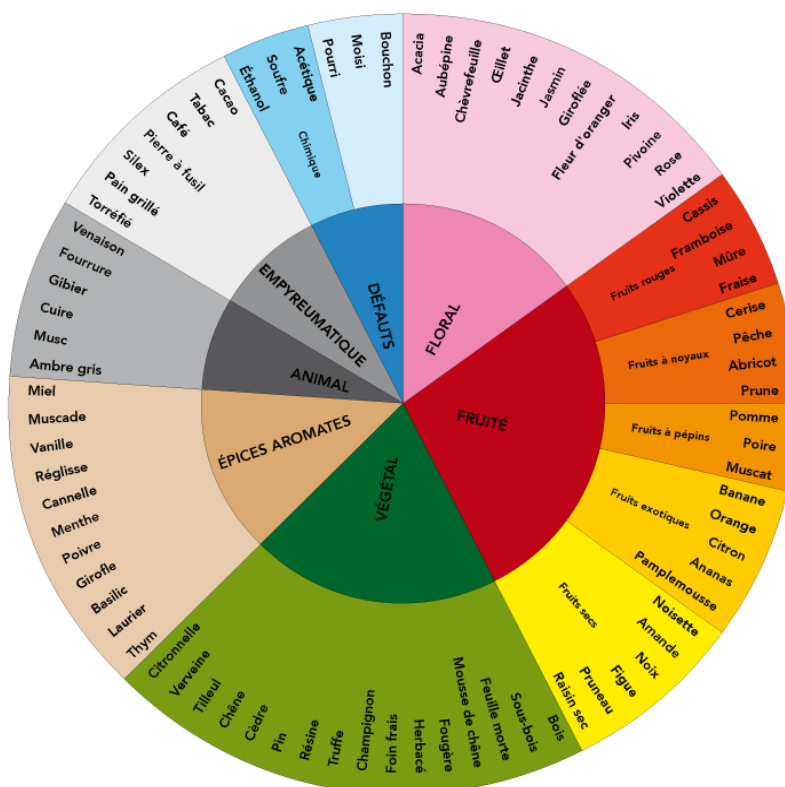
### a. Couleur

La couleur du miel peut aller du blanc au noir. Il existe des miels sans couleur; transparents (miel de *Robinia pseudoacacia*), d'autres sont blancs (miels de *Citrus sp*), mais la plupart des miels multif floraux sont ambrés, et certains sont très foncés, presque noirs (miel de *Quercus sp*) [110]. La couleur naturelle des miels est évaluée à travers l'absorbance nette à A560-A720. La couleur du miel peut être mesurée aussi sur l'échelle de Pfund obtenue par un algorithme après lecture de l'absorbance des solutions aqueuses de miel à 635 nm. Indépendamment de la méthodologie utilisée pour la classification des couleurs de miel, cette propriété est attribuée à la présence et à la concentration de composés possédant des doubles liaisons absorbant la lumière dans le visible (400-700 nm) comme les polyphénols, flavonoïdes, terpènes, caroténoïdes et les produits résultant de la réaction de Maillard. Ces derniers, encore appelés mélanoidines reflètent le degré de brunissement mesuré par l'absorbance des échantillons entre 420 et 450 nm. La couleur du miel est donc liée à l'origine botanique et aux conditions de stockage [77, 41].

### b. Goûts

Il s'agit des arômes, de la saveur (acide, sucrée, salée, amère) et de la flaveur par voie rétro nasale. Ils sont végétaux, floraux, empyreumatiques, fins, puissants ou persistants, exogènes. Il existe une roue des odeurs et des arômes (figure 8) qui permet de décrire les sensations perçues aux niveaux olfactif et gustatif lors de la dégustation d'un miel [111, 112].





**Figure 8:** La roue des odeurs et des arômes du miel

### c. Granulation

White et *al* ont établi une échelle de cristallisation allant de 0 (miel totalement liquide) à 9 (cristallisation complète et dure). Les cristaux peuvent être facilement observés à l'aide d'un polarimètre ou simplement entre deux feuilles de plastique Polaroid. Cependant, la cristallisation du miel est généralement évaluée par analyse sensorielle et est simplement qualifiée de: très fine, fine, assez grossière, homogène, irrégulière... [106].

### d. Odeur

Dans les différents miels, les odeurs dépendent des fractions volatiles du nectar ou miellat qui leur donnent origine. Elles varient donc considérablement entre les miels et présentent un caractère d'évaporation très rapidement. Elles sont végétales, florales ou fruitées, puissantes ou non, fines, lourdes, vulgaires. La présence d'une odeur de fumée ou de fermentation est un défaut qui dévalorise un échantillon de miel [13].

## 2. Contrôle de qualité des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent répondre à des normes analytiques, établies par des commissions nationales et internationales d'experts et imposées par les pays importateurs ou exportateurs. Les points de contrôle à effectuer pour s'affirmer de la falsification des huiles

essentielles et éviter les confusions entre les différentes espèces concernant l'origine géographique, l'espèce botanique, l'organe producteur (feuilles, fleurs, fruits, écorces...) et les caractéristiques physico-chimiques (couleur, odeur, densité et indice de réfraction). Tout ceci permettra d'utiliser une appellation présente dans la nomenclature botanique et valable dans le monde entier [53]. L'huile essentielle utilisée en thérapeutique doit posséder de nombreux critères de qualité.

### **2.1. Importance de précision des origines de la matière première des HEs**

Durant la chaîne de production des HEs et leur traçabilité, il faut préciser tous les paramètres qui ont un impact direct sur leur composition, et donc leur utilisation. La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale en latin précisant le genre, l'espèce et la sous-espèce [113–115]. Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs...) distillée (ou pressée pour les zestes de Citrus), il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes [53].

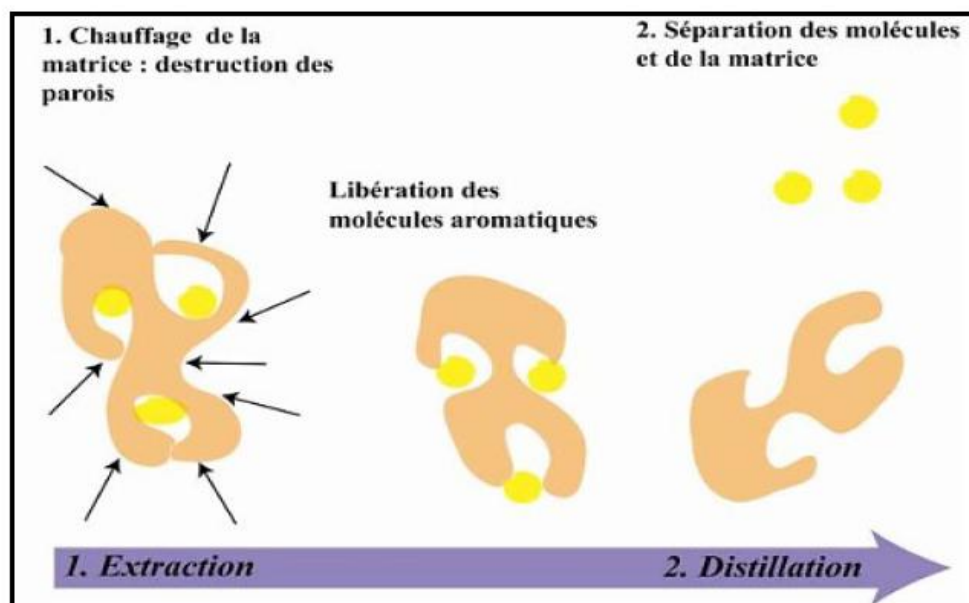
L'origine géographique est un autre paramètre qui permet d'orienter vers l'environnement de la plante déterminant les caractéristiques de l'huile essentielle obtenue. Une même plante émanant de lieux géographiques différents (altitude et latitude, nature du sol) peut produire des huiles essentielles différentes [53]. Le mode de culture permet de désigner si la plante est cultivée ou sauvage. Il est souvent représenté par un label caractéristique (biologique ou autre) [116].

### **2.2. Mode d'extraction**

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. Une telle diversité est due à la variété des matières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants. Le choix d'une méthode dite plus adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait.

Les principales méthodes d'extraction sont: l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion, l'expression à froid, l'extraction par solvants, corps gras, fluides supercritiques et micro-ondes. Quel que soit le type d'extraction utilisé, les étapes restent identiques : 1/ extraire les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle de la

matière végétale, 2/ séparer les molécules de la matrice qui les entoure par distillation comme illustré dans la figure 9 [117].



**Figure 9:** Les principales étapes de l'obtention d'une huile essentielle

Dans la présente thèse, le procédé utilisé était l'hydrodistillation. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité des huiles essentielles obtenues en diminuant les altérations liées au procédé de distillation [116].

Garnier et *al* ont proposé un procédé dont le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité [64]. L'extraction qui s'effectue à température élevée et à pH acide durant une période plus au moins longue peut engendrer des réactions secondaires au sein de l'HE à savoir: hydrolyse, élimination, cyclisation et réarrangement de certains composants [82, 115, 117].

### **2.3. Analyses et contrôles réalisés en laboratoire**

La première étape est une vérification des caractéristiques organoleptiques: couleur, odeur, aspect, viscosité. La saveur n'est que rarement testée, sauf en cas de doute [53]. Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques: indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative [66]. En ce qui concerne les propriétés physico-

chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène et doivent présenter les caractéristiques suivantes:

- Liquides à température ambiante.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé et une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux. Il convient de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air [53, 78].

#### **2.4. Le chémotype ou chimiotype de la plante (CT)**

Il définit les molécules aromatiques caractéristiques des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle. On parle alors d'une huile essentielle chémotypée. Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat, son sol [116]. Quelque soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques [53].

Plusieurs méthodes existent: Chromatographie sur couche mince (CCM); Chromatographie en phase gazeuse (CPG); Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM); Chromatographie liquide à haute performance (CLHP); Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Cependant, La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de chercher

d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés [118]. Cette technique se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, une stationnaire ou fixe et un autre mobile. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [119].

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM). Cette méthode permet de séparer les molécules d'un mélange et de donner la composition de l'HE ce qui permet de déterminer son identité biochimique et son chémotype. Un faible volume de l'échantillon (1-5  $\mu$ l) est injecté dans l'appareil où il est transformé en gaz par la chaleur du four. Il est alors transporté par un gaz vecteur dans une colonne capillaire où vont être séparées les différentes molécules en fonction de leur affinité à la phase stationnaire. Les molécules avec le plus d'affinité seront retenues par la colonne. L'intervalle de temps entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximal du composant au détecteur, représenté par un pic sur le chromatogramme, indique le temps de rétention. Pour identifier ces pics, le chromatographe est couplé à d'autres informations analytiques comme le spectromètre de masse [119].

## Chapitre III: Stress oxydatif et Système de défense antioxydant

### 1. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) [120, 121]

Les "espèces réactives de l'oxygène" (ROS) sont des dérivés de l'oxygène avec des électrons très réactionnels sur le plan énergétique. Les dérivés qui portent un électron non appariés sont appelés radicaux libres. Dans certains cas, les ROS peuvent contenir un atome d'azote et sont ainsi appelés "espèces réactives de l'oxygène et de l'azote" (RNOS).

Les ROS comprennent :

- Des molécules entières ou non radicalaires (ROOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, HOCl ...),
- Des ions (OCl<sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>...),
- Des radicaux libres radicalaires ( $\bullet$ OH ; l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, NO $\bullet$  etc)

Un radical libre est toute molécule ou atome à un ou plusieurs électrons non appariés (figure 10), dont au moins 1 sur sa couche externe (ou deux électrons de même spin dans une case quantique). Ceci augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation. Ces radicaux sont très actifs et leur durée de vie est très courte (quelques millisecondes voire quelques nanosecondes). L'électron célibataire est symbolisé par un point qui indique son emplacement sur le radical. (Exemple :  $\bullet$ OH) [122, 123].

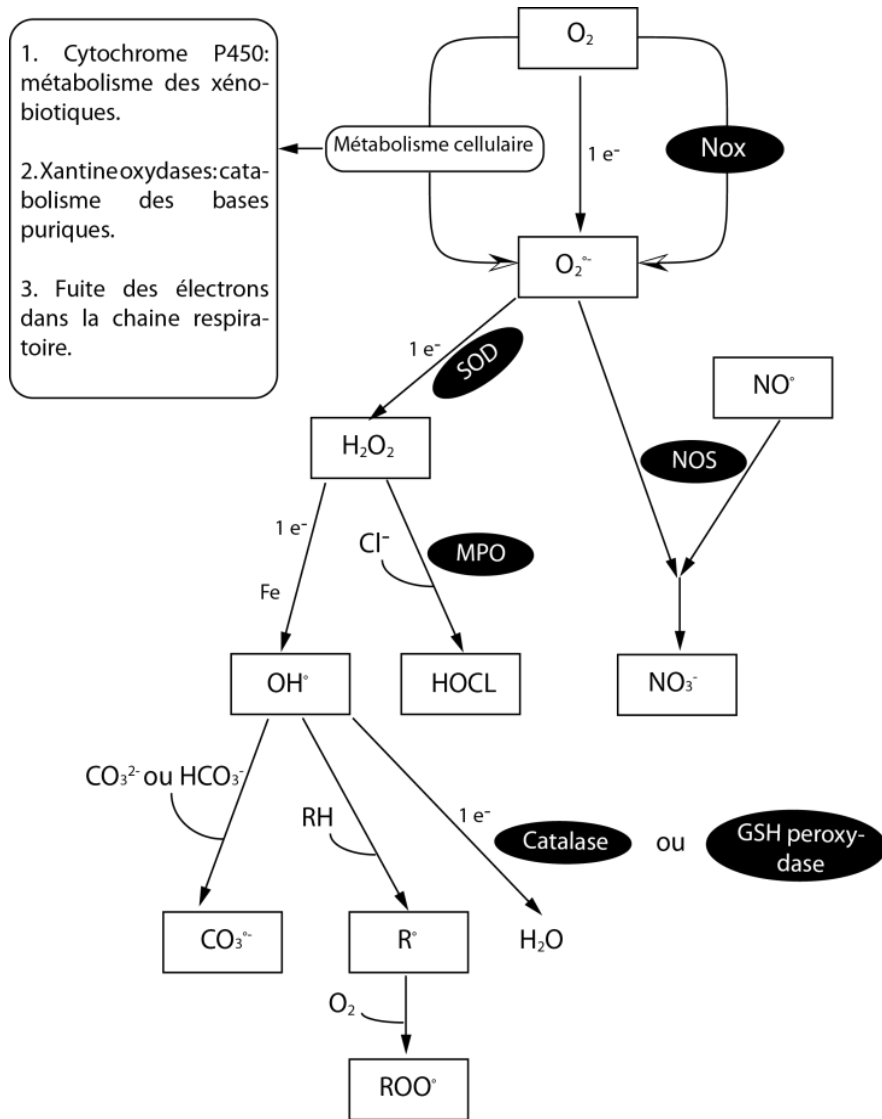


Figure 10: La formation des radicaux libres

### 2. Mécanismes de production des ROS dans l'organisme et stress oxydatif

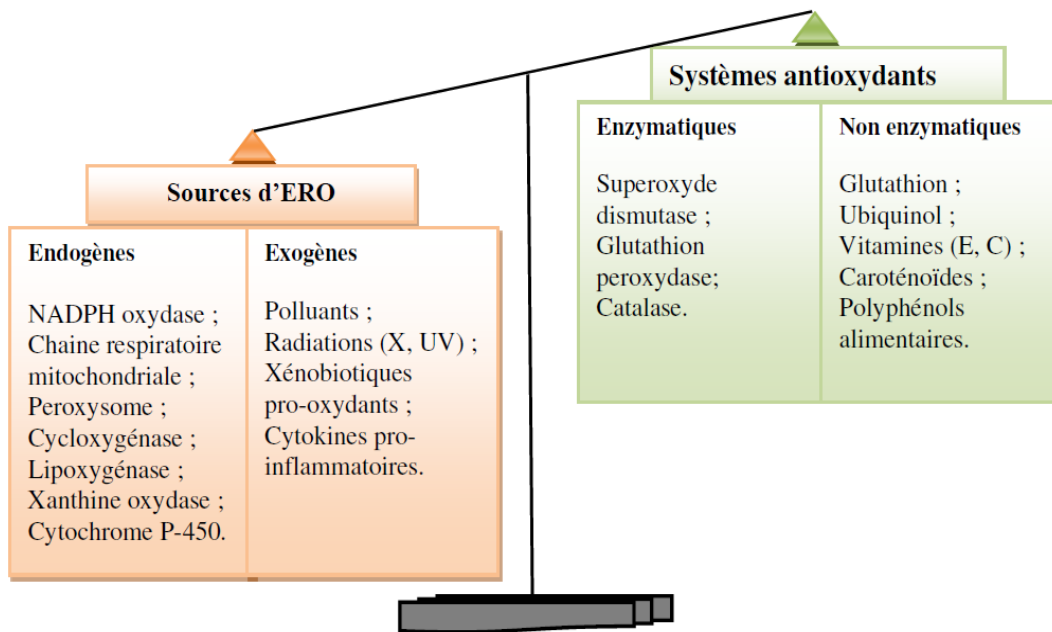
La production des ROS est un phénomène habituel pour tous les organismes vivant en aérobie, et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. En effet, la cellule dispose d'un système complexe de protection, incluant des enzymes et des molécules (vitamine E, vitamine C, ...). Les ROS sont majoritairement produits par la NADPH oxydase

(NOX) membranaire et les enzymes du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. La figure 11 résume les principales voies de production des ROS [124, 125].



**Figure 11:** Principales voies de production des ROS. Nox: NADPH oxydase; SOD: Superoxyde dismutase; NOS: NO synthase; MPO: Myéloperoxydase; GSH: glutathion peroxydase [124].

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ROS et ceux responsables de leur contrôle et élimination. Il se produit quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Figure 12). L'homéostasie redox est ainsi perturbée et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [123, 125].



**Figure 12:** Balance anti- et pro-oxydants

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents sources potentielles de radicaux libres et issus de mécanismes endogènes et exogènes complexes: métaux lourds, rayonnements ionisants et ultra-violet, polluants atmosphériques tels que la fumée de cigarette, médicaments [126]. Lorsque l'homéostasie des ROS est perturbée, plusieurs cibles peuvent être affectées [127, 128]:

- **L'ADN:** cible privilégiée des ROS. Les dommages oxydatifs sont responsables de mutagénèse, de perturbation des processus de réplication, de transcription et de traduction provoquant un arrêt de synthèses et mort cellulaire. Plus le degré du stress oxydant est élevé, plus les phénomènes de mutagénèse dépassent les processus de réparation [129, 130].
- **Les protéines:** Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ROS. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [131, 132].



- **Les lipides membranaires:** Les ROS provoquent une peroxydation des lipides conduisant à des dommages lipidiques importants ayant de graves conséquences cellulaires (atteintes vasculaires, dégradation de la transmission des signaux membranaires...). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire et mort cellulaire [133–135].
- **Les lipoprotéines:** L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation des LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses, dont le rôle est central dans l'initiation de l'athérosclérose [136].
- **Les glucides:** Les ROS agissent essentiellement sur le glucose et sur les protéoglycane (présents en grande quantité dans les cartilages). L'oxydation du glucose aboutit à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG). Ces derniers participent au développement de plusieurs maladies, telles que l'artériosclérose, l'insuffisance rénale, la rétinopathie diabétique [137, 138].

Les produits des dommages engendrés par les radicaux libres (Tableau 1) font office de marqueurs biologiques du stress oxydatif [139].

**Tableau 1:** Exemples de produits de l'oxydation

Cible	Produits	Exemples
<b>Protéine</b>	Protéines oxydées	Groupes carbonyle, tyrosine hydroxylée
<b>AND</b>	ADN oxide	8-hydroxy-2, déoxyguanosine
<b>Lipides</b>	Lipide peroxides	Malondialdéhyde (MDA), isoprostanes

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Le Tableau 2 donne un aperçu des pathologies liées au stress oxydant rencontrées en médecine [140].

**Tableau 2:** Le stress oxydant et pathologies [140]

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agranulomatose septique</li> <li>• Psoriasis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancers</li> <li>• Autoimmunité</li> <li>• Cataracte</li> <li>• Dégénérescence maculaire</li> <li>• Sclérose latérale amyotrophique</li> <li>• Photo-veillissement cutané</li> <li>• Photosensibilisation</li> <li>• Irradiation</li> <li>• Intoxications : CCl<sub>4</sub>, Cd, Fe, alcool,</li> <li>• Hémochromatose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladie d'Alzheimer</li> <li>• Stérilités masculines</li> <li>• Maladies virales : EBV, HVB</li> <li>• Rhumatismes</li> <li>• Athérome</li> <li>• Asthme</li> <li>• Insuffisance respiratoire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabète</li> <li>• Insuffisance rénale</li> <li>• Mucoviscidose</li> <li>• Sida</li> <li>• Choc septique</li> <li>• Infarctus du myocarde</li> <li>• Ischémies/reperfusion</li> <li>• Parkinson</li> <li>• Brûlures</li> <li>• Thalassémie</li> <li>• Greffes d'organes</li> <li>Traitements :</li> <li>• Anticancéreux</li> <li>• PUVA thérapie</li> <li>• Oxygène hyperbare</li> </ul>

### 3. Notion des antioxydants

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production de ROS, d'en limiter la propagation ou de les détruire [140]. Tous les systèmes biologiques, dans leurs environnements oxygénés, ont élaboré des mécanismes pour contrôler les conséquences potentiellement délétères des agents pro oxydants [141].

Plusieurs processus de défense contre les ROS existent. La première ligne de défense est leur captation par des systèmes « anti-oxydants » enzymatiques et non-enzymatiques. Une fois cette première ligne dépassée, des mécanismes secondaires sont recrutés pour réparer les dommages subis et préparer les tissus contre les futures attaques oxydantes.

#### 3.1. Classification des systèmes antioxydants

Les systèmes antioxydants sont de deux types [142]:

- des molécules qui captent rapidement les ROS (antioxydants proprement dits)
- des systèmes enzymatiques catalysant la conversion des molécules pro oxydantes.

Ils sont classés en fonction de leur structure et de leur poids moléculaire en:

##### a. Antioxydants à poids moléculaire élevé

Ce sont des antioxydants endogènes, classés à leur tour en deux catégories: des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non enzymatiques [143].

Les antioxydants enzymatiques (Tableau 3) ont un rôle négligeable dans l'espace extracellulaire alors qu'ils jouent un rôle très significatif dans l'espace intracellulaire [144].

**Tableau 3:** Les antioxydants enzymatiques [145]

<b>Antioxydants enzymatiques</b>	<b>Caractéristiques et réactions catalysées</b>
<b>SUPEROXYDE DISMUTASE SOD</b> - Cu, Zn SOD1 - Mn SOD2 - Cu, Zn SOD3	-Métalloenzyme -3 isoenzymes : SOD <sub>1</sub> , SOD <sub>2</sub> intracellulaires et SOD <sub>3</sub> extracellulaire, -Catalyse la dismutation de l'ion superoxide.
<b>CATALASE</b>	-Enzyme hémique -Transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.
<b>GLUTATHIONS PEROXYDASES</b> - GPx sélénium-indépendant (GST) - GPx sélénium-dépendant	- Catalyse les réactions de détoxification des xénobiotiques. - 5 isoenzymes tétramériques - Action sur les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire de GSH.
<b>THIORÉDOXINE TRX</b>	Sélenoprotéine, à activité oxydoréductase, protectrice des protéines à fonction thiol.

Les antioxydants non enzymatiques (Tableau 4) comprennent la transferrine, l'apotransferrine, la ceruloplasmine, et l'albumine.

**Tableau 4:** Principaux systèmes antioxydants non enzymatiques protéiques [145]

<b>Antioxydants non enzymatiques</b>	<b>Rôle antioxydant</b>
<b>TRANSFERRINE</b>	Capte les ions Fe <sup>3+</sup> + réactions de peroxydation lipidique.
<b>APOTRANSFERRINE</b>	Capte les ions Fe <sup>3+</sup> + inhibe la formation du radical HO <sup>0</sup> + réactions de peroxydation lipidique.
<b>CERULOPLASMINE</b>	Capte les Cu <sup>2+</sup> et prévient leur effet prooxydant.
<b>ALBUMINE</b>	Intégration des ions Cu <sup>2+</sup> à l'hème en évitant les dommages oxydatifs des autres molécules de la matrice extracellulaire.

### **b. Antioxydants à faible poids moléculaire**

Nous nous limiterons dans cette partie à certains composés à faibles poids moléculaires (micronutriments et dérivés métaboliques) (tableau 5), qui ont d'autres rôles biochimiques qui s'étendent au-delà de leurs propriétés antioxydantes.

**Tableau 5:** Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires

<b>Antioxydant</b>	<b>Activité antioxydante</b>
<b>VITAMINE E</b>	Prévention de l'oxydation des LDL [146], de l'athérosclérose et d'autres maladies cardiovasculaires [147].
<b>VITAMINE C</b>	Recyclage de la vitamine E et le glutathion [148].
<b>ACIDE LIPOIQUE</b>	Inhibiteur de la glycooxydation [149], prévention de la lipodystrophie et les neuropathies médiées par les ROS [150].
<b>ACIDE URIQUE</b>	Piégeur puissant des radiaux: $O_2^{\circ}$ , $^{\circ}OH$ , $RO_2^{\circ}$ [144].
<b>SELENIUM</b>	Nécessaire à l'activité de nombreux sélénoenzymes antioxydants: GPx, TRX [148].
<b>CO ENZYME Q</b>	Piégeur puissant des radicaux superoxyde et inhibiteur de la peroxydation lipidique [151].
<b>GLUTATHION</b>	Participant à l'activité des enzymes antioxydants [144, 145].
<b>ZINC</b>	Prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres Maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydases [148].
<b>BILIRUBINE</b>	Protection des acides gras libres et de l'albumine contre l'attaque radicalaire [145].
<b>B-CAROTÈNES</b>	Contrôlent efficacement la génération de radicaux libres notamment en captant l'oxygène [145].

### **c. Antioxydants naturels (Polyphénols)**

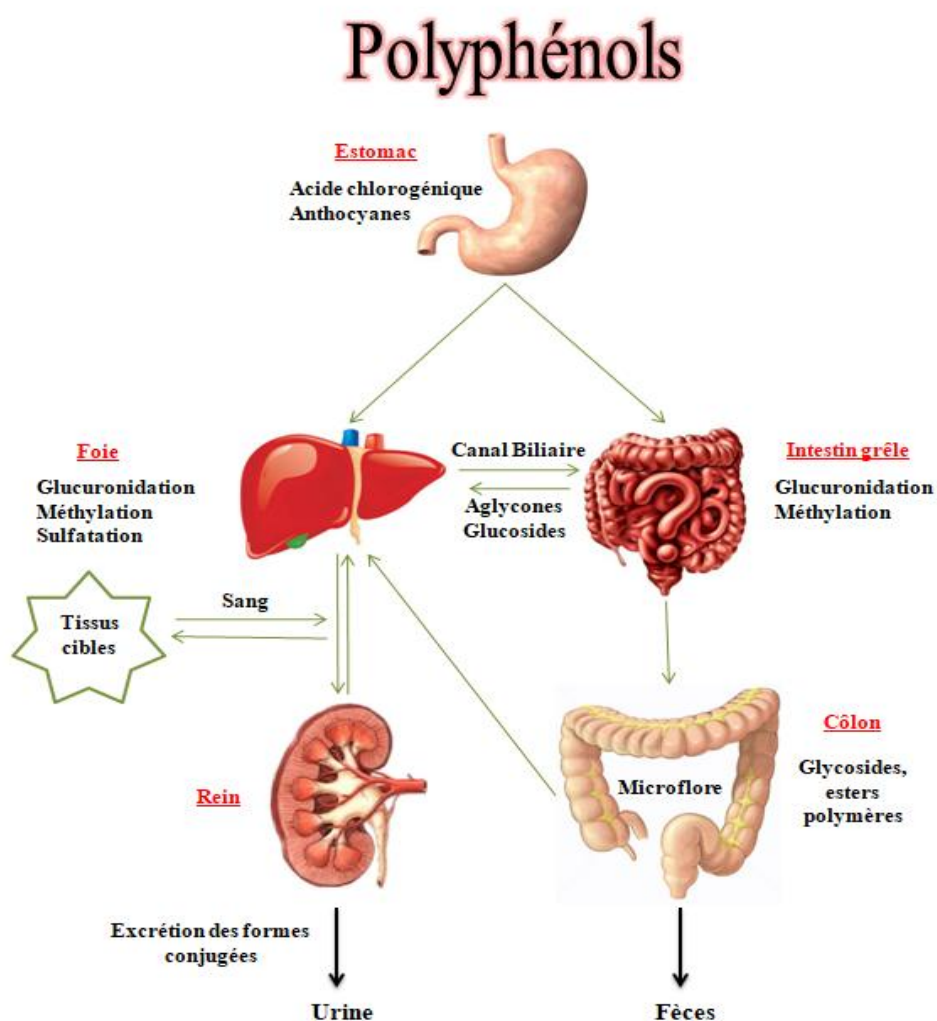
Plusieurs familles chimiques existent: alcaloïdes, glucosides et dérivés indoliques. La plus importante est celle des composés phénoliques qui regroupe un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles leur conférant la propriété d'antioxydants.

Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins [152, 153].

Le groupes des polyphénols compte plus de 8000 composés dont les flavonoïdes tels que les anthocyanes, catéchines ou isoflavones; les acides phénoliques (acide caféique, curcuma par exemple), les stilbènes (resvératrol) ou les lignanes. Ils se trouvent dans le miel, dans des HEs, et dans de nombreux aliments du quotidien (fruits, légumes, chocolat, vin, thé) [154].

### ➤ Biodisponibilité des polyphénols et absorption au niveau digestif

Les effets des polyphénols sont indissociables de la notion de biodisponibilité, qui intègre un grand nombre de paramètres: l'absorption intestinale, l'excrétion des métabolites dans la lumière intestinale, le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, les propriétés des métabolites circulants (structures, cinétiques d'apparition et d'élimination, liaison à l'albumine sanguine et d'autres protéines du plasma), la captation cellulaire, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire (figure 13) [155, 156].

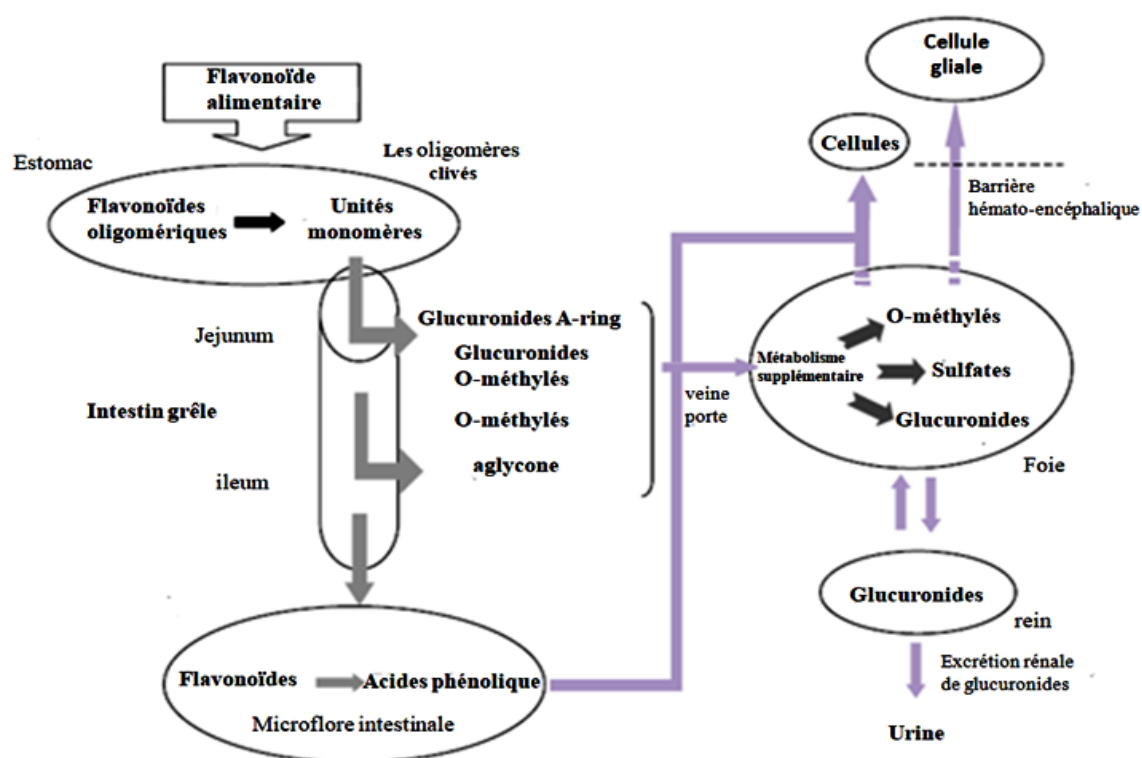


**Figure 13:** Schéma général de biodisponibilité des polyphénols [155, 156]

Au niveau de l'estomac, seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement [157]. Les aglycones de polyphénols (ex.: les flavanols) et les O- $\beta$ -D-glucosides peuvent être notablement absorbés dans le petit intestin, les premiers par diffusion passive, les seconds selon deux mécanismes: 1/ Une absorption directe des glucosides via le transporteur de

glucose sodium-dépendant puis une hydrolyse des glucosides dans le cytosol par une  $\beta$ -glucosidase cytosolique. 2/ Un autre mécanisme implique la lactase phloridzine hydrolase, une glucosidase de la bordure en brosse de l'intestin qui catalyse l'hydrolyse extracellulaire des glucosides. Il est suivi par l'absorption de l'aglycone ainsi libéré par diffusion passive [158].

Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le côlon, puis sont catabolisés par la microflore colique, ayant des activités enzymatiques diverses, avant d'être absorbés. En particulier, la rutine, un flavonol commun de l'alimentation (quercétine), doit être hydrolysée par les enzymes bactériennes avant d'être absorbée au niveau du côlon et atteint la circulation sanguine (sous forme de conjugués de quercétine) en décalage par rapport aux glucosides de quercétine (abondants dans l'oignon), absorbés dès le petit intestin [159].



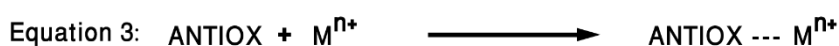
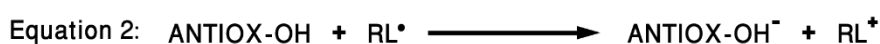
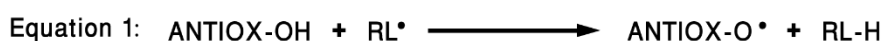
**Figure 14:** Résumé de la formation des métabolites gastro-intestinaux et hépatiques et des conjugués de polyphénols chez l'homme [155]

La fraction de polyphénols absorbée subit une conjugaison dans les entérocytes et dans les hépatocytes. Ainsi les formes circulantes sont typiquement les glucuronides, sulfates et sulfoglucuronides. De plus, les groupements catéchols, importants pour l'activité antioxydante, sont partiellement méthylés par la catéchol O-méthyltransférase dans le foie. Enfin, l'excrétion de la plupart de ces métabolites est excrétion rénale (figure 14) [155].

### ➤ Mécanisme d'action des polyphénols

Trois principaux mécanismes antioxydants sont décrits (figure 15) [160–162]:

- Transfert d'atome d'hydrogène à un radical libre (RL) (Equation 1). Par conséquent, ce RL devient inoffensif, alors que l'antioxydant, devenant oxydé, est aussi inoffensif.
- Transfert d'électron unique de l'antioxydant vers le RL (Equation 2). L'anion radicalaire devient énergétiquement stable avec un nombre pair d'électrons, tandis que le cation radical antioxydant devient une espèce de radical moins réactif.
- Chélation des métaux de transition (Equation 3). Cette chélation empêche les métaux de prendre part dans les réactions qui peuvent conduire à la formation de radicaux libres.



**Figure 15:** Mécanismes d'action antioxydante des polyphénols

#### 4. Activité antioxydante du miel

A partir des années 1970, différents chercheurs scientifiques ont commencé à étudier les propriétés chimiques et biologiques du miel. Les travaux les plus récents s'intéressent de près à ses propriétés antioxydantes.

Différents polyphénols sont présents dans le miel et peuvent jouer un rôle dans sa capacité antioxydante. Les flavonoïdes (apigénine, pinocembrine, pinobanksine, kaempférole, quercétine, galangine, chrysin, lutéoline, hespérétine et myricétine) et les acides phénoliques (acide caféique, ferrulique, ellagique, vanillique, coumarique, chlorogénique, cinnamique et benzoïque) sont reconnus comme principaux responsables de l'activité antioxydante du miel [163, 164].

La capacité antioxydante d'un miel résulte de l'interaction de ces multiples composés. La présence, la concentration et le type de polyphénols sont susceptibles de varier en fonction de l'origine botanique du miel ainsi que, dans une moindre mesure, des conditions climatiques et géographiques [165].

## 5. Activité antioxydante des HEs

De nombreuses études ont démontré les propriétés antioxydantes des huiles essentielles. Comme dans le cas du miel, le potentiel antioxydant d'une huile essentielle dépend de sa composition. Il est bien établi que les composés phénoliques et les métabolites secondaires avec des doubles liaisons conjuguées présentent généralement des propriétés antioxydantes importantes [166].

En général, Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs. Leur activité est liée à leur structure phénolique. Ces composés phénoliques ont des propriétés redox et jouent ainsi un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et également dans la décomposition des peroxydes [167]. L'activité antioxydante des huiles essentielles est également due à certains alcools, éthers, cétones, aldéhydes et monoterpènes: linalol, 1,8-Cineol, géraniol / néral, citronellal, isomenthone, menthone et certains monoterpènes:  $\alpha$ -Terpinène,  $\beta$ -Terpinène et  $\alpha$ -Terpinolène.

Les huiles essentielles ont une capacité de piégeage importante des radicaux libres et peuvent jouer un rôle important dans la prévention de certaines maladies, telles que le dysfonctionnement cérébral, le cancer, les maladies cardiaques et le déclin du système immunitaire. Les HEs ont montré leur action en tant qu'agents hépatoprotecteurs en protégeant les acides gras, en particulier les acides à longue chaîne (C20 et C22) [84].



## **Chapitre IV: Activité antimicrobienne du miel et de l'huile essentielle**

### **1. Les antibiotiques et leur mécanisme d'action**

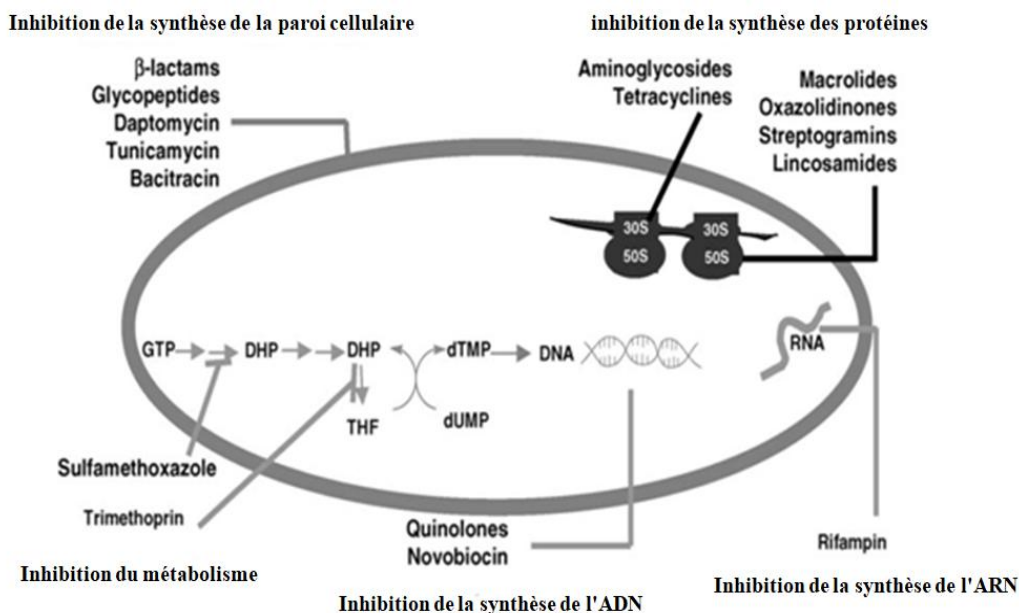
#### **1.1. Définitions et historique**

La découverte des antibiotiques a commencé avec l'apparition de la pénicilline [168]. Ce sont « des produits microbiens, ou dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance ». Leur action est spécifique et dirigée seulement contre les micro-organismes et ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes. L'action des antibiotiques peut s'exercer soit sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance (effet bactériostatique) ou encore à la survie des bactéries (effet bactéricide) [169].

La majorité des antibiotiques sont des molécules d'origine naturelle, de faible masse moléculaire (les pénicillines) ou sous forme de gros peptides (la teicoplanine). Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique et sont alors obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes [170, 171]. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des microorganismes, et sont divisés en trois classes: 1/ les sulfamides, premiers antibiotiques utilisés cliniquement [168]; 2/ les quinolones (ou fluoroquinolones), découverts lors de la synthèse de la chloroquine, antipaludéen en 1962; 3/ Les oxazolidinones, découvertes en 1979 [171].

#### **1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques**

Le mode d'action des antibiotiques actuellement utilisés en clinique a été déterminé après leur découverte. La majorité des antibiotiques exercent leur action soit par inhibition de la paroi cellulaire bactérienne, soit par synthèse protéique (Figure 16). Les exceptions sont les quinolones qui inhibent la synthèse de l'ADN, et les sulfamides qui inhibent la synthèse des métabolites utilisés pour la synthèse de l'ADN [171].



**Figure 16:** Mode d'action des antibiotiques [171]

## 2. La résistance aux antibiotiques et principaux mécanismes de résistance

La résistance aux antibiotiques est actuellement un véritable problème de santé publique. Chaque jour, de nouveaux mécanismes de résistance se propagent à l'échelle mondiale, ce qui augmente la difficulté de traiter les maladies infectieuses les plus courantes.

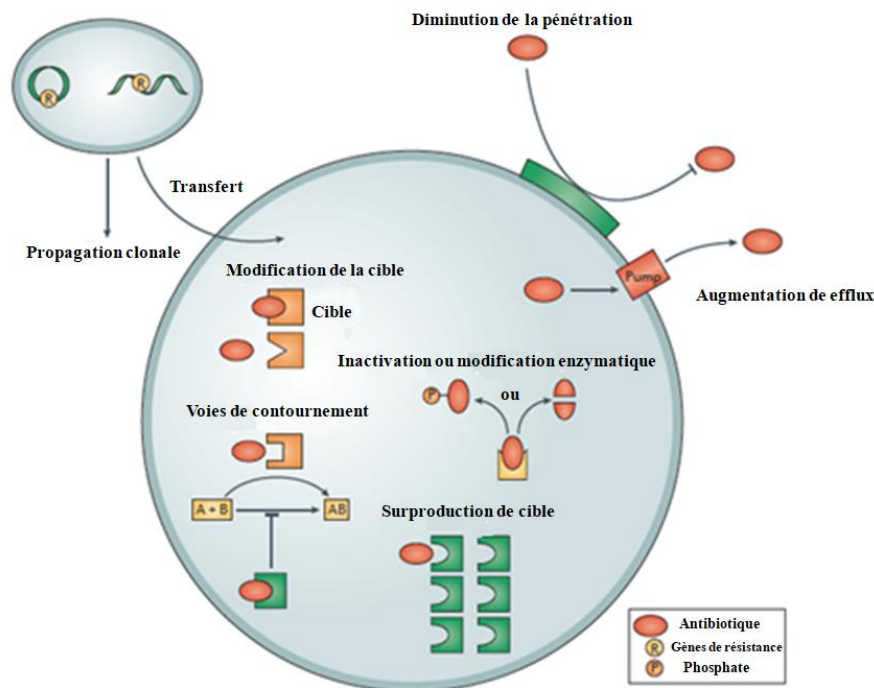
On décrit deux types de résistance:

- ✓ **Résistance naturelle (intrinsèque):** capacité à résister à l'action d'un antibiotique en raison de caractéristiques structurales ou fonctionnelles inhérentes déterminées par des gènes naturels dans le chromosome des bactéries [172, 173];
- ✓ **Résistance acquise:** implique des mutations dans les gènes cibles de l'antibiotique et le transfert des déterminants de la résistance portés par le matériel génétique mobile [173]. Le transfert de gènes bactériens se fait par trois mécanismes: Transformation (absorption et incorporation de l'ADN nu), Conjugaison (mécanisme de transfert d'ADN dépendant du contact avec les cellules) et Transduction (l'ADN hôte est encapsulé dans un bactériophage qui agit comme vecteur vers une cellule réceptrice) [174].

La résistance bactérienne peut être médiée par plusieurs mécanismes (Figure 17) [172, 175]:

- ➔ En réduisant les concentrations intracellulaires de l'antibiotique par diminution de la pénétration (manque de porines) dans la bactérie ou augmentation de l'efflux;

- En modifiant ou inhibant la cible antibiotique par mutation génétique ou post-traductionnelle
- En introduisant une nouvelle cible résistante avec surproduction de mécanismes de dérivation ou d'autres mécanismes de contournement
- En désactivant l'antibiotique par hydrolyse ou modification.



**Figure 17:** Mécanismes de résistance aux antibiotiques [176]

En outre, le même type de mécanisme de résistance aux médicaments peut être spécifié par de nombreux gènes différents, et plus d'un type de mécanisme peut fournir une résistance au même antibiotique [177].

### 3. Les infections nosocomiales

Une infection nosocomiale (IN) ou infection d'origine hospitalière est une infection qui se déclare chez un patient hospitalisé après son admission. Les infections nosocomiales représentent la complication la plus fréquente affectant les patients hospitalisés. Elles sont localisées essentiellement au niveau du tractus urinaire, des plaies opératoires, des voies respiratoires inférieures, du sang (septicémies) et du système digestif [178, 179].

Les microorganismes responsables des infections nosocomiales sont classés en trois grandes catégories: bactéries, virus et champignons. Les bactéries sont les germes les plus fréquemment incriminés, surtout les bactéries aérobies et aéro-anaérobies [180, 181].

## 4. Les bactéries pathogènes étudiées

### 4.1. Bactéries à Gram négatif

Germes les plus fréquemment retrouvés en hospitalier, avec prédominance d'*E.coli* et *pseudomonas aeruginosa* [182].

#### a. *Escherichia Coli* (*E. Coli*)

Ce genre appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les entérobactéries sont les hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. De nombreuses souches ont été isolées dans l'environnement aquatique ou terrestre. A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers [183]. Certains de ces pathotypes sont responsables des infections du tractus urinaire. Selon un rapport publié en 2012 dans la revue *Emerging Infectious Diseases*, les *E. coli*, sont responsables de plus de 85% de toutes les infections urinaires et présentent souvent une résistance multiple aux antibiotiques (objectivée sur antibiogramme) [184].

Ces bactéries sont facilement cultivées sur milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organiques comme source d'énergie: sucres, acides aminés, acides organiques. La plupart des entérobactéries pathogènes se multiplient à la température optimale de 37 °C [183].

#### b. *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre *Pseudomonas* fait partie de la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de ce genre sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes. Les *Pseudomonas* sont cultivés facilement sur les milieux d'usage courant en aérobiose, à la température de 30 °C. Certaines espèces (*Pseudomonas aeruginosa*) se cultivent à 41 °C et même à 43 °C; ce caractère étant utilisé pour le diagnostic.

Ces bactéries sont capables d'utiliser une variété très large de substrats comme source de carbone et d'énergie. Fréquemment isolées sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, elles sont caractérisées particulièrement par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est à l'origine des infections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, diabétiques, etc...). Aussi, il est très

fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections urinaires, infections pulmonaires et cutanées) [183, 184].

#### **4.2. Bactéries à Gram positif**

Les bactéries à gram positif sont isolées dans 20 à 30% des infections hospitalières [182, 185]. Les plus connues:

##### **a. *Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques, bactéries à Gram positif, sont de forme sphérique et se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers sous forme d'une grappe de raisin, d'où leur nom (staphylos tiré du grec). Ce sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme (air, eau et sol) et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères.

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*) est responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses, mais aussi osseuses (ostéomyélites), digestives (entéocolites post-antibiotiques), et septicémiques. Aussi l'espèce *Staphylococcus aureus* est la première cause d'infections nosocomiales provoquées par les bactéries gram positif [186].

##### **b. *Enterococcus faecalis***

C'est un germe à Gram positif, anaérobie facultatif, immobile, oxydase et catalase négatives. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) est un pathogène opportuniste des voies gastro-intestinales et uro-génitales. Il est considéré parmi les pathogènes nosocomiaux les plus communs et responsable de plusieurs types d'infections, à savoir urinaires, intra-abdominales, pneumonies, septicémies, endocardites et méningites. Les entérocoques sont actuellement la deuxième cause d'infections nosocomiales parmi les bactéries gram positif après les *Staphylococcus aureus* [185, 187].

#### **5. Place des HEs et le miel dans l'activité antibactérienne**

Plusieurs produits naturels de structures complexes et diversifiées sont retrouvés dans presque toutes les sources biologiques (plantes, HEs, miel...). Ces dernières constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de

résistances aux antibiotiques. En effet, de nombreux composés dans ces produits ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes.

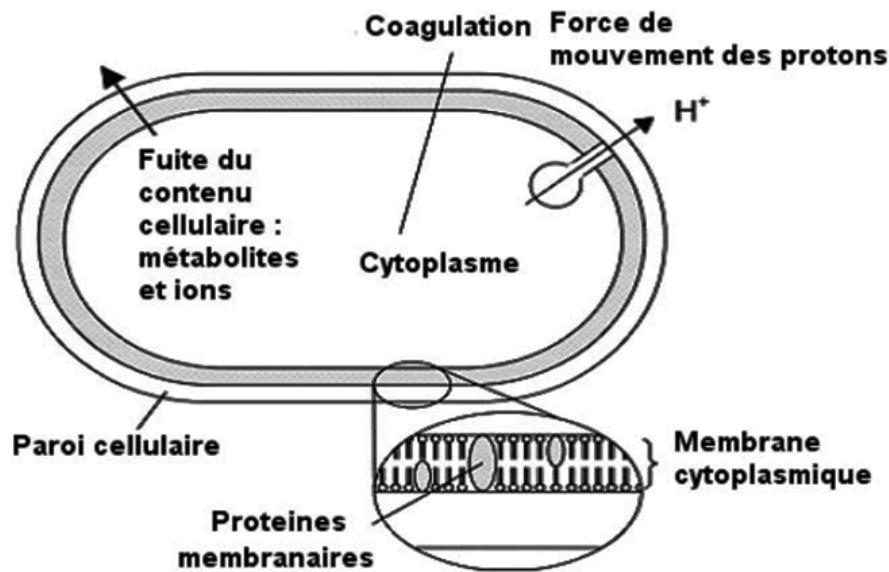
### **5.1. Activité antibactériennes des huiles essentielles**

La première découverte de l'effet antibactérien des huiles essentielles a été mise au point en 1881 par Delacroix [188]. Leur action est large contre un éventail de bactéries: BGP, BGN, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Souvent, les bactéries Gram négatives semblent moins sensibles à leur activité antibactérienne et ceci est lié directement à la structure et la composition de leur paroi cellulaire [82]. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre [189].

Actuellement, le problème majeur de la santé publique est la résistance aux antibiotiques qui est un phénomène biologique que la médecine aura du mal à résoudre. Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques naturellement au cours de l'évolution. Alors, une meilleure utilisation des antibiotiques ne pourra que ralentir l'extension des résistances et la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité. Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

#### **a. Mode d'action des huiles essentielles**

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action sur différentes cibles cellulaires. Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont: altération de la paroi cellulaire, dégradation de la membrane cytoplasmique, altération des protéines membranaires, la fuite du contenu cellulaire, la coagulation du cytoplasme et l'épuisement de la force de mouvement des protons (Figure 18) [82, 189].



**Figure 18:** Effets des HEs et de leurs constituants sur la cellule bactérienne [82]

De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés séparément. Cependant il existe des différences quantitatives. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément [190, 191].

Les huiles essentielles sont caractérisées principalement par leur hydrophobicité. Ceci permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire [192]. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires. La perte de matériel cytoplasmique entraîne l'éclatement cellulaire [193, 194]. Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Les composés chimiques des huiles essentielles connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures [195, 196]. Selon Lambert et *al*, l'association des principaux composés actifs agirait de façon synergique en potentialisant l'action antimicrobienne de l'huile essentielle [197].

## 5.2. Activité anti bactérienne du miel

L'activité antimicrobienne du miel a déjà été démontrée par l'intermédiaire des multiples recherches réalisées au cours de ces dernières décennies sur un large spectre des

souches bactériennes. Le pouvoir antibactérien du miel provient essentiellement des facteurs suivants:

#### **a. Les Propriétés physiques**

- **L'osmolarité:** conséquence de la forte teneur en sucre du miel. Le miel agit ainsi d'une manière osmotique. Une solution hypertonique provoque une déshydratation osmotique qui absorbe l'eau vitale des micro-organismes [198, 199].

- **Effet du pH:** Le pH du miel varie de 3,2 à 4,5 en moyenne. Certains miels originaires du Pakistan ont des pH alcalins allant jusqu'à 6,3. Un pH acide est un milieu défavorable au développement de la plupart des germes [200].

#### **b. Le peroxyde d'hydrogène**

L'eau oxygénée aussi appelée peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est considérée comme l'inhibiteur principal contenu dans le miel. Elle est produite par réaction enzymatique initiée par le glucose oxydase, sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel. Cette réaction n'est active qu'en présence d'eau. Au contraire, elle sera bloquée dans un miel « mûr » mais pourra être toutefois réactivée par dilution [199, 201].

#### **c. Facteurs non peroxydes**

Les facteurs « non peroxydes » sont nombreux et ne sont pas tous identifiés. Certains composés chimiques ayant une activité antibactérienne ont été identifiés par différents chercheurs:

- **Défensine-1:** protéine sécrétée chez les abeilles par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires pour ensuite être directement rajoutée au miel. Elle exerce une action bactéricide sur de nombreux germes Gram positif [202, 203].

- **Inhibines dites « non peroxydes »:** ces inhibines ne sont pas produites par l'enzyme glucose oxydase à l'inverse du peroxyde d'hydrogène, mais elles exercent la même fonction qui est de ralentir ou inhiber la croissance des bactéries. En fait, ce sont majoritairement des substances phytochimiques issues de la source mellifère. Il s'agit de lysozymes, flavonoïdes, des dérivés phénoliques ou encore des acides aromatiques et autres composants, tous encore mal caractérisés [204].

- **Méthylglyoxal (MGO):** est une substance bactéricide présente dans le miel, synthétisée lors du stockage du miel par conversion du dihydroxyacétone, composé naturellement présent dans le nectar des fleurs [205–207].



- **Glycoprotéines (GPs):** Les protéines glycosylées sont des substances antimicrobiennes présentes dans les miels et sont responsables de la résistance aux maladies. Ils augmentent la perméabilité de la membrane externe des bactéries et altèrent la paroi cellulaire via la destruction de la couche de lipopolysaccharides. Les peptides antimicrobiens (jellein 1, 2 et 4, MRJP-1) sont des protéines omniprésentes dans tous les types de miels. Des études ont montrés que les GPs isolées du miel agissent selon deux mécanismes distincts. La présence de structures à haute teneur en mannose ciblant spécifiquement et agglutinant les cellules bactériennes explique d’abord l’activité « like-lectine » de la MRJP- 1, tandis que les peptides antimicrobiens qu’elle contient (jelleins) sont responsables de l’augmentation de la perméabilité membranaire et des altérations de la paroi bactérienne. L’activité bactéricide et bactériostatique de la glycoprotéine MRJP-1 est de plus, directement corrélée à l’activité antimicrobienne globale du miel, ce qui suggère que cette substance y joue un rôle précurseur [208].

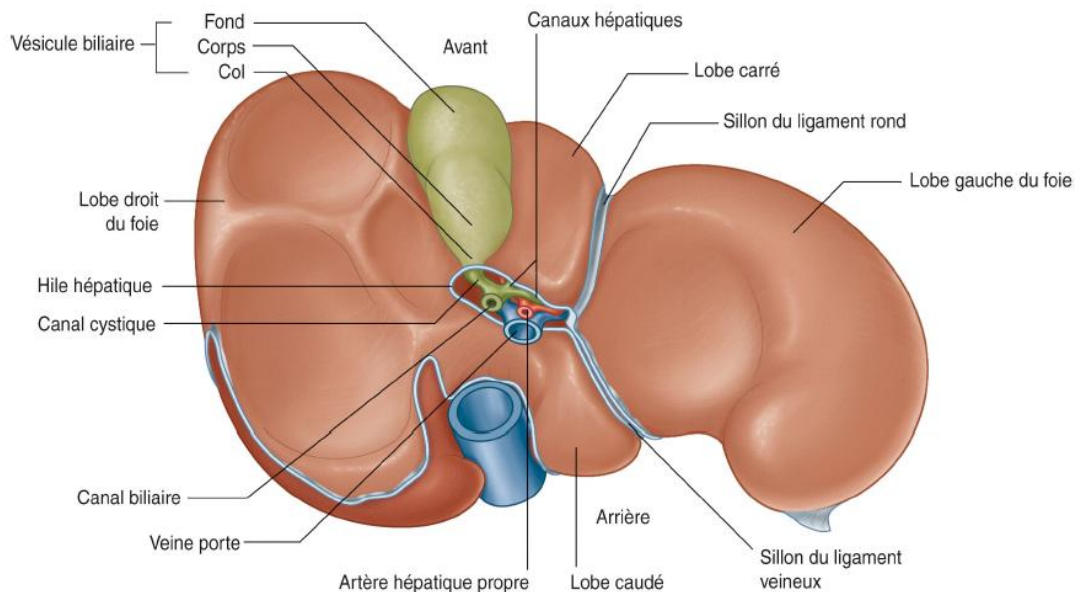
#### **d. Présence des bactéries lactiques**

Nombreuses souches de bactéries lactiques (LAB) appartenant au genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* non pathogène ont été identifiées. Ces LAB produisent une importante quantité de métabolites bioactifs bactéricides: des acides organiques (acide lactique, acide formique et acide acétique) et des substances volatiles (benzène, éthylbenzène, xylène, toluène, octane ou nonane). En outre, certaines LAB produisent divers acides gras libres, des protéines et du 2-heptanone, analgésique naturel. Cependant, ces LAB ne sont présentes que dans le miel frais pendant quelques semaines [209].

## Chapitre V: Fonction hépatique et hépto-toxicité par CCl<sub>4</sub>

### 1. Rappel anatomo-pathologique du foie

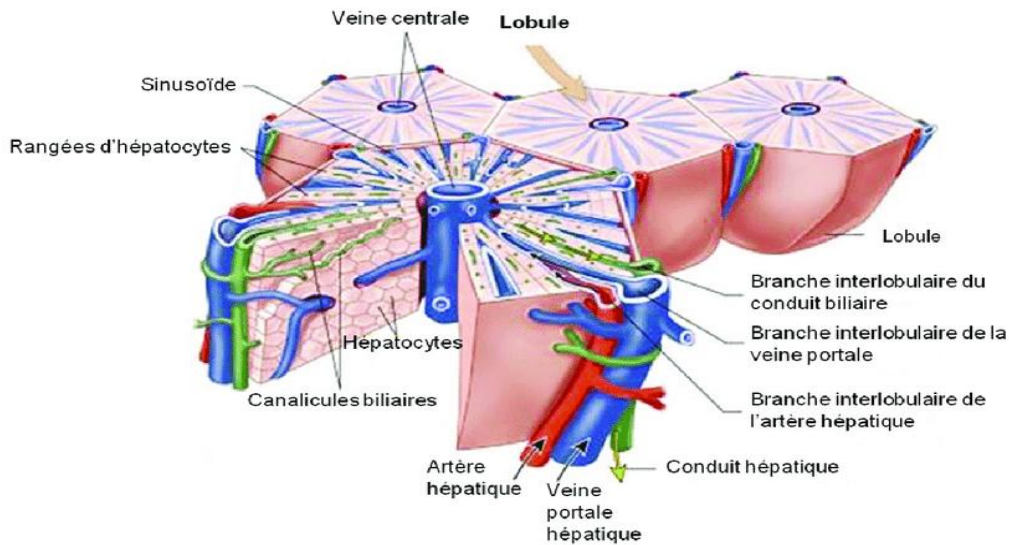
Le foie est la glande la plus volumineuse du corps humain. Pesant 1,5 Kg, il est localisé du côté droit supérieur de l'abdomen et protégé par la cage thoracique. Il contient plus de 10% du volume sanguin total du corps, et est traversé par 1,4 litres de sang en moyenne/min (pour un adulte). Sa surface, recouverte en grande partie de péritoine et d'une capsule fibreuse, est lisse. Il se compose de 4 lobes asymétriques dont les principaux sont le lobe gauche qui est le plus volumineux et le lobe droit qui est le plus étroit séparés par le ligament falciforme (Figure 19). La vascularisation hépatique a la particularité d'être mixte, c'est-à-dire que le sang est fourni jusqu'au foie par deux voies différentes, correspondant à deux vaisseaux majeurs: l'artère hépatique et la veine porte. En pénétrant dans le foie, ces vaisseaux se divisent jusqu'à former un réseau très dense de vaisseaux extrêmement fins. Le sang apporté par l'artère hépatique provient de l'aorte et amène donc du sang oxygéné. Dans la seconde voie, le sang apporté par la veine porte provient de l'appareil digestif et est donc riche en nutriments. Environ 75% de l'apport sanguin au foie provient de la veine porte [210–212].



**Figure 19:** Faces viscérales du foie [210]

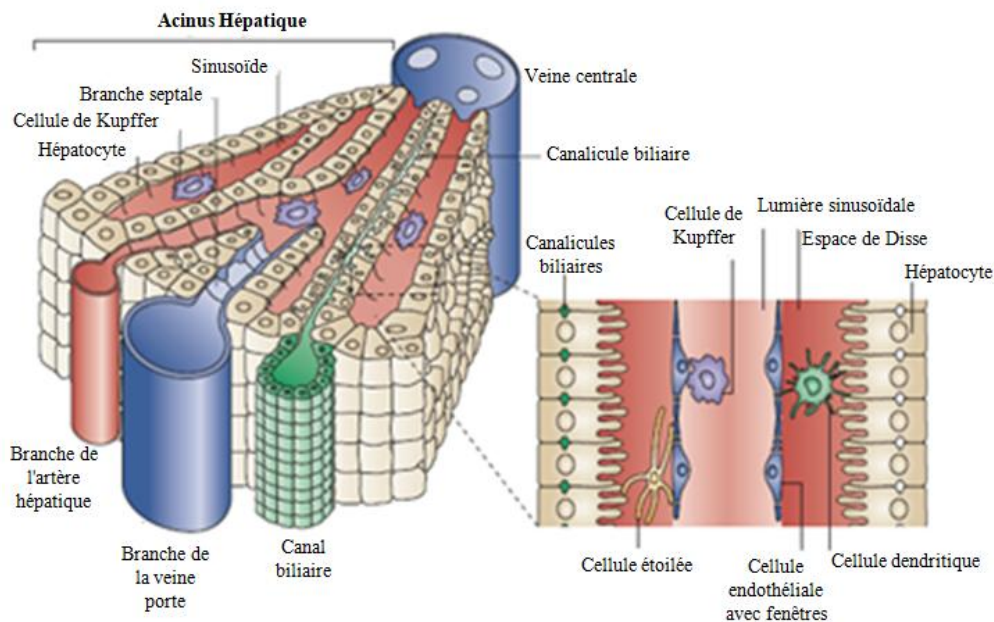
Sur le plan histologique, le foie se présente comme un ensemble d'unités hexagonales: les lobules hépatiques (unité fonctionnelles du foie) [213]. Le foie est constitué de millions de lobules hépatiques dont chacun contient plusieurs milliers de cellules hépatiques, reliées entre elles en délimitant des lacunes hépatiques à l'intérieur desquelles cheminent les sinusoides hépatiques [214-216]. Le lobule est constitué de milliers de cellules hépatiques. Elles sont

organisées de façon complexe pour assurer d'une part la production et l'écoulement de la bile, et d'autre part les échanges avec le sang (Figure 20) [217].



**Figure 20:** Les lobules hépatiques

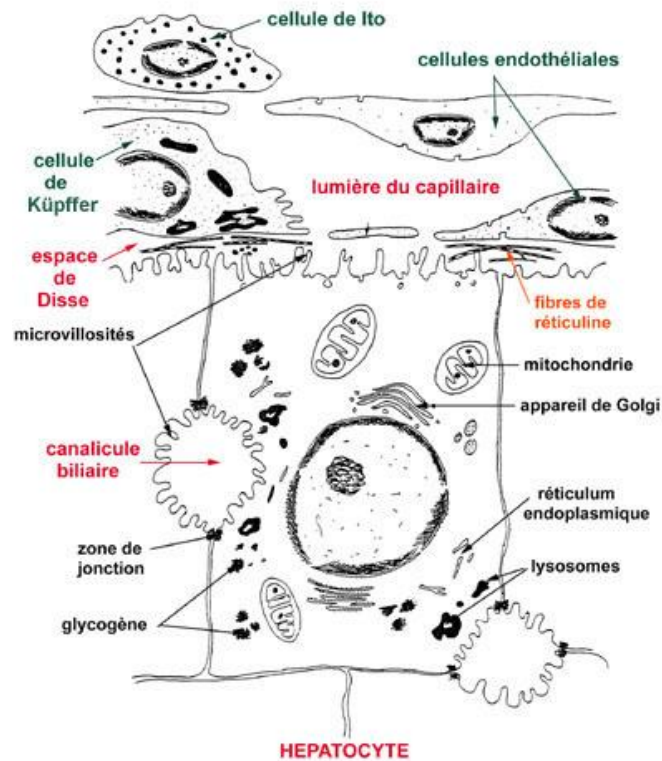
On distingue dans un lobule différents composants cellulaires (Figures 21 et 22): les cellules parenchymateuses ou hépatocytes (65%) et les cellules sinusoidales (cellules endothéliales 20%, cellules de Kupffer 10% et cellules étoilées du foie) dont les rapports sont schématisés dans la figure 21 [215].



**Figure 21:** Structure tridimensionnelle du lobule du foie [218]

**Les Hépatocytes:** sont des cellules polyédriques de grande taille à noyau volumineux et dont le cytoplasme est riche en organites. Ils sont responsables de la formation de la bile et des différentes transformations métaboliques. L'hépatocyte a une double polarité. Sa face

sinusoïdale est en contact intime avec le sang portal via la cellule endothéliale. C'est une zone d'échanges intenses où la cellule puise les éléments nécessaires à ses activités de synthèse (lipides, protides et glucides) et de catabolisme (xénobiotiques, hormones...) et déverse les produits de ces activités. Sa face biliaire délimite le **canalicule biliaire**, espace sans paroi propre défini par le repli des membranes de deux hépatocytes adjacents. La bile secrétée par l'hépatocyte chemine dans ce système canaliculaire avant de le **canal biliaire** de l'espace porte [210, 217, 219, 220].



**Figure 22:** les cellules du foie [221]

Les **cellules endothéliales** empêchent le sang de s'immiscer dans l'espace de Disse tout en autorisant, via les pores, les échanges entre le plasma et l'hépatocyte. Elles sont structurées de façon à favoriser les échanges entre le secteur sanguin et les cellules hépatiques [222, 223].

**Les cellules de Kupffer:** sont des macrophages situés à l'intérieur de la sinusoïde, dont la fonction est l'épuration du sang sinusoïdal des impuretés non arrêtées par la barrière intestinale (endotoxines bactériennes, particules minérales ou virales...). De plus, elles participent à l'homéostasie hépatique en produisant, suite à leur activation, de grandes quantités de facteurs de croissance, de cytokines inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) [223, 224].

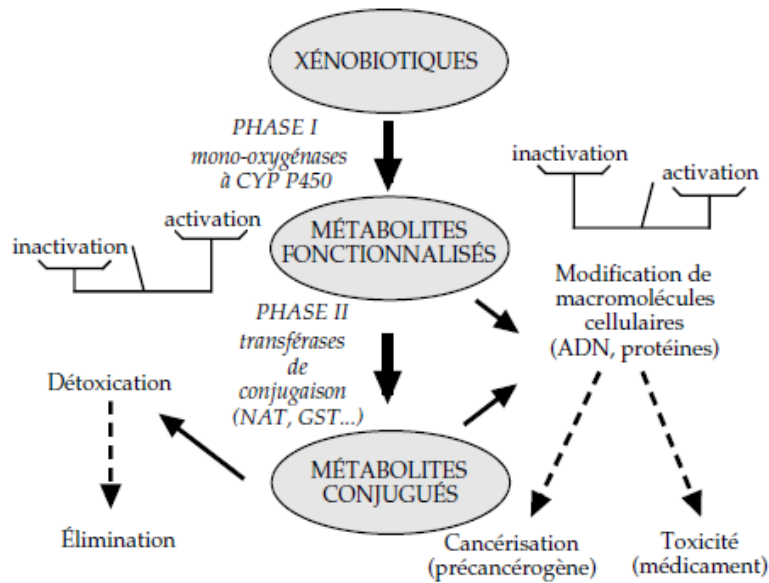
**Les cellules étoilée du foie:** (= cellules de Ito ou cellules péricapillaires) sont situées dans l'espace de Disse et ont pour fonctions le stockage de la vitamine A et la synthèse de la matrice extracellulaire hépatique [210, 216, 218, 223].

## 2. Fonctions du foie

Le foie assure de nombreuses fonctions variées et essentielles pour le bon fonctionnement de l'organisme. C'est l'organe majeur du métabolisme avec plus de 500 fonctions métaboliques grâce à la grande quantité de sang que lui apportent l'artère hépatique, provenant du cœur, et la veine porte hépatique, issue de l'intestin grêle. Il participe au métabolisme des lipides, glucides et des protéines plasmatiques et ses produits sont libérés dans la circulation sanguine, tels que le glucose, les facteurs de coagulation, ou l'urée. Le foie assure également une fonction de stockage du glycogène, des lipides, des vitamines liposolubles et des oligo-éléments, comme le fer [225].

Enfin, le foie joue en particulier un rôle majeur dans les mécanismes de détoxification des agents toxiques endogènes ou exogènes, via ses capacités de biotransformation (figure 23) basée sur des réactions enzymatiques permettant la formation de métabolites non toxiques qui seront éliminés par l'organisme. Il arrive parfois que cette transformation produise un métabolite plus toxique que le composé mère, la réaction est alors requalifiée en « bioactivation ». La biotransformation a lieu dans les microsomes des hépatocytes selon deux phases réactives: la phase I de transformation chimique, et la phase II de conjugaison. L'ensemble de ces deux phases n'est pas obligatoire pour métaboliser un médicament. Certains médicaments seront métabolisés grâce à une unique réaction de phase I ou II, d'autres par la succession des deux phases.

- Les enzymes de phase I vont permettre d'exposer ou d'ajouter des groupements fonctionnels à la molécule. Ces enzymes sont appelées les cytochromes P450 (CYP) et elles réalisent des actions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse.
- Les enzymes de phase II consistent à transférer sur un site réactif des groupes sulfate, méthyl, acétyl, ou glucuronate, ce qui augmente l'hydrosolubilité de la molécule transformée. On parlera alors de sulfo-conjugaison, d'alcylation, d'acétylation ou de glucuro-conjugaison. Les enzymes impliquées sont des transférases (exemple: glucuronyl transférase). Ces réactions vont faciliter l'excrétion des molécules cibles modifiées via les transporteurs membranaires [225].

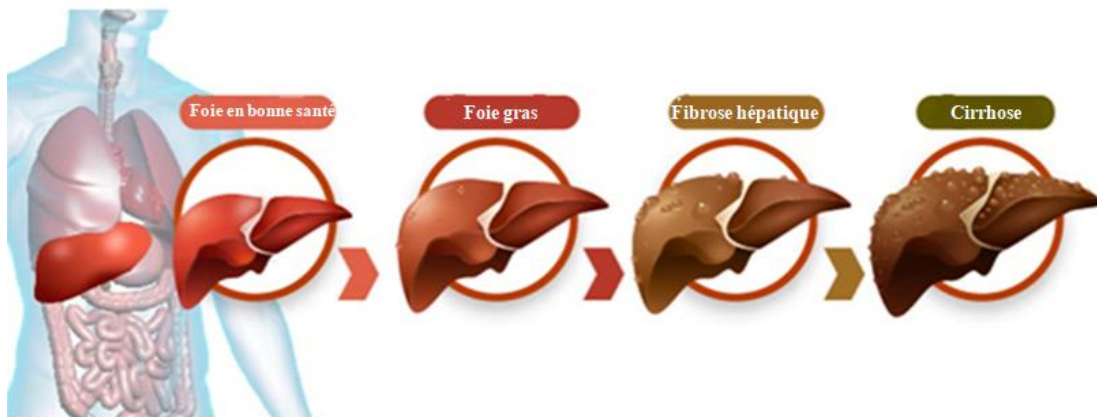


**Figure 23:** Biotransformation des xénobiotiques. CYP: mono-oxygénase à cytochrome P450 ; NAT: *N*-acétyltransférase; GST: glutathion *S*-transférase [225]

### 3. La fibrose hépatique

La fibrose hépatique est un véritable enjeu de santé publique dans tout le monde. Elle est le résultat d'un processus de réparation tissulaire perturbé en réponse à des agressions le plus souvent répétées. Ces agressions sont multiples: les hépatites B et C, l'alcoolisme, les stéatopathies non alcooliques, les syndromes métaboliques, l'insulino-résistance, le diabète, les hépatites autoimmunes...

Le processus fibrotique est caractérisé par des modifications quantitatives et qualitatives des composants de la matrice extra cellulaire et une accumulation de tissu cicatriciel. La progression de la fibrose est plus ou moins rapide en fonction du contexte pathologique (Figure 24) et la cirrhose en constitue le stade ultime.



**Figure 24:** Les stades de la fibrose hépatique

La cirrhose, en véritable désorganisation de l'architecture du foie, est associée à une perte de l'homéostasie cellulaire liée à l'apoptose hépatocytaire massive et peut conduire à une insuffisance hépatocellulaire et rénale avec formation d'ascite, encéphalopathie (signe neurologique de la diminution de la capacité de détoxification du foie), hypertension portale et carcinome hépatocellulaire (CHC) [225–228].

#### **4. Modèles d'étude de la fibrose hépatique**

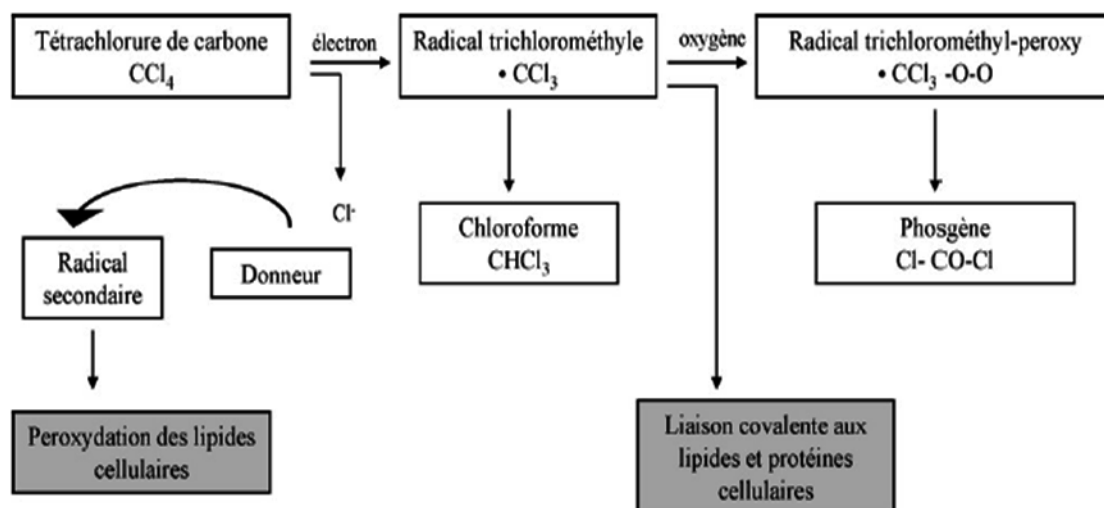
De nombreuses méthodes *in vitro* et *in vivo* sont utilisées pour étudier la fibrose du foie: les lignées cellulaires (GRX, hepG...), l'exposition à des xénobiotiques (éthanol, le tétrachlorure de carbone, le Thioacetamide...), modèles basés sur des régimes alimentaires spéciaux, modèles de cirrhose biliaire secondaire, modèles infectieux ... [225]

Dans notre recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet des substances naturelles (miel, huile essentielle et leur mélange) sur les dommages hépatiques induits par le tétrachlorure de carbone (modèle d'exposition à des xénobiotiques).

##### **4.1. Le tétrachlorure de carbone**

Le tétrachlorure de carbone (halogène organique volatil) était autrefois largement utilisé comme solvant, nettoyant et dégraissant à la fois pour un usage industriel et domestique. Aujourd'hui, CCl<sub>4</sub> s'avère très utile comme modèle expérimental pour l'étude de certains effets hépatotoxiques (une seule exposition entraîne rapidement une nécrose hépatique sévère et la stéatose) [229–231]. Chez l'homme, Le tétrachlorure de carbone est absorbé principalement par inhalation et par voie orale. Chez l'animal, Le tétrachlorure de carbone est rapidement absorbé par le tractus intestinal. Environ 50% du tétrachlorure de carbone sont excrétés inchangés, l'autre partie étant métabolisée dans le foie. Une quantité minimale est excrétée dans les urines et les fèces. Du fait de ses propriétés lipophiles, le tétrachlorure de carbone s'accumule dans les tissus riches en graisses, comme le tissu adipeux, le foie et la moelle osseuse [232].

La toxicité du CCl<sub>4</sub> ou de ses métabolites peut résulter d'interactions covalentes (primaires) avec des molécules cibles critiques telles que l'ADN, les lipides, les protéines ou les glucides ou de l'altération des molécules cibles par la formation de liaisons secondaires (peroxydation lipidique, génération d'oxygène réactif espèces, altération du glutathion réduit ou oxydé, GSH / GSSG) (figure 25) [233, 234].



**Figure 25:** Activation métabolique du tétrachlorure de carbone à l'origine de son hépatotoxicité [233]

Le foie est le site de prédilection pour les effets induits par le  $\text{CCl}_4$  en l'absence de "récepteur" spécifique [231].

#### 4.2. Aspects mécaniques de la toxicité du tétrachlorure de carbone

Les réponses hépatocellulaires aux haloalcanes peuvent être soit bénéfiques soit nocives et sont toutes régulées indifféremment par les mêmes effecteurs endogènes comme les cytokines. L'intoxication par le  $\text{CCl}_4$  n'entraîne pas de dommages hépatiques permanents si les mécanismes homéostatiques arrivent à compenser l'agression en restaurant l'approvisionnement en énergie et en remplaçant les molécules modifiées ou les cellules mortes. Ainsi, la séquence des réactions de la cellule hépatique en réponse aux métabolites  $\text{CCl}_4$  consiste en des dérangements initiaux des structures subcellulaires, suivis par des altérations réversibles du métabolisme cellulaire, provoquant des dommages secondaires aux conséquences pathologiques [234]:

##### a. Le $\text{CCl}_3^*$ radical, l'haloalkylation et l'inactivation du cytochrome P450

Le métabolisme de  $\text{CCl}_4$  commence par la formation du radical libre trichlorométhylé  $\text{CCl}_3^*$ . Le cytochrome isozyme CYP2E1 est majoritairement responsable de cette biotransformation [235]. Le radical  $\text{CCl}_3^*$  résultant se lie de manière covalente au CYP2E1, provoquant ainsi une inactivation par suicide du cytochrome P450. Le radical  $\text{CCl}_3^*$  réagit aussi avec diverses substances biologiquement actives telles que les acides aminés, les nucléotides et les acides gras, ainsi que les protéines, les acides nucléiques et les lipides [236, 237].



#### **b. Le radical $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ , la peroxydation lipidique et les lésions membranaires**

En présence d'oxygène, le radical  $\text{CCl}_3^*$  est converti en radical trichlorométhyl peroxy,  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$  (figure 25), plus réactif. Ce dernier est beaucoup plus susceptible que le  $\text{CCl}_3^*$  d'abstraire l'hydrogène des acides gras polyinsaturés (AGPI), amorçant ainsi le processus de peroxydation des lipides. L'abstraction d'un hydrogène à partir d'acide gras déclenche une série complexe de réactions qui aboutissent à la désintégration complète de la molécule d'AGPI avec la formation d'aldéhydes, d'autres carbonyles et d'alcanes. Ce processus entier est appelé peroxydation lipidique [231, 233].

#### **c. Aldéhydes réactifs**

Les composés carbonylés formés en tant que produits de dégradation de la peroxydation lipidique sont en eux-mêmes capables de causer des dommages toxiques aux cellules et peuvent contribuer davantage à des lésions hépatiques. Ils inhibent les enzymes, endommagent l'ADN et bloquent la sécrétion de lipoprotéines [231].

#### **d. Hypométhylation induite par le tétrachlorure de carbone**

Le blocage de la méthylation de l'ADN est également causé par le  $\text{CCl}_4$  [238].

#### **e. Perte d'homéostasie du calcium hépatocellulaire**

Il est reconnu depuis longtemps que le  $\text{CCl}_4$  affecte les niveaux hépatocellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  par blocage des ATPases membranaires [239].

#### **f. Activation des cytokines et facteurs de croissance**

Grand nombre de phénomènes inflammatoires secondaires à une intoxication par le  $\text{CCl}_4$  sont médiés par les cellules de Kupffer et les cellules étoilées. Les cellules de Kupffer, activées par le  $\text{CCl}_4$ , libèrent du  $\text{TNF}\alpha$ , de l'oxyde nitrique, du  $\text{TGF-}\beta$  et des IL-1, IL-6 et IL-10. Les cellules étoilées activées libèrent de l'oxyde nitrique, produisent du collagène en excès et favorisent ainsi la fibrose hépatique [231].

### **4.3. Les traitements de la fibrose du foie induite par $\text{CCl}_4$**

La fibrose hépatique induite par le  $\text{CCl}_4$  est une pathologie complexe faisant intervenir de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires. Ainsi, plusieurs stratégies peuvent être développées pour limiter son développement: les antioxydants et les capteurs des radicaux; inhibiteurs enzymatiques (inhibition du cytochrome P450 et des enzymes cataboliques);

utilisation du S-Adénosyl Méthionine; bloqueurs de calcium et gadolinium désactivateur des macrophages.

#### **a. Rôle des antioxydants dans le traitement de la fibrose**

Il existe un grand nombre de produits naturels, principalement des produits végétaux, provenant souvent de la médecine traditionnelle, à fonction hépato-protectrice. Leurs mécanismes d'action diffèrent largement, beaucoup d'entre eux agissant comme piègeurs de radicaux, d'autres comme inhibiteurs d'enzymes ou encore comme mitogènes.

Les antioxydants et les piègeurs de radicaux ont été utilisés pour étudier le mécanisme de la toxicité du  $\text{CCl}_4$  et pour protéger les cellules du foie contre les dommages induits par le  $\text{CCl}_4$  en interrompant la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. On pense que la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est l'antioxydant lipophile le plus important dans les tissus biologiques. Sa fonction principale est apparemment de protéger les membranes cellulaires des dommages causés par la peroxydation. La supplémentation alimentaire en vitamine E empêche également la production de 4-hydroxycénales et diminue la nécrose des cellules hépatiques.

Plusieurs études montrent que la vitamine E est capable de piéger les radicaux  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ , mais qu'elle n'a aucun effet sur la disponibilité des radicaux  $\text{CCl}_3^*$  et ne peut donc pas empêcher l'haloalkylation. La prométhazine a une activité antioxydante très similaire à celle de la vitamine E. Elle est également capable de bloquer complètement la production des aldéhydes toxiques sous stress oxydatif sans affecter la liaison covalente du radical libre  $\text{CCl}_3^*$ . Le zinc et le sélénium, par mécanisme antioxydant, ont tous été prouvés pour atténuer les dommages induits par le  $\text{CCl}_4$ .

#### **b. Inhibiteurs enzymatiques:**

Plusieurs médicaments comme la cimétidine et la colchicine sont des inhibiteurs du cytochrome P450 et protègent contre la toxicité liée au  $\text{CCl}_4$ .

#### **c. S-Adénosyl Méthionine**

La S-adénosyl-méthionine, un supplément nutritionnel populaire, offre une protection contre la cirrhose induite par le  $\text{CCl}_4$ , tout comme la bétaine. Les deux substances ont en commun d'agir comme donneurs de groupes méthyle, ce qui peut aider à contrebalancer l'inhibition de la méthylation des acides nucléiques induite par le  $\text{CCl}_4$ .

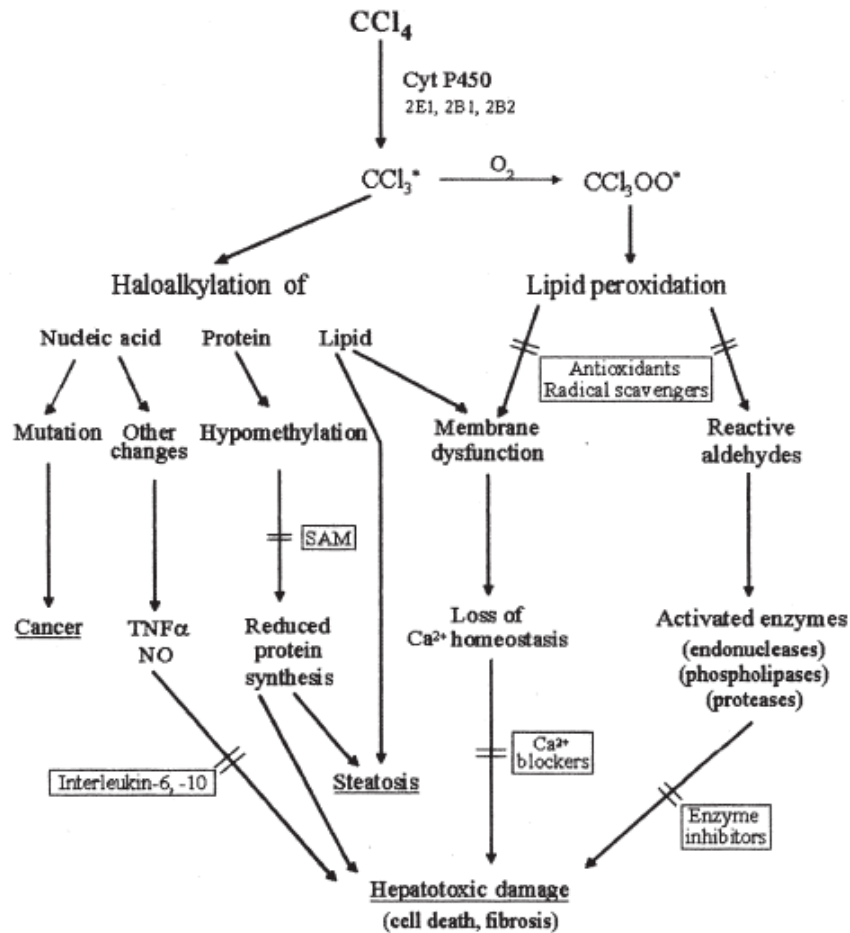
#### **d. Bloqueurs de calcium**

La prévention des perturbations dues au  $\text{Ca}^{2+}$  offre au moins une certaine protection contre la toxicité induite par le  $\text{CCl}_4$ . EGTA, un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$ , empêche les changements induits par le  $\text{CCl}_4$  dans les taux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et peut ou non empêcher la mort cellulaire subséquente.

#### **e. Le gadolinium désactivateur des macrophages**

Il est s'avérer utile dans la prévention des lésions d'ischémie / reperfusion associées à une transplantation hépatique. En ce qui concerne la toxicité induite par les haloalcanes, il semble agir principalement en inactivant les cellules de Kupffer. Cependant, le gadolinium présente plusieurs autres actions qui sont probablement impliquées dans la protection contre la toxicité induite par le  $\text{CCl}_4$ . Il favorise la récupération des lésions hépatiques par stimulation de la réplication hépatocytaire (mais pas des cellules de Kupffer ou des cellules étoilées).

En résumé (Figure 26): Pendant longtemps, la toxicité du  $\text{CCl}_4$  et d'autres haloalcanes de structure chimique comparable a été attribuée à l'un des mécanismes: liaison des métabolites covalents, peroxydation des lipides, aldéhydes réactifs, hypométhylation des acides nucléiques, perte d'homéostasie du calcium ou cytokines inflammatoires. Les principaux déterminants de l'évolution de l'action de  $\text{CCl}_4$  vers la régénération et la récupération complète, ou la nécrose catastrophique avec dégénérescence graisseuse, cirrhose et même cancer semblent être respectivement la dose et le temps d'exposition, la présence d'agents potentialisateurs et pression. Plusieurs messagers cellulaires ont été proposés comme agents pouvant diriger une cellule soit vers la récupération, à savoir IL-6 et IL-10, soit vers la destruction, à savoir, NO,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TGF-}\alpha$  et  $\text{TGF-}\beta$  [231]. L'intervention à l'un des procédés de toxicité mentionnés ci-dessus peut prévenir des lésions hépatiques plus graves, principalement l'utilisation d'antioxydants (par exemple: le miel et huile essentielle), d'agents mitogènes, la restauration de la méthylation des acides nucléiques ou des médicaments qui aident à maintenir la séquestration du calcium cellulaire.



**Figure 26:** Mécanismes des dommages au foie induits par le tétrachlorure de carbone. Souligné: points finaux d'hépatotoxicité CCl<sub>4</sub>. SAM = S-adenosyl méthionine; TNF α = facteur de nécrose tumorale α; NO = oxyde nitreux; TGF-α, -β = facteur de croissance transformant [231]

# **Deuxième Partie**

## **Etude Expérimentale**

## Chapitre I

### Caractérisations physicochimiques des miels et de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

**Article 1: Hamada Imtara, Youssef Elamine, Badiâa Lyoussi.** Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare L.* Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018. (Publié)

**Article 2: Hamada Imtara, Youssef Elamine, Badiâa Lyoussi.** Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. Food Science & Nutrition. 2018. (Publié)

## 1. Introduction

L'utilisation des miels et des huiles essentielles dans le domaine alimentaire, cosmétique et thérapeutique se base essentiellement sur la qualité des matières premières mises en œuvre et la formulation du produit fini. Les HEs et le miel font partie des produits les plus utilisés dans différents domaines. La détermination des matières premières doit être précisément identifiée, contrôlée selon des procédés définis et conservés de façon satisfaisante, alors une caractérisation physico-chimique, organoleptique et chromatographique reste la meilleure approche pour garantir leur qualité

Les HEs sont utilisées depuis des siècles dans différents domaines grâce à leurs propriétés biologiques intéressantes. Souvent, certaines HEs peuvent être toxiques d'où la nécessité de leur caractérisation afin de déterminer les risques de toxicité. Les miels aussi pourraient être toxiques lorsqu'ils perdent leur qualité dans des conditions non propres, cela exige leur identification et caractérisation.

La qualité d'un miel s'évalue depuis longtemps par des analyses, et le comité international du miel le Codex Alimentarius a donc établi des standards de contrôle de qualité pour considérer un échantillon de miel comme étant valable pour la consommation humaine. Les principaux critères qui déterminent la qualité du miel sont les propriétés physico-chimiques (la conductivité électrique, la teneur en humidité, les sucres réducteurs et non réducteurs, l'acidité libre, l'activité diastase, la teneur en cendres, la teneur en HMF et en protéines...), analyses polliniques et les propriétés organoleptiques [1, 93]. Par ailleurs, les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des HEs sont des normes établies par l'AFNOR et la Pharmacopée pour déterminer les qualités des HEs. Aussi, les matières premières doivent être précisément identifiées, contrôlées selon des procédés définis, et conservés de façon satisfaisante [53].

Pour cela, dans ce chapitre nous avons procédé à une caractérisation physico-chimique des différents échantillons de miel de Palestine et du Maroc ainsi que la caractérisation de l'HE d'*Origanum vulgare* récoltée dans la région d'Imouzzar ont été réalisées afin de les comparer avec les normes internationales et bios. Enfin, une analyse statistique se fait par ACP pour déterminer si les paramètres physico-chimiques des miels sont influencés par leur origine géographique.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Analyse des miels

#### a. Echantillonnage

Le matériel biologique objet de ces travaux de recherche est représenté par douze variétés de miel (M 1 à M 12) d'origines botaniques différentes: les miels palestiniens (M 1- M 6), et les miels marocains (M 7- M 12) ont été achetés directement chez des apiculteurs locaux des deux pays. Les échantillons de miel ont été conservés à température ambiante (22-24 °C) dans des récipients en verre jusqu'à l'analyse. L'étiquetage utilisé dans l'étude provient des récipients commerciaux, en plus des informations demandées auprès des apiculteurs. Le tableau 6 résume les informations des échantillons utilisés.

**Tableau 6:** Présentation des échantillons des miels analysés

Miels	Région (Lieu de récolte)	Nom	
		Vernaculaire en arabe	Plantes dominantes
M 1	Al-Khalīl, Palestine	مرار (morar)	<i>Centaurea dumulosa</i>
M 2	Al-Khalīl, Palestine	مرار أخضر (morar akhdar)	<i>Echinops spinosissimus</i>
M 3	Al-Khalīl, Palestine	زحيف (zohif)	<i>Thymus capitatus</i>
M 4	Ramallah, Palestine	رباط (Rabat)	<i>Conyzabonariensis</i>
M 5	Ramallah, Palestine	متعدد الأزهار (multifloral)	<i>Thymus capitatus</i> <i>Origanum syriacum</i>
M 6	Jericho, Palestine	السدر (sader)	<i>Ziziphus spina-christi</i>
M 7	Timahdite, Maroc	زعيترة (thym)	<i>Thymus vulgaris L.</i>
M 8	Khnichet, Maroc	ليمون (limon)	<i>Citrus limon L</i>
M 9	Had Kourt, Maroc	بوشنيخة (bechnikha)	<i>Ammi visnaga L.</i>
M 10	MoulayYacoub, Maroc	كبار (câprier)	<i>Capparis spinosa</i>
M 11	Lakhsas, Maroc	الدغموس (daghmous)	<i>Euphorbia L.</i>
M 12	Chefchaouen, Maroc	أغبوزيه (arbousier)	<i>Arbutus unedo</i>



### b. Détermination de l'Humidité

L'humidité des échantillons a été déterminée en mesurant l'indice de réfraction à 20 °C selon la technique développée par la commission internationale du miel [93]. La conversion en pourcentage illustrant la teneur en eau ou l'humidité des miels est assurée par l'intermédiaire du tableau ci-dessous.

**Tableau 7:** conversion de l'indice de réfraction des miels en pourcentage d'humidité

% d'humidité	Densité (20 °C)	° ou % Brix à 20°C (réfractomètre, plage de 0 à 90)	Indice de réfraction à 20 °C	% Humidité	Densité (20 °C)	° ou % Brix à 20°C (réfractomètre plage de 0 à 90)	Indice de réfraction à 20 °C
13	1.4525	85.66	1.5041	17	1.4239	81.45	1.494
13.2	1.451	85.45	1.5035	17.2	1.4225	81.25	1.4935
13.4	1.4495	85.24	1.503	17.4	1.4212	81.04	1.493
16.6	1.4481	85.03	1.5025	17.6	1.4197	80.83	1.4925
13.8	1.4466	84.82	1.502	17.8	1.4184	80.63	1.492
14	1.4453	84.61	1.5015	18	1.4171	80.42	1.4915
14.2	1.4438	84.39	1.501	18.2	1.4156	80.21	1.491
14.4	1.4428	84.18	1.5005	18.4	1.4143	80.01	1.4905
14.6	1.4409	83.97	1.5	18.6	1.4129	79.8	1.49
14.8	1.4395	83.76	1.4995	18.8	1.4115	79.59	1.4895
15	1.4381	83.55	1.499	19	1.4101	79.39	1.489
15.2	1.4367	83.34	1.4985	19.2	1.4087	79.18	1.4885
15.4	1.4352	83.13	1.498	19.4	1.4074	78.97	1.488
15.6	1.4338	82.92	1.4975	19.6	1.406	78.77	1.4876
15.8	1.4324	82.71	1.497	19.8	1.4046	78.56	1.4871
16	1.431	82.5	1.4965	20	1.4033	78.35	1.4866
16.2	1.4295	82.29	1.496	20.2	1.402	78.15	1.4862
16.4	1.4282	82.08	1.4955	20.4	1.4006	77.94	1.4858
16.6	1.4267	81.87	1.495	20.6	1.3992	77.74	1.4853
16.8	1.4254	81.66	1.4945	20.8	1.3979	77.53	1.4849

### c. Détermination de la Conductivité électrique

La conductivité électrique a été mesurée dans une solution 20% de la matière solide de miel dans de l'eau ultra-pure décarbonisée, à 20 °C, en utilisant un conductivimètre (CD-2005). Selon la technique développée par le comité international du miel [93]. Les tests ont été réalisés en triplicate et les résultats ont été exprimés en milli-Siemens par centimètre (mS/cm).

#### **d. Détermination du pH et acidité**

Le pH a été mesuré dans une solution 10% de miel dans de l'eau ultra-pure décarbonisée, à l'aide d'un pH mètre (WTW Inolab pH 720). L'acidité libre a été obtenue par titration d'une solution de miel (1 g dans 25 ml d'eau ultra-pure décarbonisée) avec une solution d'hydroxyde de sodium 0.05 M jusqu'au point d'équivalence  $pH_e=8,3$ . Cette dernière solution est utilisée pour déterminer l'acidité lactique, 1 ml de la solution de soude 0,05 M a été ajouté, suivi d'une titration avec une solution d'acide chlorhydrique 0,05 M pour revenir au point d'équivalence. L'acidité est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyle de sodium nécessaires pour neutraliser 1 kg de miel [93].

$$\text{Acidité libre} = V \times N \times (1000/M)$$

$$\text{Acidité lactique} = [(1-V) - (0.05 \times V')] \times N \times (1000/M)$$

$$\text{Acidité totale} = \text{Acidité libre} + \text{Acidité lactique}$$

Avec, V: Volume de titration par NaOH,

V': Volume de titration par HCl,

M: Masse du miel,

N: Molarité de la solution de titration.

#### **e. Couleur et teneur en mélanoidines**

La couleur du miel a été déterminée par la mesure de l'absorbance d'une solution aqueuse du miel (50%) à 635 nm dans un spectrophotomètre [241]. L'expression des résultats sur une échelle de Pfund a été faite par conversion des absorbances suivant la formule:

$$\text{mm Pfund} = -38,7 + 371,39 \times \text{Absorbance}$$

Pour la teneur en mélanoidines, elle a été estimée en se basant sur l'indice de brunissement (Absorbance nette =  $A_{450} - A_{720}$ ) [39]. Les mesures spectrophotométriques ont été effectuées dans une cellule en quartz de 1 cm et les résultats ont été exprimés en unités d'absorbance (UA).

#### **f. Teneur en Cendres**

Les capsules en porcelaine ont été mises dans l'étuve à 500 °C, puis dans un dessiccateur jusqu'à stabilisation de leurs poids, 5 g de chaque échantillon ont été pesés dans

les capsules qui ont été mises, d'abord à 105 °C pendant une nuit, puis déplacées à 500 °C pendant 4 heures [93]. Après refroidissement dans le dessiccateur, des pesées des capsules avec les cendres ont été faites et les résultats ont été obtenus en g de cendres par 100 g de miel suivant la formule:

$$W_a = ((m_1 - m_2) / m_0) * 100$$

Avec,  $m_0$ : le poids du miel,

$m_1$ : le poids de la capsule plus les cendres,

$m_2$ : le poids de la capsule.

#### **g. Teneur en minéraux**

Après l'obtention des cendres comme indiqué ci-dessus, 5 ml d'acide nitrique 0,1 M ont été ajoutés et le mélange a été agité sur une plaque chauffante jusqu'au séchage presque complet. Ensuite, 10 ml du même acide ont été ajoutés et le mélange a été complété à 25 ml avec de l'eau distillée [100]. Les composants minéraux ont été déterminés par spectromètre de type ICP-MS à la Cité de l'Innovation de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

#### **h. Teneur en Proline**

Selon la technique développée par le comité international du miel en 2002, le dosage du contenu en proline d'un miel est déterminé selon le principe de réaction de cet acide aminé avec la ninhydrine, plus précisément, selon l'intensité de la coloration du composé formé. Dans un tube en vert, 0,5 ml d'une solution 5% de miel ont été mélangés avec 1 ml d'acide formique (98 à 100%) et 1 ml de ninhydrine (3% dans l'éthylène glycol monométhyléther). Le contenu a été agité pendant 15 min, puis mit dans le bain mari bouillonnant pendant 15 autres minutes et enfin dans un autre bain marie à 70 °C pendant 10 min. Ensuite, 5 ml d'une solution 2-propanol 50% ont été ajoutés, le tube fermé et placé dans la glace. 45 min après, l'absorbance a été lue à 510 nm. Même chose a été réalisée pour le control négatif (eau seulement) et pour le standard de proline (0,8 mg dans 25 ml d'eau distillée) [93]. Enfin, le contenu en proline a été calculé selon la formule:

$$\text{Proline (mg/kg)} = (A_e / A_s) * (P_s / P_e) * 80$$

Avec,  $A_e$ : absorbance de l'échantillon,

$A_s$ : absorbance du standard,

Pe: poids de l'échantillon

Ps: poids du standard.

### **i. Teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF)**

La teneur en HMF a été déterminée en suivant la procédure spectrophotométrique. Dissoudre 5 g du miel dans 25 ml de l'eau distillée et transférer la totalité de la solution dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 0,5 ml de la solution Carrez I (15 g de ferrocyanure de potassium dans 100 ml de l'eau distillée) et mélanger. Puis ajouter 0,5 ml de solution Carrez II (30 g d'acétate de zinc dans 100 ml de l'eau distillé) et mélanger. Remplissez le ballon d'eau distillée (une goutte d'alcool peut être ajoutée pour supprimer la mousse de surface). Filtrer sur papier en rejetant les 10 premiers ml de filtrat. Pipeter 5 ml de filtrat dans chacun des deux tubes à essai: dans le premier ils sont rajoutés 5 ml d'eau distillé (échantillon) et 5 ml d'une solution 0,20% de bisulfite dans l'autre [242]. Mélangez bien en utilisant un vortex et mesurer l'absorbance de l'échantillon par rapport à la référence à 284 nm et 336 nm [242]. Le contenu en HMF du miel est donc calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\text{HMF (mg/100g du miel)} = ((A_{284} - A_{336}) * 74.87) / M$$

Avec, A: absorbance,

M: masse du miel (g)

### **j. Analyse statistique**

L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA via le programme GraphPad Prism 6 et en utilisant le test post hoc de Tukey à  $p < 0,05$ . Le prétraitement des données et la PCA ont été réalisés à l'aide de MultBiplot 64 fonctionnant dans MATLAB R2017a.

## **2.2. Analyse de l'huile essentielle**

### **a. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation**

La partie aérienne de la plante *Origanum vulgare* a été ramené de la région Imouzzer, boulemane. L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Barnstead Electro-therm, made in UK) au Laboratoire de Physiologie-Pharmacologie-Santé Environnementale, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz. La distillation est conduite en utilisant 100 g de la partie aérienne de plante et 1000 ml d'eau distillée pendant 4h et l'huile essentielle a été récupérée et stockée à 4 °C dans l'obscurité en présence de sulfate de sodium anhydre.

### **b. Détermination du rendement en huile essentielle**

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée ( $M_{HE}$ ) et la masse de la matière végétale ( $M_V$ ) séchée à l'air libre, exprimées dans la même unité de masse. Le rendement en HE, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante [243, 244]:

$$R = \text{(Masse d'huile essentielle(g)/Masse du matériel végétal utilisé (g))} \times 100$$

### **c. Mesure de la densité relative à 20 °C**

La densité relative:  $d_{20}$  à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport entre la masse d'un volume connu d'huile à 20 °C, et la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20 °C. La masse volumique ( $\rho$ ) est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume. La densité de l'huile essentielle étudiée a été réalisée à l'aide d'une seringue hamiltonienne d'une capacité de 1 ml au lieu du pycnomètre. Le volume prélevé est de 1 ml pour huile, ainsi que pour l'eau [243, 244]. La densité d'huile essentielle a été calculée suivant la relation décrit ci-dessous:

$$d_{20} = (\rho_{HE}/\rho_{\text{eau à 20 °C}}) + (0.00073 * (\text{température de l'échantillon} - 20))$$

### **d. Mesure de l'indice de réfraction**

La mesure de l'indice de réfraction de notre HE a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe. Tout d'abord il faut nettoyer les prismes avant de mettre quelques gouttes d'HE entre les deux faces des prismes; à l'aide d'une visualisons travers l'oculaire, un ajustement des zones sombres et éclairées au centre du réticule est assuré par un bouton de réglage de l'indice de réfraction; Ensuite, la valeur de l'indice est notée sur une échelle de lecture [243, 244].

### **e. Mesure de pH**

L'HE a été caractérisé par leur pH, qui mesure l'activité chimique des ions hydrogènes ( $H^+$ ) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre, son principe consiste à introduire l'électrode du pH-mètre dans l'HE. La lecture se fait directement sur le pH-mètre [243, 244].

#### **f. Détermination de l'indice d'acide**

On définit l'indice d'acide par le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres dans 1 g d'HE. Pour cela on introduit 1 g de l'échantillon d'huile essentielle dans un erlenmeyer propre et sec, puis on ajoute 5 ml d'éthanol 96% à l'aide d'une pipette et 5 gouttes de phénolphthaléine, puis on procède un titrage de la solution obtenue avec l'hydroxyde de potassium 0.1 N jusqu'au virage de couleur [243, 244]. En fin de titrage, le volume de la solution KOH consommé est directement lié à l'indice d'acide qui est obtenu à l'aide de la relation suivante:

$$I_a = V.C.56.11/m$$

Avec, V: Volume en ml de la solution de KOH utilisé pour le titrage,

C: Concentration en mol. /l de la solution de KOH,

m: Masse d'huile essentielle en g de.

#### **g. Analyse par GC-MS de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare***

L'analyse de l'huile essentielle de la plante étudiée a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS à la Cité de l'Innovation de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.

L'huile essentielle a été diluée avec de l'hexane (rapport de dilution 10: 100), et 1 µl a été injecté pour l'analyse chromatographique en phase gazeuse. L'analyse GC-MS a été faite sur un chromatographe en phase gazeuse capillaire Thermo Fischer directement couplé au système de spectrométrie de masse (modèle GC ULTRA S / N 20062969, Polarise QS/N 210729). Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire remplie de silice fondue non polaire HP-5MS (60 mx 0,32 mm, épaisseur de film de 0,25 mm), qui est mise à une température de 40°C pendant 2 min, avec 2 °C d'augmentation par min ... puis porté à 260 °C; Cette dernière a été maintenue pour 10 min. Le gaz vecteur est l'hélium pulsé à la vitesse de 1 ml/min. Les températures de détecteur et de l'injecteur ont été maintenues respectivement à 250 °C. Le spectromètre de masse a été réalisé en utilisant la gamme 40-650 m/z, avec un voltage ionisant de 70 eV. Les composés ont été identifiés par MS et leurs identifications ont été confirmées en comparant leurs indices de rétention relative à C8-C20 n-alkanes selon l'index de Kovats et avec les données déjà décrites dans la bibliothèque NIST ou la banque de donnée informatisée [101, 244].

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Analyse des qualités des miels (Article 1)

##### a. Humidité

La teneur en humidité est un élément important dans l'évaluation du degré de maturité du miel et de sa durée de vie (qualité du miel). Elle dépend des conditions environnementales, de la manipulation par les apiculteurs et des variations saisonnières [253, 254]. Généralement une quantité d'eau élevée provoque la fermentation du miel suite à l'action des levures osmotolérantes, en produisant l'alcool éthylique et du dioxyde de carbone, ce qui détériore sa qualité... etc et conduit à la perte de sa saveur. La teneur élevée en eau peut aussi accélérer la cristallisation de certains types de miel et accroître son activité d'eau [97, 254].

Pour les différents échantillons analysés (figure 27), l'humidité était comprise entre 15% et 18,2% à l'exception du miel de daghmous et arbousier dont l'humidité était de 21%. Cette dernière valeur dépasse la norme ( $\leq 20\%$ ) permise par les régulations internationales de qualité. Cette humidité élevée peut être expliquée par une récolte prématurée du miel ou par des facteurs climatiques ou encore à cause de la manipulation des apiculteurs durant le processus de récolte. Des études antérieures ont déjà rapporté une teneur en eau supérieure à 20% dans certains miels Marocains [41, 102].

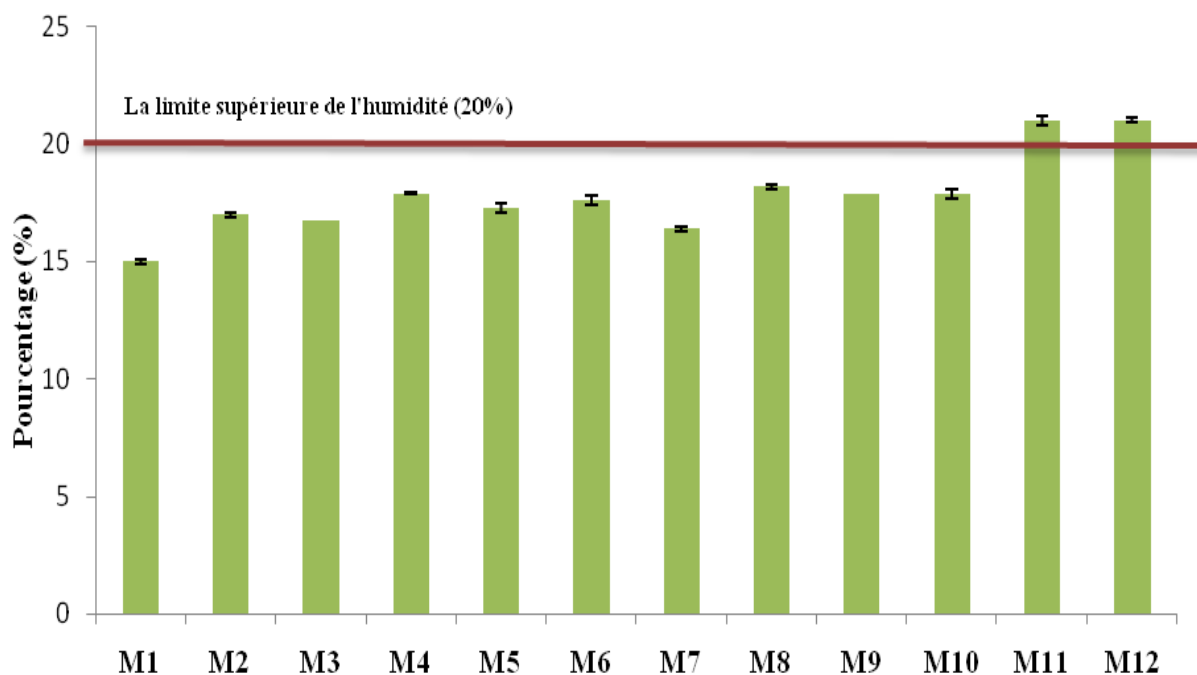


Figure 27: Résultats de l'Humidité des échantillons

### b. pH et acidité (libre, lactonique et total)

Les valeurs de pH du miel sont d'une grande importance lors de l'extraction et de stockage. Des valeurs acides de pH inhibent la croissance des micro-organismes. Toutefois, il peut être utile dans la détermination de l'origine botanique du miel [255]. Les échantillons de miel analysés présentaient des valeurs de pH acides, comprises entre  $3,66 \pm 0,01$  au miel de rabat (M 4) et  $4,48 \pm 0,01$  au miel de sader (M 4) (tableau 8). Ces valeurs se situent dans la fourchette acceptée pour le miel et sont similaires à celles des miels Algérien, Portugais et Marocain [41, 256–258].

Concernant la teneur en acides libres, elles varient selon la variété du miel. Dans les miels de miellat, elle est généralement supérieure à celle des miels de fleurs. La teneur en acides libres du miel est également déterminante pour l'installation d'une susceptibilité fermentation. Le miel contient une large gamme d'acides issus pour certains du nectar directement, pour d'autres de réactions enzymatiques et de fermentations [259]. Elle est due particulièrement à l'acide gluconique et à quelques ions inorganiques comme les phosphates et les sulfates [260]. Une acidité libre élevée peut être un indice d'une fermentation par des levures. En effet, au cours de la fermentation, le glucose et le fructose sont convertis en alcool, qui est à son tour hydrolysé en présence d'oxygène et converti en acide acétique, ce qui contribue à l'augmentation de l'acidité libre [261].

**Tableau 8:** pH et acidités (libre, combinée et total) des échantillons de miels

Miels	pH	Acidité libre	Acidité combinée	Acidité totale
<b>M 1</b>	$4,32 \pm 0,01$	$21,00 \pm 1,00$	$27,23 \pm 1,00$	$48,23 \pm 0,04$
<b>M 2</b>	$3,71 \pm 0,01$	$30,17 \pm 2,08$	$18,38 \pm 2,12$	$48,55 \pm 0,07$
<b>M 3</b>	$4,09 \pm 0,01$	$27,00 \pm 1,32$	$21,21 \pm 1,35$	$48,21 \pm 0,07$
<b>M 4</b>	$3,66 \pm 0,01$	$23,67 \pm 1,89$	$24,32 \pm 1,91$	$47,98 \pm 0,03$
<b>M 5</b>	$3,80 \pm 0,02$	$30,25 \pm 3,73$	$18,10 \pm 3,76$	$48,35 \pm 0,13$
<b>M 6</b>	$4,48 \pm 0,01$	$16,67 \pm 1,04$	$31,14 \pm 1,02$	$47,81 \pm 0,06$
<b>M 7</b>	$3,90 \pm 0,01$	$37,83 \pm 2,25$	$10,21 \pm 2,50$	$48,04 \pm 0,26$
<b>M 8</b>	$4,03 \pm 0,01$	$14,67 \pm 2,08$	$32,96 \pm 2,20$	$47,63 \pm 0,13$
<b>M 9</b>	$4,03 \pm 0,01$	$30,08 \pm 2,01$	$18,04 \pm 2,06$	$48,13 \pm 0,13$
<b>M 10</b>	$4,01 \pm 0,01$	$29,33 \pm 1,76$	$18,93 \pm 1,77$	$48,26 \pm 0,04$
<b>M 11</b>	$3,85 \pm 0,01$	$34,17 \pm 0,76$	$13,98 \pm 0,75$	$48,14 \pm 0,13$
<b>M 12</b>	$4,25 \pm 0,01$	$36,33 \pm 1,89$	$11,56 \pm 1,81$	$47,89 \pm 0,10$

L'acidité libre des échantillons des miels étudiés présentaient des teneurs allant de 14,67 à 37,83 méq/kg (tableau 8). La plus faible valeur est mesurée dans le cas de l'échantillon M 8



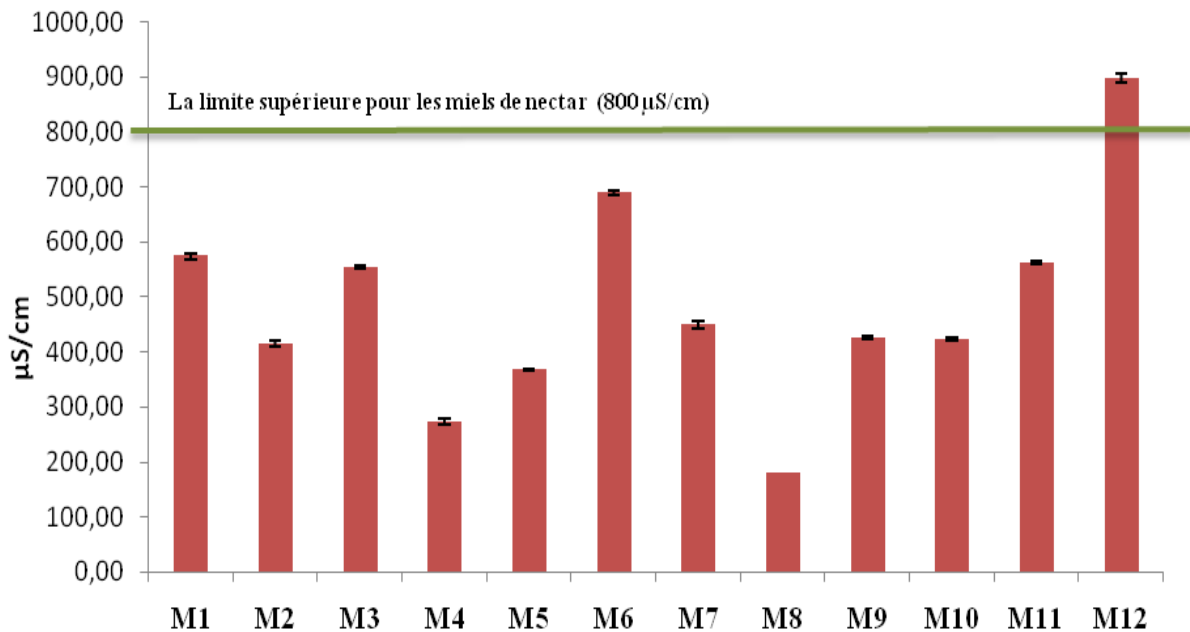
(limon), alors que les échantillons M 7 (thym) et M 12 (arbousier) présentaient les valeurs les plus élevées. Cependant, ces valeurs sont conformes aux normes de la directive de l'union européenne, qui exige des valeurs inférieures à 50 méq/kg [25, 41, 107, 262, 263], ce qui indique l'absence d'une fermentation indésirable.

L'acidité lactonique, ou combinée est considérée comme l'acidité inverse lorsque le miel devient alcalin [264]. Le contenu en lactones dans les échantillons analysés est compris entre 10,21 méq/Kg (M 7) et 32,96 méq/Kg (M 8). Concernant l'acidité totale (tableau 8), elle ne varie que légèrement en comparant les différents échantillons (47,63-48,55 méq/Kg). Les résultats de l'acidité lactonique sont différents de ceux trouvés par Bettar et *al* ayant analysé des miels de Maroc (0,5-16,65 méq/kg) [264]. Ceci confirme l'idée de Cavia et *al* qui a affirmé que la teneur des miels en lactones est irrégulière [265].

### **c. Conductivité électrique**

La conductivité électrique (CE) apporte une indication sur l'origine botanique des miels et elle est recommandée aujourd'hui lors des contrôles de routine. Selon le codex alimentaire, les miels de nectar présentent des valeurs inférieures à 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Des valeurs plus élevées sont généralement associées aux miels de miellat ou aux mélanges de nectar et de miellat [1].

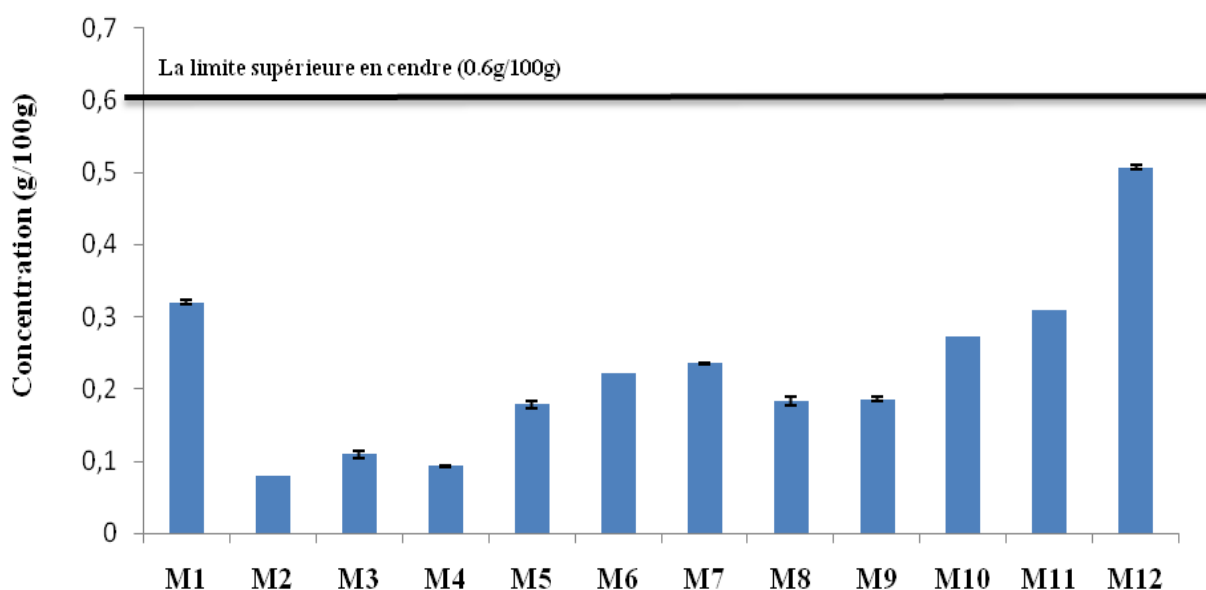
Les résultats de notre étude montrent que, les valeurs de conductivité électrique des échantillons de miel varient entre 181,13 et 896,67  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (figure 28). La majorité des valeurs mesurées ne dépassent pas 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  sauf dans le cas du miel d'arbousier (M 12) présentant la conductivité la plus élevée. Certains auteurs signalent que la conductivité électrique du miel est étroitement liée à la concentration des sels minéraux, d'acides organiques et de protéines [107, 256, 263]. De même, Mărghitaș et *al* a constaté une corrélation positive entre la conductivité électrique et la teneur en cendres du miel [266]. Cette corrélation a été obtenue dans les échantillons analysés dans le présent travail, avec une valeur  $r$  de 0,7184.



**Figure 28:** Conductivité électrique des miels analysés

#### d. Cendres

La teneur en cendres est un critère de qualité pour connaître l'origine botanique et géographique du miel [1, 93]. Les miels de nectar sont connus par des faibles teneurs en cendres par rapport aux miels des miellats. La teneur maximale en matières minérales (cendres) autorisée par les normes internationales est de 0,6 g/100 g soit 0,6% [1]. Les résultats des miels du présent travail sont présentés dans la figure 29. Tous les miels analysés présentent des teneurs en cendres comprises entre 0,08% et 0,51%, donc inférieures à la limite supérieure fixée par le Codex alimentaire (0,6%). Le miel d'arbousier (M 12) possède la valeur le plus important alors que le miel de morar akhdar (M 2) présentait le taux le plus bas.



**Figure 29:** Teneur en cendres des échantillons de miel

#### e. Couleur et teneur en mélanoidines

La couleur du miel est un facteur qui détermine son acceptabilité par le consommateur, elle varie généralement du jaune clair à ambre foncé, et dans des cas extrêmes, certains miels peuvent avoir une teinte noire. La classification par la couleur des miels monofloraux est très importante pour les activités commerciales [267].

Plusieurs méthodes colorimètre de classification des couleurs des miels peuvent être utilisées. Le tableau 9 montre les 2 classeurs les plus courantes: L'échelle Pfund qui est obtenue par un algorithme après la lecture de l'absorbance des solutions aqueuses de miel à 635 nm. En se basant sur cette classification, les miels de thym (M 7), de câprier (M 10) et de daghmous (M 11) sont de couleur foncé; les miels de bechnikha (M 9) et d'arbousier (M 12) sont de couleur amber foncé; les autres échantillons varient en couleur entre extra blanc et doré. La couleur du miel dépend de divers facteurs, dont le contenu en minéraux. Selon Gomes et *al*, les miels blancs ou peu colorés ont un faible contenu en cendres au contraire de ceux très colorés. D'autre part, la couleur naturelle des miels est évaluée sur l'absorbance nette de A560-A720 [268, 269].

Une autre méthode pour la détermination de la couleur est la mesure des mélanoidines qui sont des polymères hétérogènes de haut poids moléculaire de couleur brune, influençant donc la couleur totale des miels, et suggérant de longues périodes de stockage et / ou des processus de chauffage des miels. Les mélanoidines sont formés lorsque les sucres et les

acides aminés se combinent (par la réaction de Maillard) à des températures élevées et à faible activité d'eau. Les mélanoidines sont généralement présents dans les aliments qui ont subi une certaine forme de brunissement non enzymatique [268].

**Tableau 9:** Détermination de la couleur et de la teneur en mélanoidines des miels

<b>Miels</b>	<b>Couleur (A560-A720)</b>	<b>Mélanoidines (A450-A720)</b>	<b>Pfund scale (mm)</b>	<b>Couleur miel</b>
<b>M 1</b>	0,14 ± 0,00	0,49 ± 0,01	42,94 ± 1,22	Dorée
<b>M 2</b>	0,14 ± 0,00	0,93 ± 0,02	35,08 ± 2,29	Dorée
<b>M 3</b>	0,19 ± 0,01	0,65 ± 0,02	50,97 ± 0,86	Amber clair
<b>M 4</b>	0,09 ± 0,01	0,28 ± 0,01	10,53 ± 1,99	Extra blanc
<b>M 5</b>	0,20 ± 0,04	0,64 ± 0,05	51,73 ± 5,63	Amber clair
<b>M 6</b>	0,15 ± 0,01	0,55 ± 0,00	42,05 ± 1,10	Dorée
<b>M 7</b>	0,33 ± 0,01	1,10 ± 0,02	132,07 ± 3,03	Amber foncé
<b>M 8</b>	0,07 ± 0,01	0,21 ± 0,02	4,07 ± 3,38	Extra blanc
<b>M 9</b>	0,32 ± 0,01	1,43 ± 0,02	92,18 ± 1,79	Ambré foncé
<b>M 10</b>	0,35 ± 0,01	1,49 ± 0,02	126,09 ± 3,68	Foncé
<b>M 11</b>	0,38 ± 0,01	1,26 ± 0,02	161,99 ± 6,34	Foncé
<b>M 12</b>	0,32 ± 0,02	1,16 ± 0,01	109,15 ± 2,14	Ambré foncé

#### **f. Teneur en minéraux**

Le tableau 10 montre les résultats obtenus pour la teneur en minéraux de six échantillons de miel palestiniens et de six échantillons marocains. Le potassium était l'espèce la plus abondante dans tous les échantillons analysés, avec des valeurs comprises entre  $171,48 \pm 0,50$  mg/kg dans l'échantillon M 6 (sader) et  $2270,32 \pm 0,29$  mg/kg dans l'échantillon M 3 (zohif). Le sodium était le deuxième en termes d'abondance et variait entre  $59,79 \pm 0,1$  mg/kg et  $285,67 \pm 0,2$  mg/kg, suivi par la teneur en calcium avec une variation entre  $25,98 \pm 0,22$  mg/kg et de  $345,92 \pm 1,07$  mg/kg. La teneur en magnésium était la valeur la plus faible parmi les minéraux analysés, avec une valeur minimale de  $9,81 \pm 0,39$  mg/kg et une valeur maximale de  $77,53 \pm 0,58$  mg/kg. La richesse du miel en minéraux est un paramètre largement utilisé pour déterminer les origines botaniques et géographiques du miel [270]. Il reste à mentionner que toutes les valeurs trouvées dans les échantillons étaient conformes aux limites rapportées pour des miels étudiés dans d'autres études [256, 263, 271–273].

**Tableau 10:** Teneur en minéraux dans des échantillons de miel étudié (mg/kg)

<b>Miels</b>	<b>Potassium</b>	<b>Sodium</b>	<b>Calcium</b>	<b>Magnesium</b>	<b>Na + K + Ca + Mg</b>
<b>M 1</b>	926,01 ± 0,90	106,12 ± 0,9	154,55 ± 5,28	27,73 ± 0,32	1214,41
<b>M 2</b>	955,88 ± 1,14	159,28 ± 0,29	145,77 ± 1,13	15,42 ± 0,42	1276,35
<b>M 3</b>	2270,32 ± 0,29	213,55 ± 0,40	173,84 ± 1,95	42,54 ± 0,55	2700,25
<b>M 4</b>	367,12 ± 0,96	156,43 ± 0,45	126,42 ± 1,07	14,44 ± 1,23	663,9
<b>M 5</b>	576,86 ± 0,43	176,7 ± 0,26	133,46 ± 3,01	24,50 ± 0,20	911,52
<b>M 6</b>	171,48 ± 0,50	59,79 ± 0,1	129,49 ± 1,1	9,81 ± 0,3	370,57
<b>M 7</b>	830,26 ± 1,52	256,64 ± 0,28	166,19 ± 0,85	62,17 ± 0,92	1315,26
<b>M 8</b>	424,24 ± 0,41	114,74 ± 0,44	79,35 ± 4,04	25,76 ± 0,56	644,55
<b>M 9</b>	286,78 ± 1,21	111,16 ± 1,27	25,98 ± 0,22	17,44 ± 0,05	458,8
<b>M 10</b>	598,43 ± 0,39	75,39 ± 0,20	188,50 ± 1,32	15,69 ± 0,46	878,01
<b>M 11</b>	579,75 ± 2,17	179,77 ± 0,06	262,57 ± 1,73	35,16 ± 0,84	1054,75
<b>M 12</b>	1723,20 ± 1,21	285,67 ± 0,20	345,92 ± 1,07	77,53 ± 0,58	2432,32

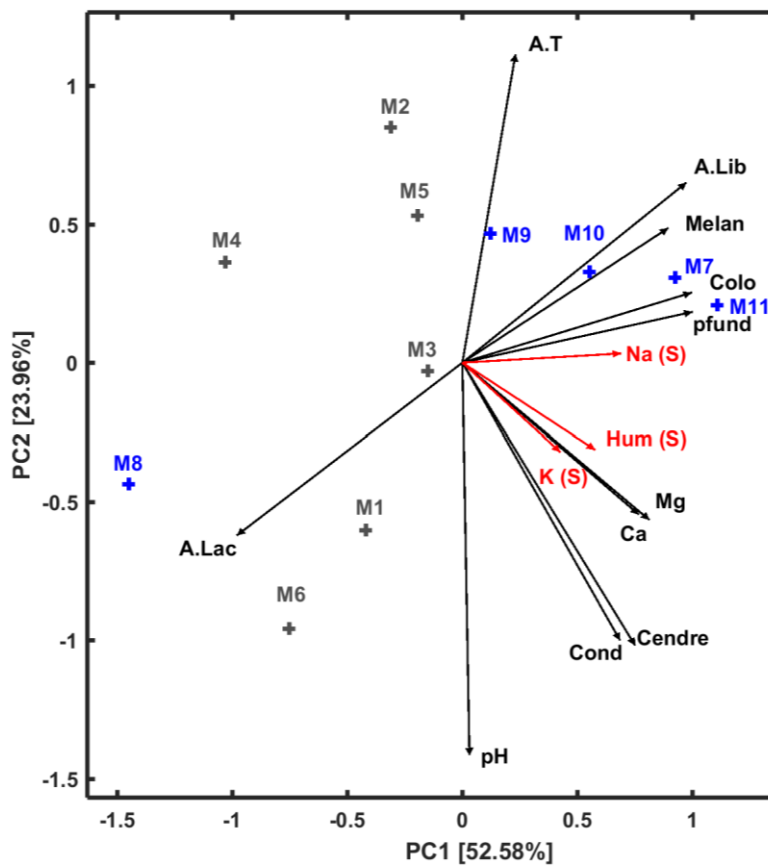
#### **g. Analyse multi variée (ACP)**

Pour illustrer la capacité des paramètres évalués à différencier entre les miels provenant de la Palestine et ceux du Maroc, l'analyse de composante principale a été employée comme étant un outil performant d'analyse multi variable (figure 30).

Les données brutes ont été conservées à 52,58% et 23,96% dans les deux premières composantes principales, respectivement. La première composante, étant la plus conservatrice en termes de représentation des données, corrèle positivement la couleur des miels et la teneur en mélanoidines, en plus de la conductivité électrique et donc des éléments minéraux. De ce fait, la composante en question a permis de distinguer les miels d'origine Marocaine (croix bleues) caractérisés par une teneur élevée en termes de paramètres physicochimiques évoqués de ceux d'origine Palestinienne. Une exception peut être observée. Il s'agit de l'échantillon M 8, qui est mal positionné avec le groupe des miels Palestiniens.

La deuxième composante principale représentait principalement l'acidité et le pH, permettant donc de distinguer deux groupes: le groupe des miels à pH acides (Maroc et Palestine) occupaient la partie supérieure du graphique, alors que les échantillons ayant des valeurs élevées de pH étaient dans la partie opposée. Il est à mentionner qu'à l'exception de la

teneur en éléments minéraux, les paramètres physicochimiques évalués sont des indicateurs de l'origine botanique plus que leur révélation géographique [274]. Tenant en compte de cette dernière information, la distinction entre les miels des deux Pays n'est pas due seulement à la composante géographique, mais aussi à l'effet de l'origine florale. En d'autres termes, les miels d'origine Marocaine sont issus de nectars forts en termes de molécules bioactives alors que les miels Palestiniens ont la caractéristique inverse. Cette intervention de la composante botanique pourrait aussi expliquer le fait que l'échantillon M 8 a été classé parmi les miels Palestiniens.



**Figure 30:** Analyse en composantes principales des paramètres physico-chimiques

### 3.2. Analyse des qualités des miels Palestiniens (Article 2)

La caractérisation des miels Palestiniens a été établie pour d'autres échantillons de différentes origines botaniques. L'objectif est de se focaliser plus sur les données à caractères physicochimiques des miels Palestiniens vu que cette région n'a connu aucune étude détaillée visant le contrôle de qualité [275].

Les résultats sont résumés dans le tableau 11 et montrent que pour la plupart des normes internationales de qualité, les échantillons analysés ne montrent aucune anomalie alarmante. A l'exception d'un échantillon présentant 81,86 mg/Kg d'HMF, toutes les valeurs des autres échantillons n'ont pas dépassé la limite établie par le comité international de miel (40 mg/kg). Concernant l'humidité, un des facteurs déterminant la susceptibilité des miels à la croissance des germes indésirables, aucune valeur n'était aberrante, et toutes étaient inférieures au maximum permis dans les miels (20%). La même chose peut être observé dans le cas de la proline, de la teneur en cendres et de la conductivité électrique: la teneur en proline était toujours supérieure à 180 mg/kg, alors que la teneur en cendres et la conductivité électrique ne dépassent pas les 0,6% et les 800  $\mu$ S/cm respectivement.

**Tableau 11:** Caractérisation physicochimique d'autres miels Palestiniens

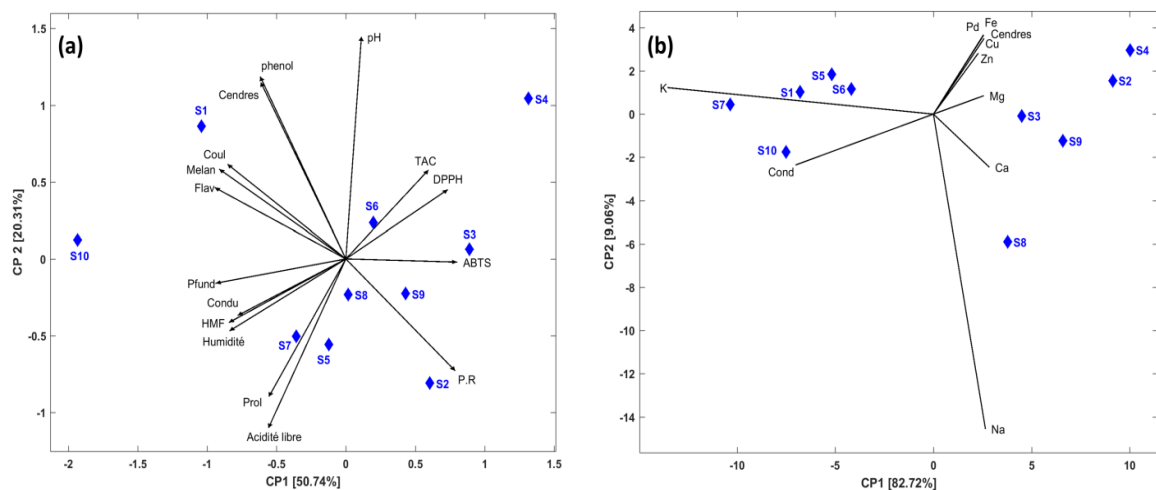
<b>Paramètres</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecart type</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
<b>pH</b>	3,92	0,21	3,66	4,25
<b>Acidité libre (mEq/kg)</b>	24,32	6,91	17,92	32,67
<b>Humidité (%)</b>	18,46	1,18	16,2	20,2
<b>Conductivité</b>	400,67	80,27	261,2	533,67
<b>Cendre (%)</b>	0,13	0,05	0,07	0,21
<b>Proline (mg/kg)</b>	425,03	149,38	229,44	720,87
<b>HMF (mg/kg)</b>	34,15	19,53	16,2	81,86
<b>Pfund(mm)</b>	69,41	16,09	45,58	100,96
<b>Couleur (A560-A720)</b>	0,13	0,05	0,07	0,24
<b>Melanoidine (A450-A720)</b>	0,25	0,15	0,11	0,54
<b>K (mg/kg)</b>	352,72	123,55	190,23	495,48
<b>Na (mg/kg)</b>	85,16	46,15	35,19	196,51
<b>Ca (mg/kg)</b>	86,48	22,80	64,49	138,41
<b>Mg (mg/kg)</b>	31,36	10,17	20,48	54,15
<b>Fe (mg/kg)</b>	4,36	1,82	2,25	8,75
<b>Zn (mg/kg)</b>	5,13	8,06	0,13	25,2
<b>Cu (mg/kg)</b>	0,89	0,21	0,61	1,22
<b>Pd (mg/kg)</b>	0,72	0,16	0,51	0,94

En termes de teneur en éléments minéraux, le potassium était l'élément le plus abondant avec des valeurs entre 190,23 mg/kg et 495,48 mg/kg suivi par le calcium présentant

une moyenne de  $86,48 \pm 22,80$  mg/kg. Toujours en termes de moyennes, les autres éléments peuvent être classés suivant un ordre décroissant comme suit : Sodium>Magnésium>Zinc>Fer>Cuivre>Plomb.

Pour mieux comprendre la distribution des échantillons analysés, sur la base des paramètres évalués, une analyse en composantes principales a été utilisée (ACP). La ACP est connue pour être un bon outil d'extraction d'informations à partir de matrices multi variées et ne la concentre que dans quelques composants [276]. Les scores des composants obtenus sont ensuite utilisés pour tracer les données de manière interprétable.

Dans la présente partie, les paramètres évalués ont été divisés en deux groupes principaux. Le premier groupe a été formé par tous les paramètres, à l'exception du contenu minéral, et a été utilisé comme matrice pour extraire les informations résultant de l'effet d'origine botanique. Le but était de regrouper les échantillons Palestiniens en fonction de leurs similitudes en termes de propriétés physicochimiques et de caractéristiques antioxydantes. La deuxième était formée par le contenu en minéraux, la teneur en cendres et la conductivité électrique. Il est bien établi que ce groupe de paramètres, en plus d'être influencé par l'origine botanique, peut indiquer les origines géographiques. Il est alors important d'illustrer s'il existe une empreinte digitale caractérisant les échantillons produits dans une région Palestinienne spécifique. Les résultats des deux ACPs ont été illustrés sur les figures 31a et b, successivement.



**Figure 31:** Analyse en composantes principales des paramètres évalués. (a) PCA des paramètres physicochimiques et des activités antioxydants. b) PCA de la teneur en minéraux, des cendres et de la conductivité électrique. K: potassium; Na: sodium Ca: calcium Mg: magnésium; Fe: fer Zn: zinc; Cu: cuivre Pd: palladium



La figure 31a décrit la distribution des échantillons de miel en fonction du paramètre illustré par les rétrécissements noirs. La projection de chaque échantillon sur un axe donné (composante) reflète sa capacité / corrélation représentative avec le même composant. Les échantillons de miel ont été tracés en diamants bleus. Compte tenu des données fournies, 50,74% ont été conservés dans la première composante principale, ce qui explique dans la partie négative présente l'intensité de la couleur, les mélanoidines, les flavones, le flavonol et les polyphénols. Par conséquent, la première composante corrélée positivement avec l'IC<sub>50</sub> des activités antioxydantes évaluées.

En ce qui concerne l'étude de la composante géographique dans la discrimination des échantillons de miel analysés, les données (cendres, teneur en minéraux et activité électrique) étaient très conservées dans les deux premières composantes principales, expliquant respectivement 82,72% et 9,06% (Figure 31b). On peut distinguer deux groupes principaux concernant la première composante principale. Le premier groupe a été formé par S1, S5, S6, S7 et S10 et était caractérisé par une teneur élevée en potassium (l'élément le plus abondant parmi les minéraux évalués) et la conductivité électrique.

Parmi les échantillons de miel mentionnés, le S6 était le seul récolté dans la partie nord de la Palestine. Le deuxième groupe était constitué de S9 et S2 produits dans le sud du pays et les autres échantillons (S3, S4 et S8) provenant de la partie nord. Les cinq échantillons présentaient moins de teneur en potassium et de conductivité électrique et, relativement, moins de paramètres restants.

Le regroupement géographique n'était pas parfait et des exceptions pouvaient être observées. Cela peut être dû à l'intervention de l'origine botanique, car il est bien documenté pour être également cruciale dans la détermination du profil minéral des échantillons de miel [274]. Cependant, la discrimination des échantillons en utilisant le profil minéral, la teneur en cendres et la conductivité électrique était plus claire que dans le cas des paramètres utilisés sur la figure 31a.

### **3.3. Analyses de qualité d'HE**

#### **a. Le rendement**

Dans le but d'évaluer le degré de pureté et la qualité commerciale de notre échantillon d'HE, nous avons déterminé leurs caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques, et les résultats sont illustrés dans le tableau 12 et comparés avec celles retrouvées dans la littérature. D'abord, le rendement qui est un paramètre important à établir dans la culture commerciale

vue qu'il détermine les quantités produites. La valeur de rendement de l'huile essentielle d'origan obtenu (2,6%) était comprise dans la fourchette rapportée par Iteipmai. Selon la Pharmacopée Européenne, le rendement de l'huile essentielle d'origan doit être au minimum de 25 ml/kg, soit 2,5% [245].

### b. Les caractères organoleptiques

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* sont: un aspect huileux, avec une couleur jaunâtre, plus l'odeur caractéristique de cette espèce ont été observée. L'absence de ses caractères dans une HE commerciale pourrait être un marqueur d'une éventuelle falsification.

### c. Les paramètres physicochimiques

Les résultats de l'analyse physico-chimique de l'huile essentielle sont présentés dans le tableau 12. Notre huile essentielle d'*Origanum vulgare* est caractérisée par un pH acide avec une valeur 5,02. Une telle valeur joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle (effets antioxydante et antimicrobienne). Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes; ce qui permettra à cette HE de jouer le rôle de conservateur en cas d'utilisation dans les produits alimentaires [246].

**Tableau 12:** Propriétés physique d'huile essentielle étudiée

Echantillon	pH	d <sub>20</sub>	n <sup>20</sup> <sub>D</sub>	I <sub>a</sub>
<i>Origanum vulgare</i>	5,02	0,9484	1,5143	5,91

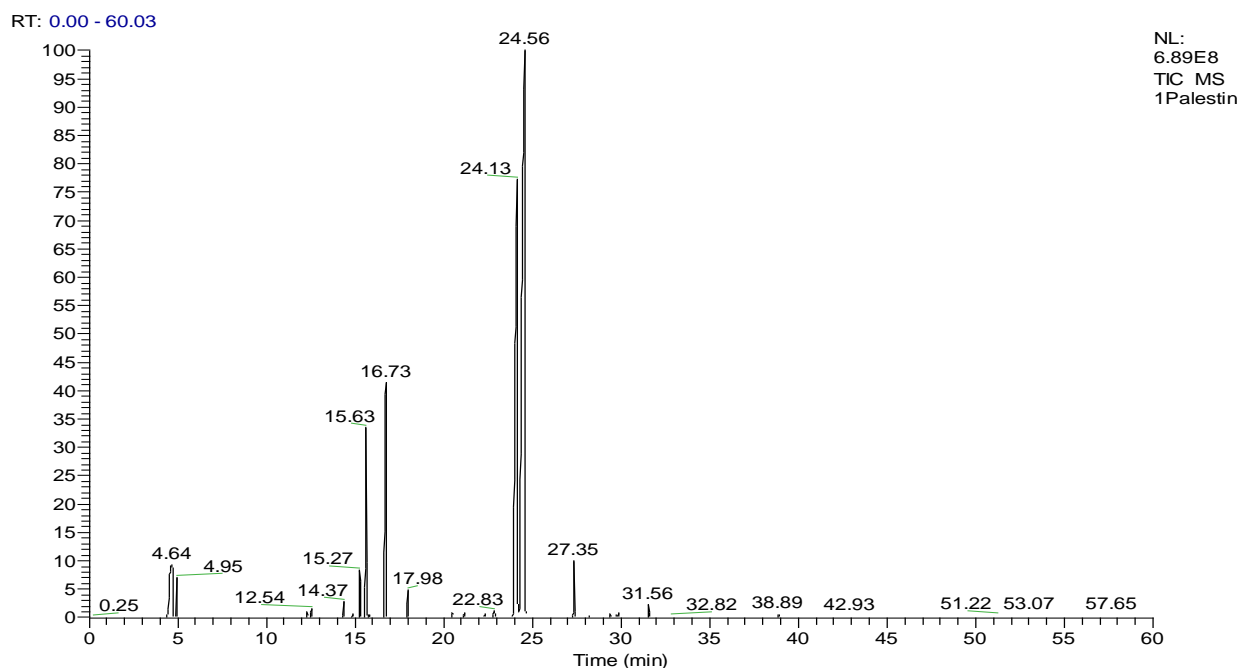
La densité de notre HE était, comme prévu, inférieure à celle de l'eau (tableau 12). Ce résultat est conforme à celui rapporté par Belaiche et *al* en travaillant sur une espèce d'origan poussant en Espagne [245]. Concernant l'indice de réfraction, une huile essentielle d'origan de qualité doit présenter un indice de réfraction (à 20 °C) d'une valeur comprise entre 1,495 à 1,514 [247]. De ce fait l'échantillon de notre étude répond à cet intervalle standard.

L'indice d'acidité est un indicateur renvoyant directement à la qualité d'une HE. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation. D'après nos résultats, l'huile essentielle d'origan a présenté un indice d'acide 5.91. Un indice d'acide élevé pour les HES peut être bénéfique si ces essences ont été ajoutées à un produit alimentaire possédant des matières grasses et des acides gras libres oxydables.

Cet effet stabilisateur se manifeste dans la mesure où l'oxydation affecte plutôt les acides libres de l'essence utilisée comme conservateur et protège ou limite donc l'oxydation des acides gras libres insaturés des produits alimentaires ce qui améliore à la fois la qualité nutritionnelle et organoleptique de ces produits [246].

#### d. Analyse par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC / MS) pour l'huiles essentielle d'*Origanum vulgare*

Les caractéristiques physico-chimiques ainsi évaluées, restent insuffisantes pour une identification complète d'une HE, d'où l'importance des analyser par les méthodes chromatographiques. En général, on appelle « Origan » des espèces dont l'HE est riche en carvacrol. Ce critère permet de différencier l'HE d'origan de celle du thym, chimiquement voisine mais ayant comme constituant majoritaire le thymol au lieu du carvacrol [248]. La figure 32 montre le résultat de l'analyse par GC-MS de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* utilisé dans le présent travail.



**Figure 32:** Chromatogramme analytique de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

D'après la figure 32, nous avons pu observer la présence de 26 composés avec un pourcentage d'identification de 92,45% de la totalité de composés. Le tableau 10 illustre les principaux constituants de l'huile qui étaient le carvacrol (48,38%), le thymol (26,55%), le  $\gamma$ -terpinène (7,9%) et le 1,8-cinéol (4,86%). Les composés révélés dans notre huile essentielle étaient similaires à l'*Origanum vulgare* du Maroc et d'autres pays étudiés [249–251]. Les HE

de ces travaux présentait aussi la similarité du composé majeur (le carvacrol). Le pourcentage du carvacrol et du thymol dans notre échantillon est deux fois plus élevé que ceux identifiés dans l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* du Maroc [251]. Cette différence est due à de nombreuses raisons qui peuvent affecter les composants de l'huile tels que la méthode d'isolement, l'origine géographique, la saison de récolte et la partie de la plante utilisée pour extraire l'huile essentielle [252].

**Tableau 13:** Analyse par GC-MS de l'HE d'*Origanum vulgare*

<b>Composés identifiés</b>	<b>TR</b>	<b>%surface</b>	<b>IK</b>
$\alpha$ -Pinene	12,29	0,1	948
2-Carene	12,54	0,15	1002
$\alpha$ -Phellandrene	13,99	0,03	1007
3-Carene	14,37	0,3	1009
1,4-Cineol	14,87	0,06	1012
$\alpha$ -Terpinene	15,27	0,81	1018
1,8-Cineol	15,63	4,86	1038
Cis-Ocimene	16,23	0,03	1072
$\gamma$ -Terpinene	16,73	7,9	1084
Terpinolene	17,59	0,06	1096
Isoborneol	17,98	0,59	1158
$\beta$ -terpiniol	20,22	0,07	1162
Borneol	20,47	0,23	1172
4-terpinol	21,17	0,15	1235
Cis-carveol	22,31	0,07	1289
Thymol methyl ethe	22,83	0,29	1325
Pulegone	23,76	0,05	1335
Thymol	24,13	26,55	1375
Carvacrol	24,56	48,38	1394
Caryophyllene	27,35	1,03	1426
$\alpha$ -Himachalene	28,22	0,15	1475
Longifolene-(V4)	29,37	0,06	1495
$\alpha$ -Cadinene	29,69	0,05	1538
$\gamma$ -Muurolene	29,86	0,11	1542
$\gamma$ -Cadinene	31,56	0,28	1571
Caryophyllene oxide	38,89	0,09	1628
<b>Total</b>		<b>92,45</b>	

## Chapitre II

### Etude de l'activité antioxydante des miels et de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

**Article 1: Hamada Imtara, Youssef Elamine, Badiâa Lyoussi.** Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare L.* Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018. (Publié)

**Article 3: Hamada Imtara, Abdalsalam Kmail, Soumaya Touzani, Mira Khader, Hadeel Hamarshi, Bashar Saad and Badiâa Lyoussi.** Chemical analysis, cytotoxic and cytostatic effects of twelvehoney samples collected from different regions in Morocco and Palestine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018. (Soumis)

## 1. Introduction

L'importance des composés phénoliques dans les produits naturels est bien documentée. Ce sont des substances naturellement présentes dans les miels, les propolis, les plantes et les HEs où ils contribuent à la couleur et aux propriétés organoleptiques [277]. Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes et flavonols sont des précurseurs des phénols volatils, qui enrichissent les miels avec différents arômes [278]. Ils sont également responsables de réactions de brunissement (couleur/ mélanoidines) du miel et sont considérés comme des éléments essentiels lors de la conservation et le vieillissement [41, 275, 277]. Les types et les concentrations de ces composés dépendent d'un certain nombre de facteurs: l'origine florale et géographique, conditions climatiques, l'année et l'environnement des ruches [279].

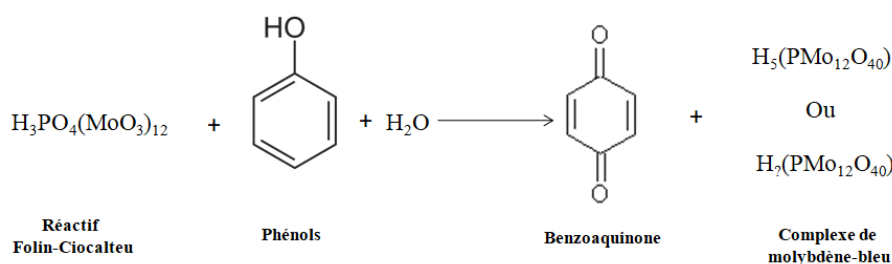
En plus de leur rôle important dans certaines propriétés sensorielles et organoleptiques, plusieurs études ont souligné que la plupart de composés phénoliques sont dotés d'activités biologiques liées à leurs propriétés antioxydantes et anti-radicalaires. Grâce à la mobilité de l'hydrogène phénolique, les composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés, en particulier les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ), alkoxydes ( $\text{RO}\cdot$ ), superoxydes ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) et les hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ), générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (Tabagisme, polluants, infections...). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels permet à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies, ce qui suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, maladies infectieuses, cardiovasculaires et neurodégénératives [83, 280, 281]. Par ailleurs, les antioxydants synthétiques les plus utilisés par l'industrie alimentaire sont suspectés d'engendrer des effets négatifs sur la santé humaine, notamment un effet cancérigène pour certains. C'est la raison pour laquelle l'intérêt pour l'utilisation de substances naturelles (En particulier les huiles essentielles) en tant qu'additifs pour leur potentiel antioxydant est grandissant [282].

L'objectif principal de ce chapitre vise en une caractérisation des propriétés antioxydantes des échantillons du miel en provenance de Palestine et du Maroc ainsi que l'huile essentielle d'origan. Enfin, une analyse statistique se fait par ACP et corrélation pour déterminer les composés phénoliques des miels qui sont influencés sur l'activité antioxydante.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en phénols a été déterminé selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu [283]. En présence des polyphénols, le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) est réduit en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) (figure 33) [284].



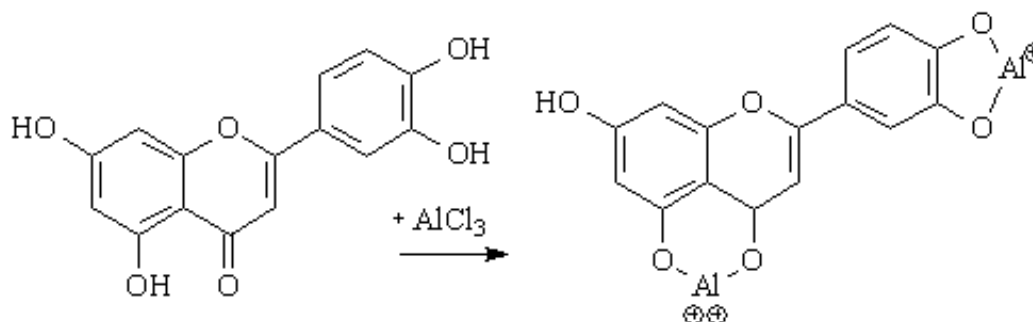
**Figure 33:** Réaction des composés phénoliques avec les réactifs Folin-Ciocalteu

100  $\mu$ l de l'échantillon ont été mélangés avec 500  $\mu$ l du réactif de Folin-Ciocalteu (0,2 N) et 400  $\mu$ l de carbonate de sodium (1,5 g dans 20 ml d'eau distillée). Le tout incubé pendant 2h à l'obscurité. L'absorbance a été lue à 760 nm. L'acide gallique (0,02 g dans 10 ml d'éthanol 96%) a été utilisé comme standard pour la réalisation de la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus ont été présentés en mg équivalent AG/100 g de miel (mg EAG/100 g).

### 2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La détermination des flavonoïdes totaux est basée sur le dosage colorimétrique par le chlorure d'aluminium (Figure 34). La méthode décrite par Talari Samatha *et al* [285], avec quelques modifications constitue un mélange d'une aliquote (0,1 ml) d'extrait prélevé dans différents tubes à essai, avec 0,4 ml d'eau distillée, 30  $\mu$ l de nitrite de sodium ( $NaNO_2$  à 5%, poids / volume) sont ajoutés et l'ensemble est laissé reposer pendant 6 minutes. Plus tard, 30  $\mu$ l de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$  à 10%) ont été ajoutés et incubés pendant 6 minutes, suivi par l'addition de 0,4 ml d'hydroxyde de sodium ( $NaOH$ , 4% p/v) et ajustement du volume jusqu'à 1 ml avec de l'eau distillée. Après 15 min d'incubation, le mélange devient de couleur rose, dont l'absorbance a été mesurée à 510 nm. L'eau distillée a été utilisée comme blanc. La quercétine (0-100 mg/l) a servi comme standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage.

Les flavonoïdes totaux ont été exprimés en mg équivalent de quercétine (EQ) par 100 g de miel.



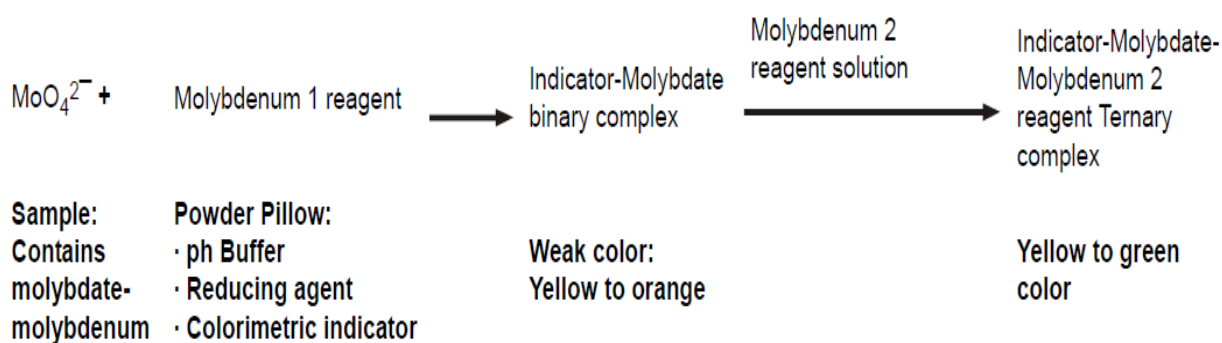
**Figure 34:** Réaction des flavonoïdes avec l'AlCl<sub>3</sub>

### 2.3. Dosage les flavonols totaux

Les flavonols totaux dans les miels ont été estimés en utilisant la méthode décrite précédemment [286]. 0.5 ml d'échantillon ajouté à 0.5 ml d'une solution de AlCl<sub>3</sub> (2%) puis l'addition de 0.750 ml (50 g/l) d'une solution d'acétate de sodium. L'absorption à 440 nm a été lue après 2,5 heures d'incubation à 20 °C. La quercétine (0-100 mg/l) a servi comme standard pour l'élaboration de la courbe d'étalonnage. Les flavonols totaux ont été exprimé en mg équivalent de la quercétine (EQ) par 100 g de miel (mg EQ/100 g).

### 2.4. Test Molybdate: Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (CAT) des miels est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en molybdate Mo (V) MoO<sup>2+</sup> en présence du miel pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH acide (Figure 35) [287].



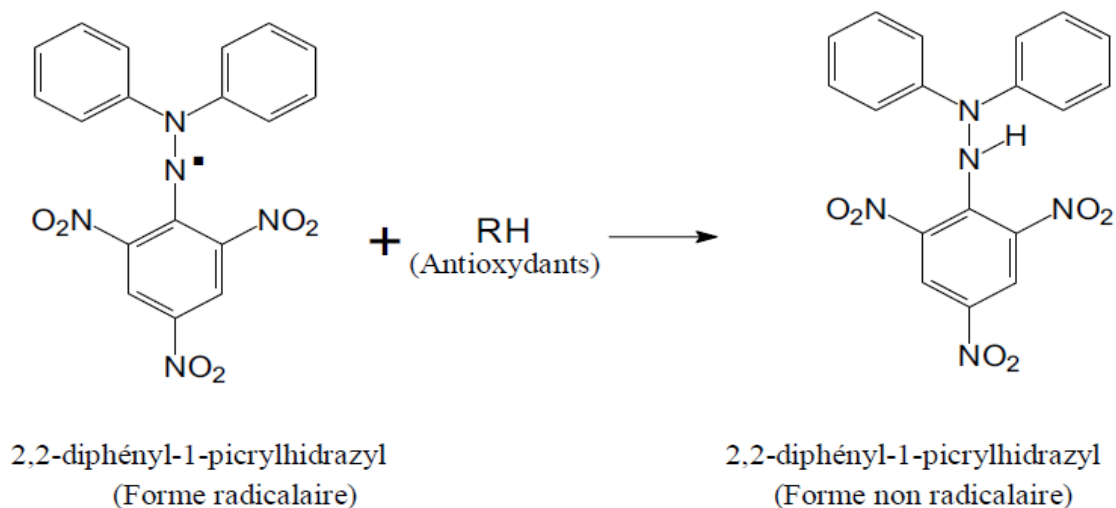
**Figure 35:** Voie de réaction chimique pour le molybdate



Un volume de 25 µl de la solution de chaque miel est mélangé avec 1 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes sont incubés à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par 100 grammes de miel (mg EAA/100 g de miel).

## 2.5. Activité anti-radicalaire par la méthode DPPH

La capacité d'une substance antioxydante à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl a été estimée selon la méthode décrite par Brand et *al* [288], avec quelques modifications. Le 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl est un radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible qui provoque la couleur violette. Ce composé réagit avec les groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques. Quand la solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un électron, la forme réduite 1,1-diphényl-2-(2, 4,6- trinitrophenyl) hydrazine DPPH<sub>2</sub> est donc formée et accompagnée avec la perte de la couleur violette et l'apparition d'une couleur jeune pâle résiduelle due à la présence de groupement picryl selon la réaction suivante (figure 36):



**Figure 36:** structure du DPPH et sa réduction par des antioxydantes

150 µl d'une série de dilution du miel ou 50µl de la série dilution de l'HE avec concentration initiale (15,62-500 mg/ml; 0,84-104 mg/ml respectivement) ont été mélangés avec le réactif DPPH (0,005g dans 200ml d'éthanol 96%) en ajustant le volume réactionnel total (Échantillon+DPPH) à un 1 ml. L'absorbance a été lue 1h après, et comparée à celle du

contrôle négatif (l'eau au lieu de l'échantillon) et à celle du contrôle positif (25 µl de Butyl hydroxy toluène BHT).

$$\text{Activité DPPH (\%)} = ((\text{Ac}-\text{Ae})/\text{Ac}) * 100$$

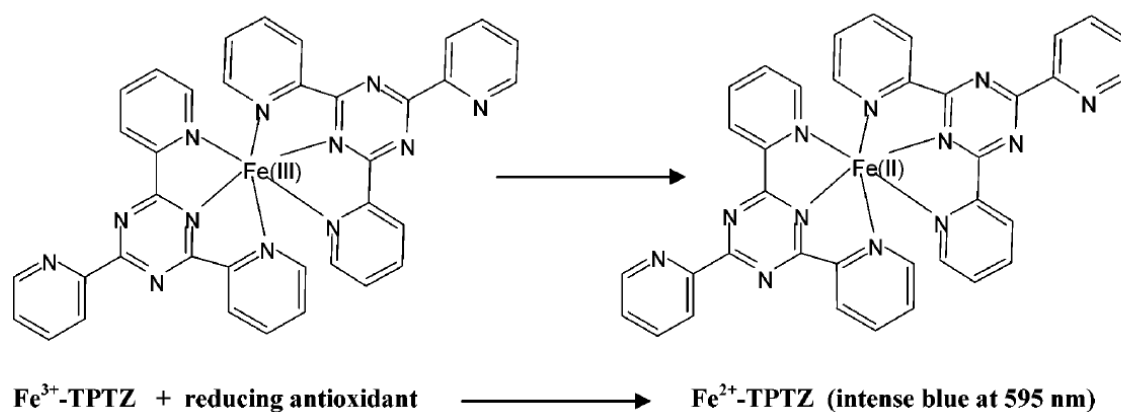
Avec, Ac: Absorbance du contrôle négatif;

Ae: Absorbance de l'échantillon

Le pourcentage du DPPH inhibé en fonction des concentrations en miels et HE a été tracé afin d'obtenir IC<sub>50</sub>. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour piéger 50% du radical DPPH' initiale.

## 2.6. Détermination du pouvoir réducteur: Test de la réduction du fer FRAP

L'étude de pouvoir réducteur du miel est réalisée par la méthode décrite par Oyaiz avec quelques modifications [289]. Cette technique mesure le changement de l'absorbance à 700 nm, dû à la formation de la couleur bleue du Fe<sup>2+</sup>-tripyridyltriazine à partir du Fe<sup>3+</sup> sous l'action de l'électron libéré par les substances antioxydantes selon la réaction suivante (Figure 37):

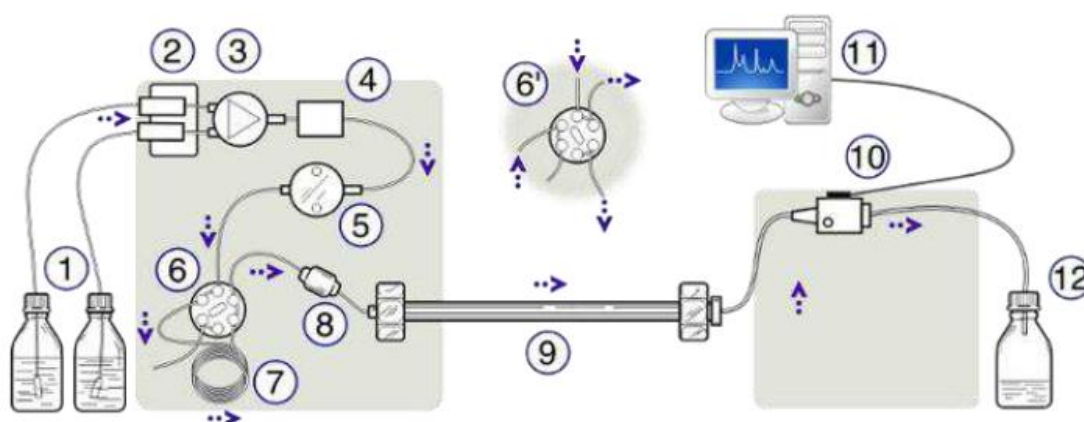


**Figure 37:** Schéma illustrant la réaction de test FRAP

100 µl de chaque échantillon ont été mélangés avec 200 µl de tampon phosphate (200 mM, pH 6,6) et 200 µl de potassium ferricyanide (1%). Après incubation 20 minutes à 50°C, 200 µl d'acide trichloracétique (10%) y ont été ajoutés puis le mélange réactionnel a été centrifugé (10 min à 3000trs). 600 µl d'eau distillée et 120 µl FeCl<sub>3</sub> ont été ajoutés. L'absorbance a été lue à 700 nm. La densité optique (DO) du pouvoir réducteur en fonction des concentrations en miels a été tracée afin d'obtenir l'indice IC<sub>50</sub>.

## 2.7. Identification et détermination des composés phénoliques par HPLC-UV

La chromatographie en phase liquide à haute performance (Figure 39) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide sous pression environ 70 bar (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins (Figure 38). Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne, les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (UV, IR etc.) [289].



**Figure 38:** Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance. 1- Réservoirs des solvants, 2- Dégazeur, 3- Valve de gradient d'éluant, 4- Doseur de phase mobile (ou éluant), 5- Pompe à haute pression, 6- Vanne d'injection en position "inject", 6' - Vanne d'injection en position "load", 7- Boucle d'injection de l'échantillon, 8- Précolonne (éventuelle), 9- Colonne analytique, 10- Détecteur, 11- Acquisition du signal, 12- Décharge déchets [289].

L'échantillon de miel a été préparé par soumission à une hydrolyse acide et extraction avec de l'acétate d'éthyle (extraction liquide-liquide) comme décrit par Aljadi et Yusoff [290]. Brièvement, 10 grammes de miel ont été dissous dans de l'eau distillée acidifiée par HCl (pH 3), et l'extraction des composés phénoliques est permise par l'acétate d'éthyle. Le dernier solvant est éliminé par rotavapor. L'extrait phénolique sec a été dissous dans 5 ml de méthanol grade HPLC. L'appareil est conditionné à 30 °C, et la séparation est accomplie sur une colonne C18 (4,6 x 150 mm) x 5 mm. 20 µl de chaque échantillon est injecté. La phase mobile est constituée par deux solvants: MeOH / Acet (50% - 50%) (Solvant A) et l'eau acidifiée H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,2%) (Solvant B) passés à un débit de 1ml/min. Le gradient d'éluant était de 5% de solvant A et 95% de solvant B, pendant les première 13 min et diminue à 65% de

solvant B (Solvant A 35%) pendant 30 min et enfin un mélange de 30% du solvant B et 70% du solvant Adurant les 10 min qui restent.

Les composés purs utilisés comme standard dans cette étude sont: l'acide caféique, l'acide gallique, le gallate d'épicatéchine, l'acide coumarique, l'acide rosmarinique, l'acide férulique, l'acide syringique, l'acide tannique et le pyrogallol. Les composés phénoliques des extraits de miel ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux des standards purs. Les résultats obtenus en mg/100 g de miel.



**Figure 39:** Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

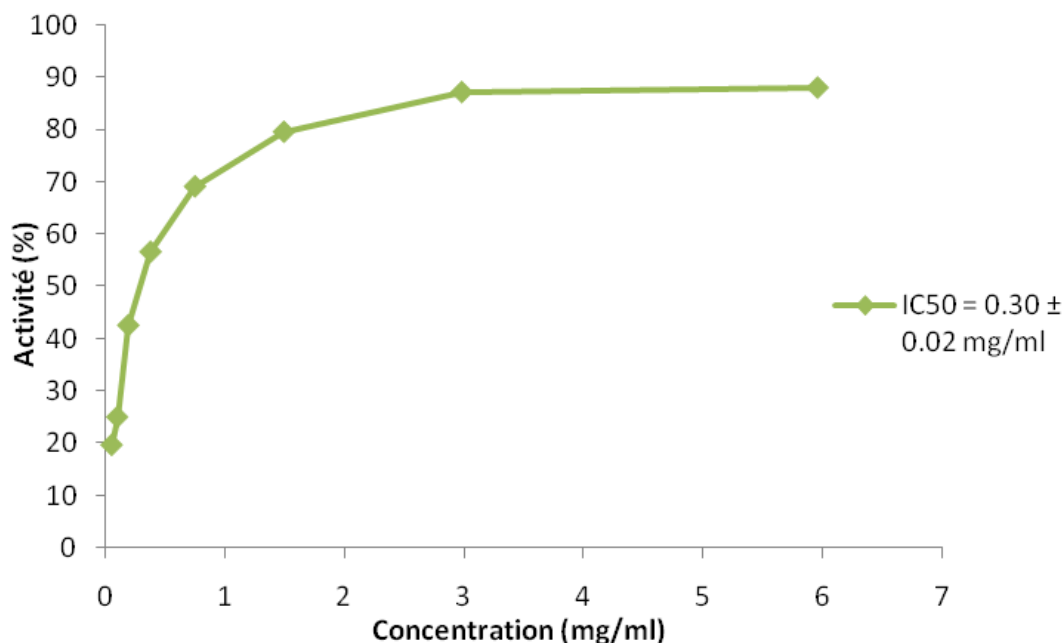
## 2.8. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA à travers Graphpad prism 6 suivi par le test Tukey de comparaison multiple à  $p < 0,05$ . Les corrélations entre les paramètres sont assurées par calcul du coefficient de corrélation de Pearson. L'analyse multi variée, comme outil de réduction de dimensions et d'intégration de l'information de plusieurs variables, a été faite par analyse de composante principale sous Multibuplot (Matlab).

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*

Le test DPPH est la méthode la plus couramment utilisée *in vitro* pour déterminer les activités antioxydantes des huiles essentielles. L'activité de piégeage des radicaux DPPH par l'huile essentielle d'origan a été illustrée par la figure 40. La valeur  $IC_{50}$  calculée est de  $0,30 \pm 0,02$  mg/ml. La valeur  $IC_{50}$  (DPPH) de l'antioxydant synthétique BHT était de 0,09 mg/ml, indiquant une meilleure activité antioxydante par rapport à l'huile essentielle testée. Etant donné la toxicité confirmée du BHT, les résultats présentés suggèrent que l'huile essentielle d'origan pourrait être potentiellement utilisée comme une alternative dans les industries pharmaceutiques et alimentaires. Des études ont montré que les monoterpènes oxygénés, tels que le thymol, le carvacrol et le  $\alpha$ -terpinéol, sont principalement responsables du potentiel antioxydant des huiles essentielles qui les contiennent [114, 291]. Le monoterpène  $\beta$ -caryophyllène a prouvé sa capacité de piégeage des radicaux libres en utilisant le test de DPPH [292]. Dans le cas de l'HE d'origan, le degré élevé de neutralisation radicale de la DPPH peut être expliqué par sa richesse en composés phénoliques, principalement le thymol et carvacrol. Ses derniers ont été identifiés dans d'autres HE d'*Origanum vulgare* [251]. La valeur  $IC_{50}$  HE du présent travail est conforme aux données antérieurement rapportées par Ljiljana et al qui a trouvé une valeur de  $IC_{50}$  égal 0,33 mg/ml [293].



**Figure 40:** Inhibition du DPPH par l'HE d'*Origanum vulgare*

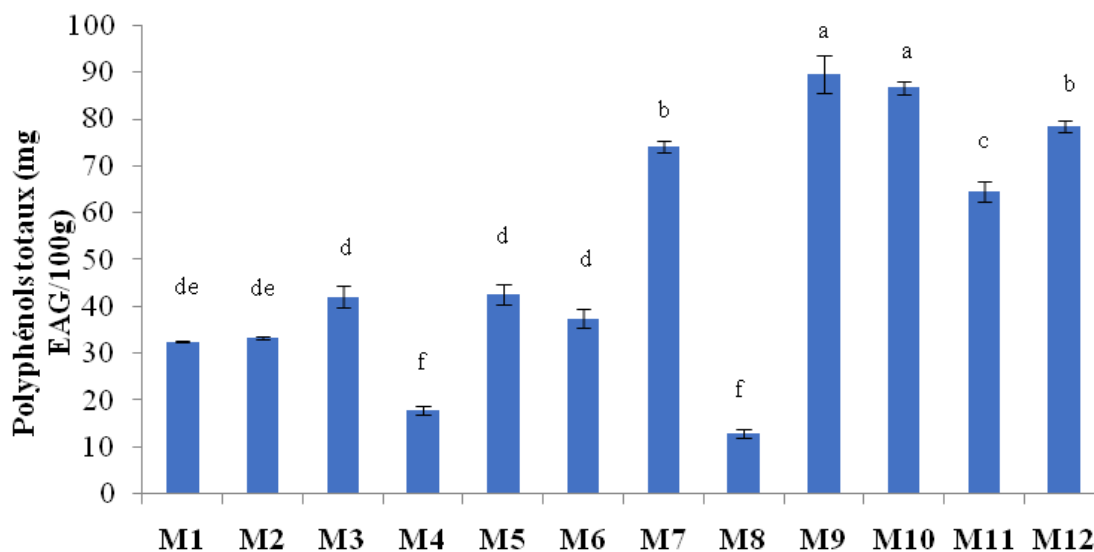
### **3.2. Teneurs en molécules bioactives et évaluation du pouvoir antioxydant des miels**

Les molécules bioactives sont les médiateurs principaux de l'activité antioxydante des produits naturels. De ce fait, le présent travail est initié par la détermination de la teneur en polyphénols totaux, des flavonoïdes et de flavonols, une étude détaillée des composés phénoliques par HPLC ainsi que les activités antioxydantes des échantillons du miel seront évalués. Les possibles corrélations avec la composition en molécules bioactives et le pouvoir antioxydant feront l'objet d'une investigation éventuelle de la contribution de ces paramètres à la standardisation des molécules cibles pour les pathologies associées.

#### **a. Teneur en composés phénoliques totaux**

Dans cette partie, nous avons cherché à caractériser quelques miels d'origines diverses par leur contenu phénolique global (dosage de polyphénols totaux). Le miel contient un nombre important en composés phénoliques, qui bénéficient à l'heure actuelle d'une réputation grandissante en ce qui concerne leurs propriétés fonctionnelles notamment leurs capacités antioxydantes.

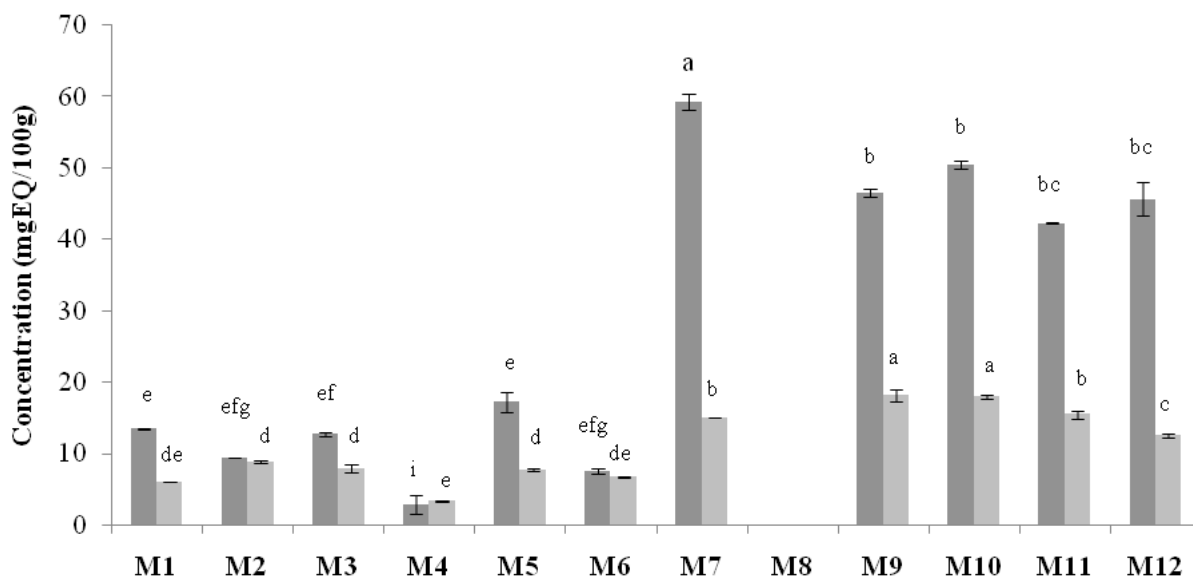
La figure 41 montre le contenu total des phénols dans les échantillons de miel. Les échantillons testés contiennent des teneurs en polyphénols, variant entre 12,91 mg EAG /100 g et 89,53 mg EAG/100 g. Sur la base des taux en ces composés, les échantillons sont classés selon l'ordre croissant: M 8<M 4<M 1<M 2<M 6<M 3<M 5<M 11<M 7<M 12<M 10<M 9. La valeur la plus basse a été déterminée dans l'échantillon M8 ( $12,91 \pm 0,85$  mg/100 g), alors que les valeurs les plus élevées ont été obtenues pour le miel du *Ammi visnaga* (bechnikha) et du câprier (89,53 et 86,66 mg/100 g, respectivement), étant environ sept fois plus élevé que pour le miel du limon. Ces résultats sont similaires à ceux de Aazza et al sur des échantillons de miel Portugais [ $31,85 \pm 2,21$  mg EAG /100 g (miel clair) à  $117,65 \pm 2,21$  mg EAG /100 g (miel ambré)] [256]. De nombreux auteurs ont étudié la teneur en composés phénoliques de miel et ont suggéré que leurs niveaux dépendent des origines florales et géographiques, de l'année et de l'environnement gouvernant les endroits des ruches [279, 294].



**Figure 41:** Teneurs en polyphénols des miels analysés  
Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

#### **b. Détermination de la teneur en flavonoïdes et flavonols totaux**

Le miel est une source alimentaire d'antioxydants notamment les flavonoïdes. Ces composés complexes sont à l'origine de la couleur du miel et de son activité antioxydante [277]. Pour la teneur en flavonoïdes, nous avons utilisé une quantification spectrophotométrique de flavonoïdes avec du chlorure d'aluminium (Figure 42). La valeur la plus élevée a été détectée au miel du câprier (M 10) ( $50,41 \pm 0,54$  mg EQ/100 g), et la valeur minimale a été observée dans l'échantillon M 4 ( $2,86 \pm 1,33$  mg EQ/100 g). Les échantillons M 4 et M 10 ont conservé leur ordre concernant la teneur en flavonols et ont montré des valeurs de  $1,34 \pm 0,04$  mg EQ/100 g et  $18,14 \pm 0,90$  mg EQ/100 g, respectivement. Il convient de mentionner que l'échantillon M 8, qui présente la plus faible teneur en composition phénolique, ne présentait pas de taux détectables de flavonoïdes et de flavonols, en utilisant les protocoles décrits dans la section Matériels et méthodes. Les résultats des échantillons du présent travail sont supérieurs à ceux obtenus par Moniruzzaman *et al*, et à ceux obtenue par Khalil *et al* sur des échantillons Malaisien [258, 295].

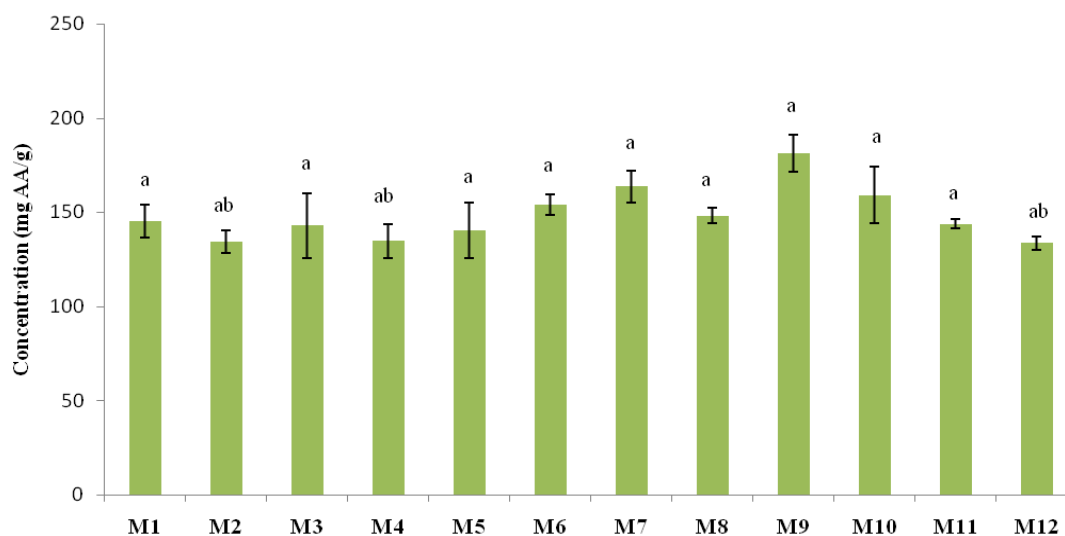


**Figure 42:** Teneur en flavonoïdes (gris foncé) et flavonols (gris clair) totaux des miels analysés

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

### c. La capacité antioxydante totale

En ce qui concerne la capacité antioxydante totale des miels étudiés, elle est exprimée en mg d'équivalents d'acide ascorbique par g à partir d'une courbe d'étalonnage. Les résultats illustrés dans le figure 43 montre que la capacité antioxydante totale la plus élevée a été trouvée dans l'échantillon M 9 avec une valeur de  $181,43 \pm 9,89$  mg EAA/g, alors que le miel le moins actif était l'échantillon M 12, présentant une valeur de  $133,76 \pm 3,45$  mg EAA/g [296].

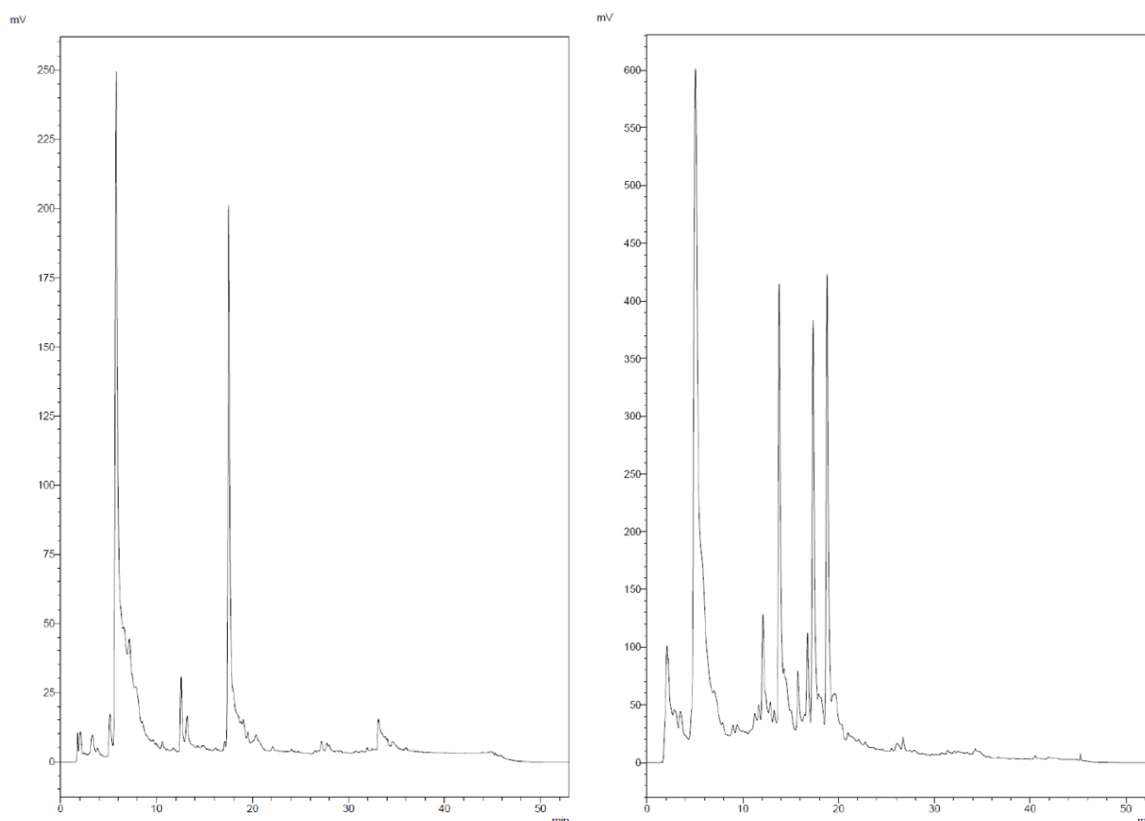


**Figure 43:** Comparaison de la capacité antioxydante totale des miels  
Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes



#### d. Identification des composés phénoliques dans les miels par HPLC-UV

La HPLC couplée au détecteur UV exploite les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer les solutés en fonction de leurs affinités et ainsi les identifier et/ou les doser. Les douze échantillons de miel ont été analysés par HPLC dans les mêmes conditions chromatographiques précédentes. Les acides phénoliques ont été détectés à 280 nm car la plupart des composés phénoliques présentent une absorbance raisonnablement élevée à cette valeur de longueur d'onde figure 44.



**Figure 44:** Séparation des composés phénoliques des miels par HPLC (à droite) de Palestine et de Maroc (à gauche)

Après la détermination des polyphénols totaux, la concentration de neuf composés phénoliques (exprimée en mg/100 g) des miels a été mesurée à partir de l'aire sous la courbe des pics, résultant d'une injection HPLC. Les résultats de l'analyse quantitative sont présentés dans le tableau 14.

Les neuf composés phénoliques ont été identifiés dans trois échantillons d'origine Marocaine. A savoir, miel du thym, câprier et de l'arbousier.

**Tableau 14:** Moyenne de la concentration en mg/100 g de composés phénoliques dans les échantillons de miel

Sample	Acide syringique	Acide tannique	Acide caféique	acide férulique	Acide coumarique	Acide gallique	Acide rosmarinique	Gallate d'épicatéchine	pyrogallol
<b>M 1</b>	0,25 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,36 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,05 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,16 <sup>c</sup>	1,73 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,03 ± 1,02 <sup>cd</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>c</sup>	ND	4,09 ± 0,08 <sup>d</sup>
<b>M 2</b>	ND	ND	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	0,12 ± 0,01 <sup>d</sup>	ND	0,48 ± 0,06 <sup>e</sup>
<b>M 3</b>	0,12 ± 0,05 <sup>b</sup>	ND	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,04 <sup>d</sup>	ND	ND	0,92 ± 0,04 <sup>b</sup>	ND	ND
<b>M 4</b>	0,35 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,08 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>M 5</b>	ND	5,62 ± 0,15 <sup>a</sup>	ND	1,93 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,15 <sup>c</sup>	18,42 ± 1,27 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,60 ± 0,04 <sup>b</sup>	ND
<b>M 6</b>	ND	ND	0,004 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>def</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>cdf</sup>	0,001 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,31 ± 0,06 <sup>e</sup>
<b>M 7</b>	0,16 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,04 <sup>f</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>de</sup>	0,72 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,16 ± 0,06 <sup>cdf</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>e</sup>	6,42 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,23 <sup>d</sup>
<b>M 8</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>M 9</b>	0,68 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,04 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,22 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,08 <sup>c</sup>	4,42 ± 1,05 <sup>b</sup>	4,22 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,38 ± 0,09 <sup>a</sup>	ND	9,65 ± 0,29 <sup>b</sup>
<b>M 10</b>	1,24 ± 0,65 <sup>a</sup>	5,39 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,70 ± 0,04 <sup>ab</sup>	1,40 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,20 ± 0,23 <sup>c</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,39 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,33 ± 0,84 <sup>d</sup>
<b>M 11</b>	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>	ND	5,88 ± 1,15 <sup>a</sup>	ND	8,20 ± 0,54 <sup>a</sup>	3,78 ± 0,06 <sup>c</sup>	ND	1,76 ± 0,1 <sup>c</sup>	6,23 ± 0,07 <sup>c</sup>
<b>M 12</b>	0,32 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,54 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,08 <sup>c</sup>	7,69 ± 0,84 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>e</sup>	3,92 ± 1,48 <sup>b</sup>	16,34 ± 1,13 <sup>a</sup>

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

L'acide syringique, un composé phénolique abondant dans de nombreux types de miel avec des capacités antioxydantes d'éliminer les radicaux libres et les ROS [297], était présent à des valeurs comprises entre 0,10 mg/100 g et 1,24 mg/100 g de miel pour les échantillons M11 (daghmous) et M10 (câprier) respectivement. Alors qu'il était absent des échantillons M2, M5, M6 et M8.

L'acide caféique (AC) est un composé phénolique représentatif que l'on trouve dans de nombreuses ressources naturelles telles que les fruits, les légumes, les herbes et le miel. L'AC possède de nombreuses activités biologiques, notamment des effets antioxydants, anticancéreux et antidiabétiques, et inhibe également la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [298]. L'échantillon M 11 (daghmous) a présenté la valeur la plus élevée en ce composé, alors que les autres échantillons présentent des valeurs très faibles par rapport au M 11.

Concernant l'acide tannique, cinq échantillons ont été dépourvus de ce composé (M 2, M 3, M 6, M 8 et M 11). Par ailleurs, Le miel M 5 est le plus riche en acide tannique dont la teneur était de: 5,62 mg/100 g de miel suivi par les miels M 12 et M 10 avec des teneurs de 5,54 mg/100 g et 5,39 mg/100 g de miel, respectivement.

Les composés phénoliques des miels sont pour la majorité des monophénols tels que les acides mono-hydrox benzoïques, coumarique et férulique [277]. Il est intéressant de noter que l'acide férulique, qui n'a pas été détecté dans 4 des échantillons analysés, était présent dans les miels M 5, M 11 et M 10 en quantités de 1,93 mg/100 g; 1,83 mg/100 g; 1,70 mg/100 g de miel, respectivement. Alors que les contenus les plus importants en acide coumarique ont été enregistrés dans les miels M 11 (daghmous), M 9 (bechnikha) et M 5 (multiforal) avec des valeurs allant de 8,20 mg/100 g, 4,42 mg/100 g et 2,75 mg/100 g de miel respectivement.

Le pyrogallol, un inhibiteur actif des lignées cellulaires tumorales humaines [298, 299], était le plus abondant dans le miel d'arbousier (M 12) avec une valeur de 16,34 mg/100 g. Cette valeur était aussi le contenu le plus élevé par rapport aux autres composés identifiés dans le même échantillon. La valeur minimale du pyrogallol était présentée par le miel M 6 (sader; 0,31 mg/100 g).

Les composés phénoliques peuvent être considérés comme des marqueurs de l'origine florale [277]. Un exemple est celui du miel de thym caractérisé par la présence de l'acide rosmarinique [300]. Dans le présent travail, le contenu en acide rosmarinique dans le miel du

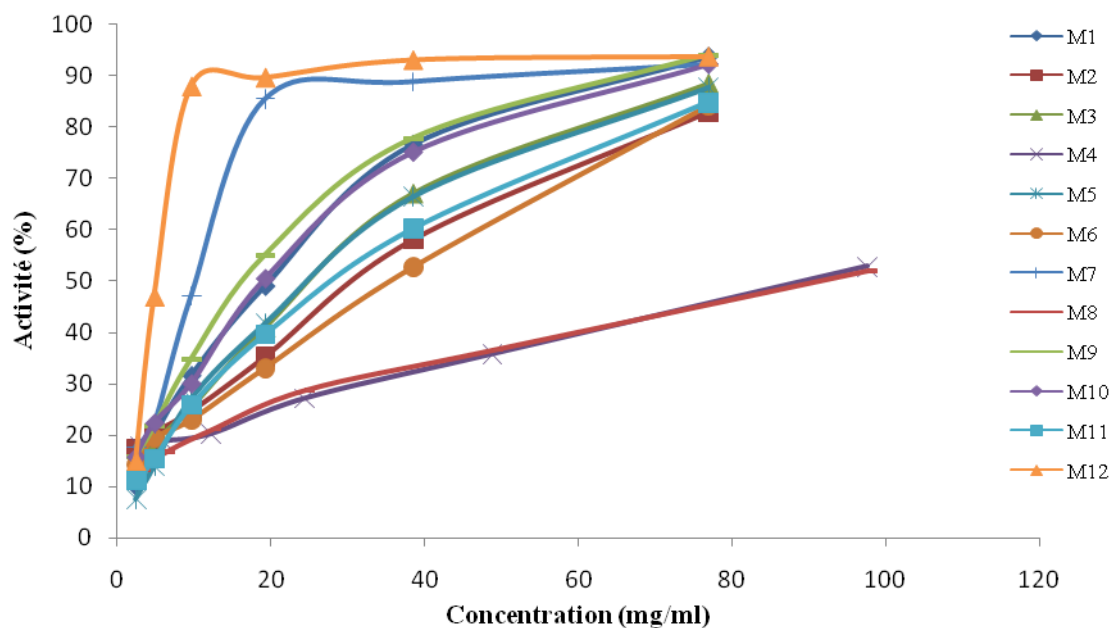
thym (M 7) était de 0,02 mg/100 g. Il est très faible par rapport au miel de l'*Ammi visnaga* (M 9) avec une valeur 1,38 mg/100 g de miel.

D'autre part, certains composés phénoliques sont impliqués dans les qualités organoleptiques des produits [277]. L'acide gallique (AG) ou l'acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque, constitué d'une structure phénolique trihydroxylée, est un intermédiaire du métabolisme des métabolites secondaires chez les végétaux supérieurs [5], et se retrouve dans le miel. Cet acide est connu par ses potentialités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimutagènes, anticancéreuses et cardioprotectrices [301]. Les valeurs obtenues pour l'acide gallique présentent des différences significatives variant entre 0,35 mg/100 g à 18,42 mg/100 g de miel.

Enfin, le gallate d'épicatéchine, en général présent dans le thé vert, le sarrasin et le raisin [302–304]. Ce composé est connu par des effets protecteurs contre les lésions d'ischémie / reperfusion hépatique et la transplantation hépatique [305]. L'échantillon M6 (sader) a enregistré la valeur la plus faible, tandis que l'échantillon thym (M7) présentait la valeur la plus élevée. Les échantillons M1, M2, M3, M4, M8 et M9 n'ont pas présenté des niveaux détectables.

#### **e. Capacité de piégeage des radicaux DPPH**

Les composés ou miel qui sont capables, à très faible concentration, de changer la couleur du radical libre DPPH, du violet au jaune sont considérés antioxydants, par conséquent anti-radicalaires [305]. La figure 45 montre l'activité du miel contre les radicaux DPPH, augmentant avec la concentration (dose - dépendance). Le graphe de chaque miel est utilisé pour le calcul de l'IC<sub>50</sub>, la concentration du miel susceptible de provoquer 50% d'inhibition, et les résultats sont illustrés dans le tableau 16.



**Figure 45:** Inhibition du DPPH par les miels

Le miel le plus actif en termes de piégeage des radicaux DPPH est le miel d'arbousier (M 12) avec une  $IC_{50}$  de  $5,61 \pm 0,18$  mg/ml, alors que le miel le moins actif est l'échantillon M 8 (limon avec  $IC_{50} = 91,46 \pm 1,91$  mg/ml). Ces résultats sont inclus dans l'intervalle rapporté par El amine et *al* [25]. L'activité anti-radicalaire des autres échantillons est classée comme suit:  $M 7 > M 9 > M 1 > M 10 > M 5 > M 3 > M 11 > M 2 > M 6 > M 4$ .

Les différences enregistrées en ce qui concerne la capacité des échantillons à réduire les radicaux DPPH sont probablement dues à la diversification de la composition chimique des miels analysés, elle-même dépendante de la diversité de l'origine botanique de ces échantillons. En effet, les miels qui sont riches en composés phénoliques et en flavonoïdes ont une forte capacité de piéger les radicaux libres et donc une activité antioxydante élevée [97, 275].

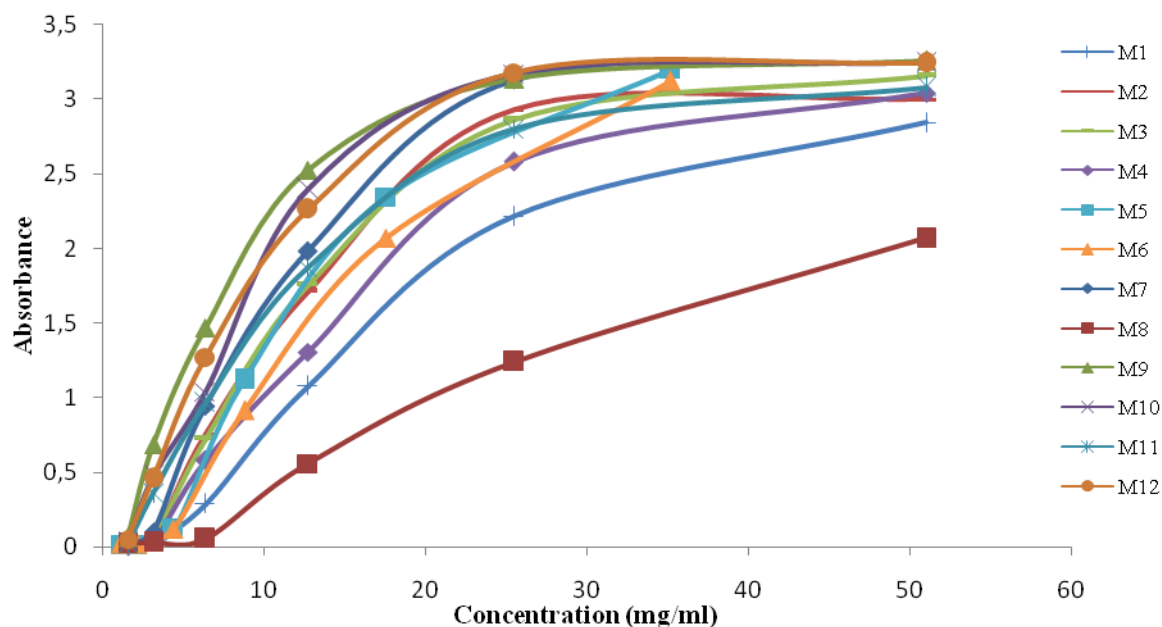
**Tableau 15:**  $IC_{50}$  de l'essai DPPH des échantillons du miel

Miels	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
$IC_{50}$ mg/ml	20,88 $\pm$ 0,36 <sup>d</sup>	31,74 $\pm$ 0,31 <sup>ef</sup>	26,36 $\pm$ 0,25 <sup>e</sup>	89,49 $\pm$ 1,03 <sup>g</sup>	26,09 $\pm$ 0,58 <sup>e</sup>	38,09 $\pm$ 0,26 <sup>f</sup>
Miels	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12
$IC_{50}$ mg/ml	10,85 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	91,46 $\pm$ 1,91 <sup>g</sup>	16,84 $\pm$ 0,68 <sup>c</sup>	21,23 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>	29,36 $\pm$ 0,96 <sup>ef</sup>	5,61 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

## f. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est un test estimant la capacité du miel à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) [306]. il est en relation avec la teneur du miel en différents composés phénoliques [275]. Le pouvoir réducteur des miels étudiés est dose-dépendant (figure 46).



**Figure 46:** Graphique du pouvoir réducteur des échantillons de miel

Les échantillons de miel analysés ont enregistré des valeurs  $\text{IC}_{50}$  comprise dans l'intervalle allant de  $1,60 \pm 0,97$  mg/ml (M 7; thym) à  $13,06 \pm 0,65$  mg/ml (M 8; limon). Par ailleurs, dans le tableau 17, les valeurs du pouvoir réducteur des miels restant sont classés comme suit:  $\text{M 9} > \text{M 3} > \text{M 2} > \text{M 12} > \text{M 10} > \text{M 11} > \text{M 1} > \text{M 4} > \text{M 5} > \text{M 6}$ .

**Tableau 16:**  $\text{IC}_{50}$  des échantillons du miel étudié par test du pouvoir réducteur

Miels	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
$\text{IC}_{50}$ mg/ml	4,18 ± 0,70 <sup>ab</sup>	3,15 ± 0,64 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,08 <sup>a</sup>	5,55 ± 0,36 <sup>abc</sup>	6,06 ± 0,33 <sup>abc</sup>	6,60 ± 0,25 <sup>abc</sup>
Miels	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12
$\text{IC}_{50}$ mg/ml	1,60 ± 0,97 <sup>a</sup>	13,06 ± 0,65 <sup>d</sup>	1,82 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,54 ± 1,05 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,02 <sup>ab</sup>	3,35 ± 0,04 <sup>a</sup>

Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes

### g. Corrélation et analyses multi variée

Dans les échantillons analysés dans le présent travail, une forte corrélation positive entre les polyphénols et la couleur ( $r= 0,9378$ ) a été observée (Tableau 18). Cette relation est similaire à celle trouvée dans d'autres miels Marocains [41]. Les contenus en phénols et ceux en flavonoïdes et en flavonols ont été aussi positivement corrélés ( $r= 0,9408$ ,  $r=0,9538$ ), étant donné que ces derniers sont des dérivés des polyphénols. Par conséquent, une forte corrélation entre la couleur et les flavonoïdes ( $r= 0,9428$ ) a été obtenue. En général, les miels les plus foncés contiennent des quantités de flavonoïdes supérieures aux miels les plus clairs [307].

**Tableau 17:** Coefficients de corrélation entre les composés

	Phénols	Flavonoïdes	Flavonols	TAC	DPPH	Pouvoir réducteur	couleur	Mélanoïdines	Pfund
Acide syringique	0,626*	-	-	-	-	-	-	0,599*	-
Acide coumarique	-	-	-	-	-	-	0,635*	-	0,651*
Pyrogallol	0,693*	0,657*	-	-	-	-	0,640*	0,608*	0,578*
Phénols	1	0,948**	0,961**	-	-0,757**	-0,675*	0,942**	0,944**	0,864**
Flavonoïdes	0,948**	1	0,918**	-	-0,696*	-0,642*	0,952**	0,890**	0,925**
Flavonol	0,961**	0,918**	1	-	-0,775**	-0,735**	0,945**	0,981**	0,893**

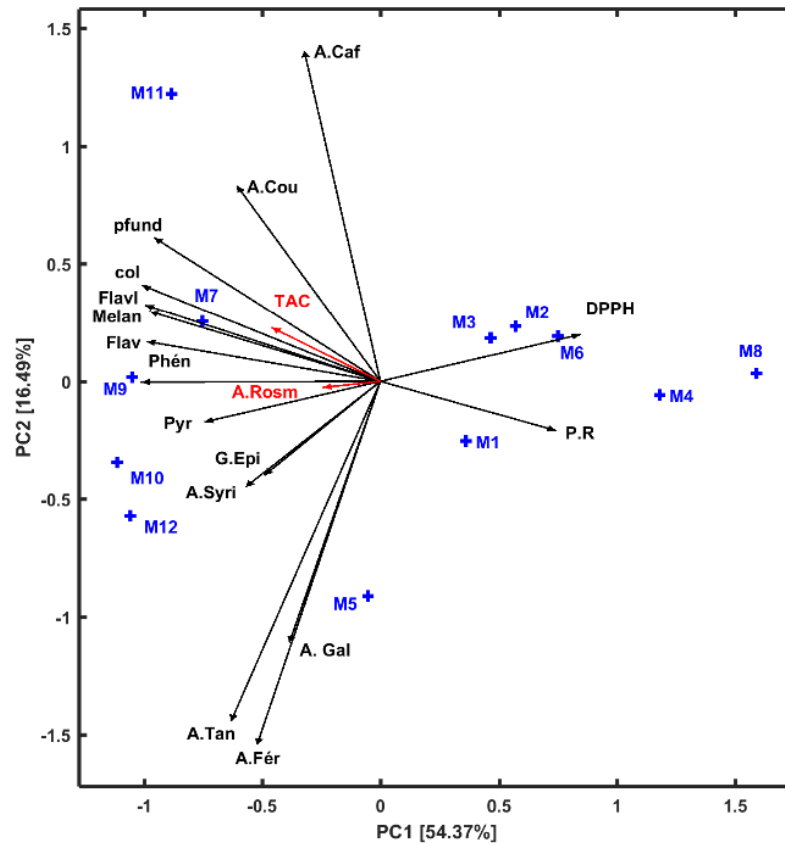
La corrélation positive mentionnée ci-dessus pourrait être révélée en considérant les composés phénoliques identifiés. Ces derniers interviennent sur la coloration jaune par l'intermédiaire des flavonoïdes et d'une manière générale par les composés phénoliques impliqués dans les phénomènes de brunissements enzymatiques ou non enzymatiques [256]. Par ailleurs, une corrélation nette entre la couleur et acide coumarique ( $r = 0,651$ ) et le pyrogallol ( $r = 0,640$ ).

Toujours à travers les résultats du tableau 18, une forte corrélation positive entre la capacité anti-radicalaire DPPH et les niveaux de polyphénols, représentée par la valeur négative de facteur ( $-0,7570$ ) avec l'IC<sub>50</sub>, a été observée. Étant donné que la teneur en polyphénols gouverne la couleur de miel, une forte corrélation négative a été observée dans le cas de la couleur avec l'IC<sub>50</sub> de la même activité antioxydante ( $r = -0,7105$ ). De ce fait la couleur de miel pourrait être un indicateur visuel pour la sélection des miels présentant une forte activité antioxydante.

La relation entre les molécules bioactives et les activités antioxydantes pourrait être détectable dans le cas du pouvoir réducteur, où une bonne corrélation a été démontrée avec la

teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en flavonols, présentant des valeurs  $r$  de  $-0,675$ ,  $-0,601$  et  $-0,735$  respectivement.

En ce qui concerne les analyses multi variées, La figure 47 illustre l'intégration de l'information de la composition phénolique avec les activités antioxydantes des échantillons étudiés en utilisant l'ACP comme étant un outil performant de réduction des échelles et de concentration de l'information dans un nombre restreint de composantes dites principales.



**Figure 47:** Analyse en composantes principales (PCA) de la teneur en antioxydants et des propriétés anti oxydantes des miels

Les deux premières composantes principales expliquaient 54,37% et 16,49%, successivement, de l'information contenue dans la matrice originale des données. La première CP, étant donnée la composante qui garde plus d'information, a corrélé négativement les phénols totaux et les flavonoïdes, ainsi que le reste des composés phénoliques identifiés. Par conséquent, une corrélation positive peut être observée entre la même CP et les  $IC_{50}$  des activités antioxydantes.

Considérant les similarités des scores (les échantillons), la première composante principale a permis la distinction de deux groupes, dont les échantillons de chacun



présentaient des caractéristiques similaires en termes de composition phénolique et d'activités antioxydantes. Un premier groupe, composé d'échantillons d'origine Marocaine, présentaient des contenus élevés en composés phénoliques, et donc des IC<sub>50</sub> de piégeage de radicaux libres basses en comparaison aux autres échantillons. Ce groupe est localisé dans la partie négative du graphique. Le deuxième groupe composé d'un échantillon d'origine marocaine, faisant l'exception (M8), et des échantillons de miels palestiniens, présentait les caractéristiques opposées (contenu faible en composés phénoliques et de IC<sub>50</sub> élevées). Ces échantillons occupaient donc la partie droite du graphique.

La deuxième CP a corrélé principalement avec l'acide caféique et l'acide coumarique dans sa partie positive, alors qu'une corrélation négative peut être observée dans le cas des acides gallique, tannique et férulique. Indépendamment de l'origine géographique, cette deuxième composante a pu discriminer les échantillons de miel présentant une teneur élevée d'acide caféique et d'acide coumarique de ceux présentant de hauts niveaux en acides gallique, tannique et férulique. Ceci suggère que la corrélation négative existante entre les deux groupes de composés phénoliques peut être due à une opposition de voies métaboliques dans les plantes originaires des miels. Pourtant, des conclusions déterminantes peuvent être élaborées seulement après analyses d'un nombre plus élevé d'échantillons de miels de différentes origines botaniques.

## **Chapitre III**

### **Activité antibactérienne des miels, de l'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* et leur mélange (Aromiels)**

**Article 1: Hamada Imtara, Youssef Elamine, Badiâa Lyoussi.** Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare* L. Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018. (Publié)

## 1. Introduction

Une infection bactérienne est une maladie provoquée par l'intervention d'une bactérie pathogène sur un organisme, et qui peut être soit: locale, générale ou aussi focale. Les antibiotiques sont utilisés comme remède pour ces infections dans la majorité des cas. Actuellement, de plus en plus d'antibiotiques font face à des résistances qui pourraient devenir très néfastes si elles ne sont pas endiguées [309, 310].

Concernant la résistance aux antibiotiques, l'organisation mondiale de la santé a publié au début de l'année 2017 un rapport répertoriant les bactéries multirésistances les plus dangereuses auxquelles de nouveaux antibiotiques devraient être découverts de toute urgence et déclare que 700 000 personnes meurent chaque année par les bactéries multi-résistantes. En outre, la résistance aux antibiotiques entraîne une augmentation des dépenses médicales, une prolongation des hospitalisations. La mise au point de nouveaux antibiotiques, la résistance demeurera une grave menace sans une modification des comportements [311].

Pour cela, il existe un besoin urgent et immédiat de nouveaux agents actifs contre la résistance aux antibiotiques [312, 313]. Un large éventail de mesures est nécessaire pour garantir à la fois que les antibiotiques actuellement disponibles restent efficaces le plus longtemps possible et pour promouvoir la recherche de nouveaux médicaments et des produits naturels alternatifs pour lutter contre la résistance des bactéries.

Les miels et les huiles essentielles, sont des sources importantes d'agents thérapeutiques. Ils sont connus par leurs effets antibactériens, car ils contiennent des quantités importantes de composés phénoliques qui jouent un rôle majeur dans le traitement des infections bactériennes [3-6]. Une huile essentielle ou un miel peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, bio statique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci pourrait être lié d'une part au type de microorganisme (Gram positif ou Gram négatif), à sa forme planctonique ou en bio film, à son métabolisme et à sa résistance, à la composition chimique de chaque produit et à ses caractéristiques. Par conséquent, dans l'étude de nouveaux antimicrobiens puissants, la recherche devrait s'orienter vers l'étude de la combinaison de substances pour atteindre l'efficacité antimicrobienne [314]. Notre travail s'intéresse plus précisément à l'étude de l'effet synergique entre l'huile d'origan et douze types de miel sur différents souches bactériennes dont le but principal est de cibler la meilleure activité antibactérienne qui nous a permet de faire face à cette problématique de résistance toute en utilisant des produits naturels

(miel et huile essentielle). En outre, l'effet possible des paramètres physicochimiques et composés phénoliques du miel sur les activités antimicrobiennes acquises a été évalué à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP) et Dendrogramme (est un diagramme fréquemment utilisé pour illustrer l'arrangement de groupes analyses par un regroupement hiérarchique ou hiérarchisant).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Préparation des Milieux de culture

Le milieu Muller Hinton gélosé (MH) obtenu en dissolvant 38 g du milieu MH dans 1L d'eau distillée (Le pH est de  $7,5 \pm 0,2$ ) et le bouillon MH (21 g/l dans l'eau distillée) ont été utilisés dans la présente étude. Chaque milieu a été stérilisé à l'autoclave à une température de 115 °C pendant 15 min.

### 2.2. Souches microbiennes

Les souches *E.coli* BLSE (ATB:87) BGN, *E.coli* (ATB: 57) B6N et *E.coli* (ATB: 97) BGM sont des bactéries bacilles Gram - et ont été isolées à partir de l'hôpital universitaire Hassan II. Tandis que les souches *Pseudomonas aeruginosa* (bacilles Gram -), *Streptococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* (Cocci Gram +) ont été isolées à partir du Laboratoire de Microbiologie de la FMP, Fès. Le tableau ci-dessous montre les antibiotiques appliqués pour chaque souche étudiée. La croissance bactérienne est réalisée à 37 °C en milieu liquide Mueller-Hinton Broth (MHB) et sur gélose Mueller-Hinton Agar (MHA).

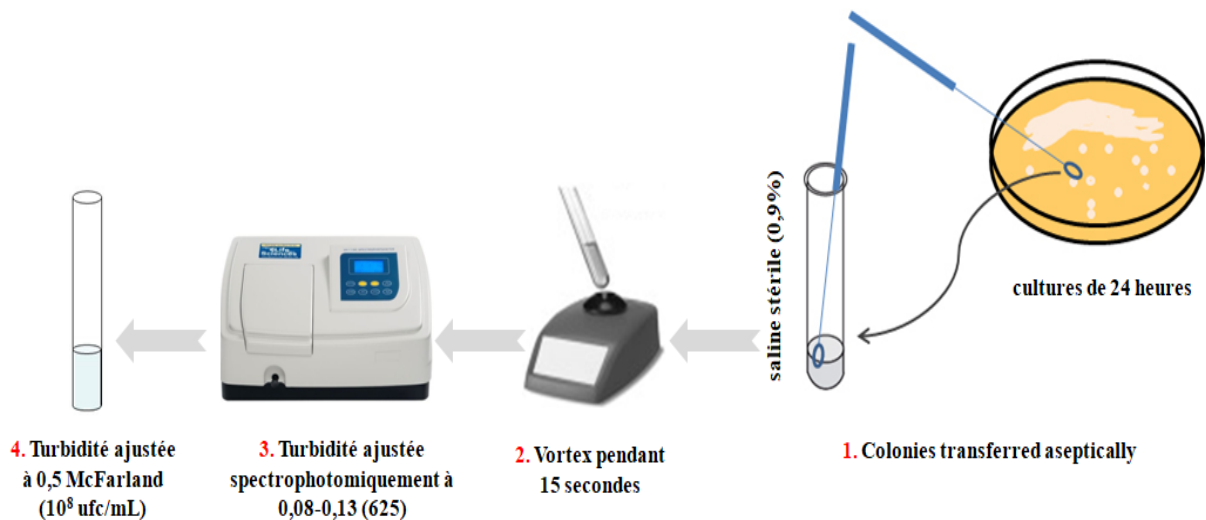
**Tableau 18:** Liste des antibiotiques appliqués aux bactéries étudiées

Souches bactériennes	Antibiotiques
<i>E.coli</i> BLSE (ATB:87) BGN	CXM, CRO, CEC, AMX, CAZ, CTX, KF et CIP
<i>E.coli</i> (ATB: 57) B6N	CXM, AMX, CTX, K, SXT et CIP
<i>E.coli</i> (ATB: 97) BGM	AMX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SXT et AMC
<i>Streptococcus faecalis</i>	SXT, TE, VA, E, P et OX
<i>Staphylococcus aureus</i>	VA

CXM: Céfuroxime; CRO: Ceftriaxone; CEC: Céfaclor; AMX: Amoxicilline; CAZ: Ceftazidime; CTX: Céfotaxime; K:kanamycine; CIP: Ciprofloxacine; SXT: Triméthoprime/sulfaméthoxazole; AMC: Amoxicilline + acide clavulanique; TE: Tétracycline; VA: Vancomycine; E: Erythromycine; P: Pénicilline; OX: Oxacilline.

### 2.3. Préparation de l'inoculum bactérien

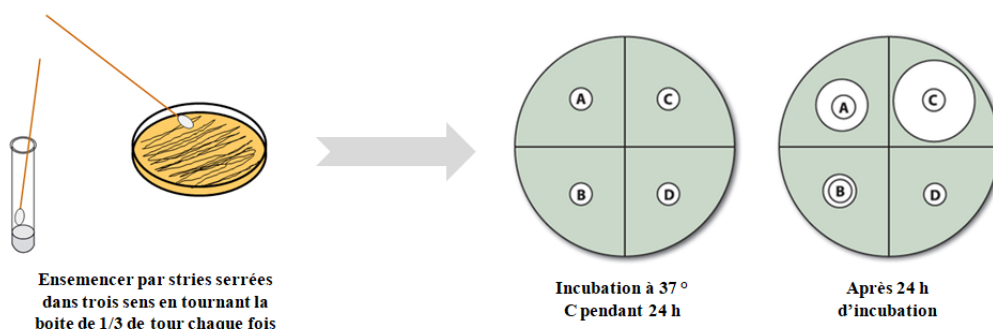
L'inoculum bactérien a été obtenu en prélevant des colonies à partir de cultures de 24 heures. Les colonies ont été mises en suspension dans une solution saline stérile (0,9% de NaCl) et vortex pendant 15 secondes. La densité a été ajustée à une turbidité de 0,5 McFarland, ce qui correspond à une densité optique de 0,08–0,13 mesurée à une longueur d'onde de 625 nm (figure 48). La concentration finale de l'inoculum sera approximativement de l'ordre de  $10^8$  ufc/ml [257, 315].



**Figure 48:** Résumé des étapes de la préparation des suspensions bactériennes

### 2.4. Activité antibactérienne par méthodes de disque (Diffusion sur gélose)

Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne d'HE et des miels a été réalisé par la technique modifiée de Kirby–Bauer [316]. Des boîtes de pétris (9 cm de diamètre) remplies par de gélose Muller–Hinton sont ensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions standardisées ( $10^8$  ufc/mL). Ensuite, Des disques de papier Whatman (6 mm) sont déposés sur la surface de la gélose pré-inoculée. Puis, les disques sont imprégnés de 5  $\mu$ l pour l'HE et 20  $\mu$ l pour les miels. Toutes les boîtes ont été incubées à 37 ° C pendant 24h. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (figure 49).

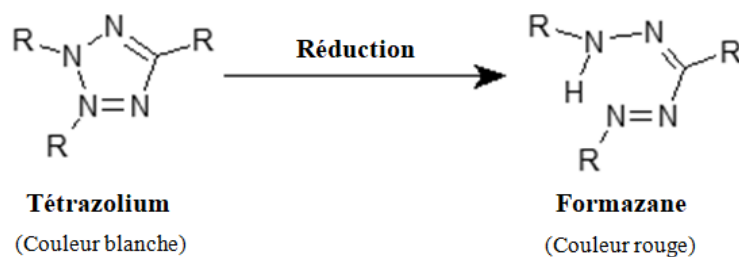


**Figure 49:** Etapes de la technique de diffusion sur gélose

## 2.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les CMI ont été déterminées par des tests de micro-dilution dans des plaques à 96 puits selon les normes du NCCLS [257]. Avec modification, huit concentrations d'HE et six concentrations de miel sont préparées dans des tubes d'hémolyse stériles. Ils sont réalisés par dilutions successives 1/2 dans de l'eau distillée allant de 500 à 15,63 mg/ml pour les miels. Tandis que pour l'HE, nous avons dilué dans DMSO (10%) allant de 10 à 0,09%. Les concentrations finales de miels dans les puits se situaient de 250 à 7,81 mg/ml et de 1 à 0,009% pour l'huile essentielle, de telle sorte que la concentration de DMSO ne dépasse pas 1% dans les puits. Les suspensions bactériennes ont été préparées de la même manière que précédemment décrite, ensuite ces suspensions ont été diluées dans de l'eau physiologique pour avoir une concentration finale de  $5 \times 10^5$  ufc et étalées dans des plaques à 96 puits.

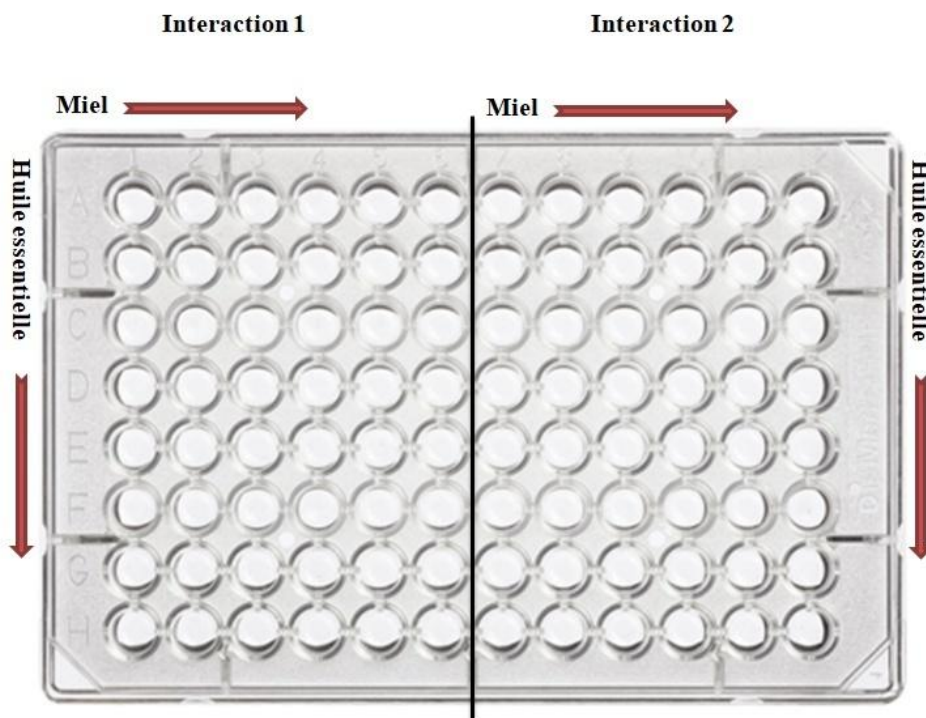
Après que les plaques soient incubées à 37 °C pendant 18h, 40 µl de chlorure de triphényltétrazolium (TTC: qui est un indicateur de la croissance bactérienne, il est réduit en formazan insoluble à l'intérieur de la cellule, cette réaction se manifeste par l'apparition d'une couleur rouge (figure 50) (0,5%) a été ajouté à chaque puits. Après 2h d'incubation, la CMI correspond à la concentration la plus faible qui ne produit pas de couleur rouge) [257]. En effet, la CMI est une valeur indicatrice du pouvoir bactériostatique d'un antibactérien.



**Figure 50:** La réduction de la coloration de TTC d'une coloration blanche à une coloration rouge

## 2.6. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec des miels

L'évaluation de l'interaction entre les miels et l'HE a été réalisée selon la méthode modifiée de Nishio et *al* [317]. Brièvement, huit concentrations d'HE et six concentrations de miels ont été préparées dans des tubes stériles par des dilutions 1/2. Ensuite, les concentrations de miels sont introduites verticalement dans huit puits de manière décroissante allant de CMI  $\times$  2 à CMI/16, tandis que les concentrations en huiles essentielles sont introduites horizontalement dans sept puits de manière décroissante de CMI  $\times$  2 à CMI/64 (figure 51).



**Figure 51:** Combinaison sur microplaque de 96 puits

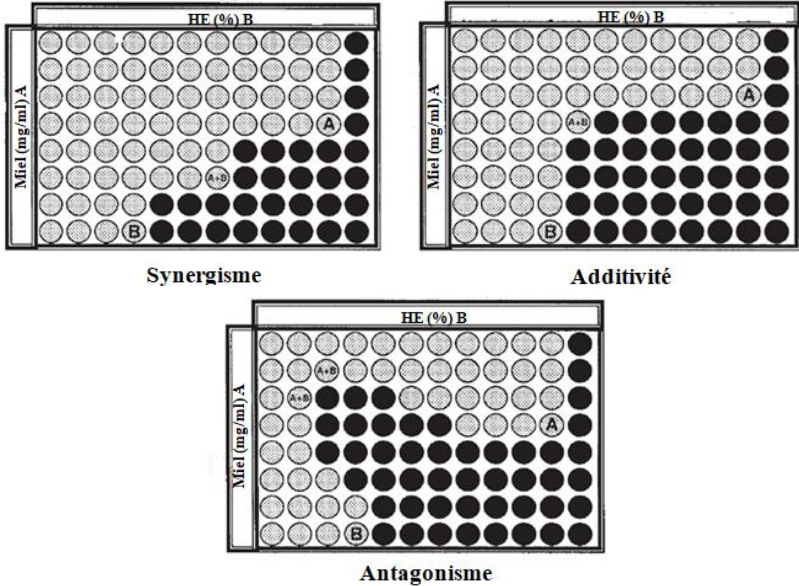
Après incubation de la microplaque à 37 °C pendant 24 h, la lecture des microplaques (figure 52). L'interprétation des résultats se fait en calculant la CFI (la concentration fractionnelle inhibitrice).

$$\text{CFI} = \text{CFI de miel} + \text{CFI d'HE}$$

CFI des miels ou HE se calcule comme suit:

- CFI de miel = CMI de la combinaison/CMI de miel seul.
- CFI d'HE = CMI de la combinaison/CMI d'HE seul.

La signification des CFIs est déterminée comme suit:  $CFI \leq 0,5$ : cas de synergie,  $CFI$  entre 0.5 et 1: cas d'additive  $CFI$  entre 0,5 et 4, il n'y a pas d'interaction entre les deux agents antimicrobiens,  $CFI \geq 4$ : cas d'antagonisme.



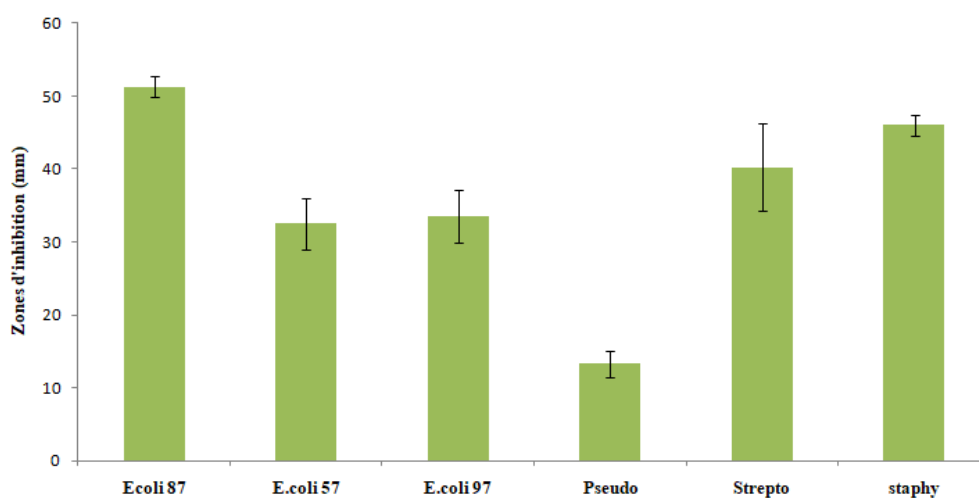
**Figure 52:** Interprétation des résultats de la combinaison



### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Méthode de diffusion sur gélose

Dans notre étude, l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* utilisée dans le test de diffusion sur gélose contre les souches bactériennes Gram-négatives et Gram-positives étudiées a donné un diamètre d'inhibition de:  $51,25 \pm 1,41$  mm,  $46 \pm 1,41$  mm,  $40,25 \pm 6,01$  mm,  $33,5 \pm 3,54$  mm,  $32,5 \pm 3,54$  mm et  $13,25 \pm 1,77$  mm, avec *Ecoli 87*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Ecoli 97*, *Eoli 57* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement (Figure 53). Par ailleurs, pour les miels, le volume utilisé (20  $\mu$ l) n'a donné aucun effet sur les souches étudiées.



**Figure 53:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) générées par l'HE d'*Origanum vulgare* contre différentes souches bactériennes. Ecoli: *Escherichia coli* ; Pseudo: *Pseudomonas aeruginosa* ; Strepto: *Streptococcus faecalis* ; Staphy: *Staphylococcus aureus*

Le carvacrol et le thymol sont les composés majoritaires d'HE de l'origan qui sont connus par leur capacité d'augmenter la perméabilité membranaire [197]. En détruisant la membrane externe des bactéries [318]. Une étude réalisée sur *Bacillus cereus* a bien élucidé le mode d'action du carvacrol. Ce composé traverse la bicouche lipidique et se localise entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, entraînant une modification de la perméabilité passive. Une diminution de l'ATP intracellulaire a été notée chez les bactéries exposées au carvacrol ainsi qu'une diminution du potentiel membranaire [194].

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles [319]. Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il altère la perméabilité et entraîne une perte du matériel intracellulaire, et interagit avec des sites intracellulaires. Une étude a montré que l'exposition des cellules de

*L. monocytogenes* à des huiles essentielles de thym, aboutit à une diminution de la taille des bactéries, une altération de la paroi bactérienne, une agrégation du cytoplasme et un rapprochement des cellules [320]. Un autre composé présent dans notre HE qui est la terpinène-4-ol avec un spectre d'action très étendu sur les bactéries. Ce composé agit sur de nombreuses espèces bactériennes, comprenant des bactéries Gram positives et Gram négatives, et se révèle très efficace contre les infections aux SARM (*Staphylocoques* résistants à la méthicilline) [321].

Néanmoins, il est important de signaler qu'il y a des paramètres qui peuvent influencer sur le diamètre des zones d'inhibitions autres l'activité antimicrobienne des HEs, la diffusion et la viscosité de ces derniers [189]. Par conséquent, on note que la méthode de diffusion sur gélose ne soit pas la technique idéale pour l'évaluation du potentiel antimicrobien des HEs vis-à-vis des microorganismes. Son utilisation reste uniquement pour des criblages rapides. Par contre, la détermination des CMI est une technique plus fiable, car cette méthode permet la quantification de l'activité antimicrobienne de l'agent testé.

### **3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Tous les échantillons de miel ont révélé un résultat positif contre les pathogènes testés. Le tableau 20 résume les données des CMI de chaque échantillon de miel par rapport à la souche bactérienne testée. Les valeurs de CMI des miels allaient de 62,5 mg/ml à 250 mg/ml sur six souches. Parmi les souches bactériennes testées, *Staphylococcus aureus* était la plus sensible et *Streptococcus faecalis* était la plus résistante. Les résultats des CMI rapportés dans cette étude sont plus élevés que ceux rapportés par Bouhlali et al et Mandal et al [322, 323], mais similaire aux résultats des CMI rapportés par Boukraa qui ont trouvé les CMI du miel allant de 6% à 25% pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [324]. Les propriétés antimicrobiennes majeures du miel sont liées directement à la présence de peroxyde d'hydrogène, ainsi que les facteurs non-péroxydes qui contribuent à l'activité antibactérienne et antioxydante du miel (acides phénoliques et flavonoïdes) [325–327]. D'autres études ont montré que l'activité antibactérienne varie en fonction de la région phytogéographique [328]. Des études plus récentes ont rapporté la présence d'autres composants antimicrobiens, à savoir le peptide antimicrobien Bee défensin-1, HMF, et le méthylglyoxal (MGO), mais aussi des composés phénoliques tels que les flavonoïdes [327].

**Tableau 19:** Valeurs les CMI des échantillons de miel (mg/ml) et CMI de HE (%) utilisés individuellement

Miels et HE	<i>E.coli</i> (ATB:87) BGN	<i>E.coli</i> (ATB:57) B6N	<i>E.coli</i> (ATB: 97) BGM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
M 1	125	250	250	125	250	125
M 2	62,5	125	250	125	250	62,5
M 3	125	250	250	125	250	62,5
M 4	125	125	250	125	250	125
M 5	250	125	-	250	250	-
M 6	125	125	250	250	250	125
M 7	125	125	250	125	250	62,5
M 8	125	125	-	250	-	250
M 9	125	125	250	125	250	62,5
M 10	125	125	250	125	250	62,5
M 11	125	125	250	125	250	62,5
M 12	250	250	250	250	250	250
HE	0,125	0,125	0,5	0,5	1	1

En ce qui concerne les CMI de l'huile essentielle sur différentes souches de bactéries a montré que les souches Gram-négatives sont plus sensibles que les bactéries Gram-positives (tableau 19). Cependant, nous avons constaté d'après les résultats obtenus ainsi que l'ensemble des informations tirées de la bibliographie, que l'activité antimicrobienne des HES semble être similaire à celle des désinfectants et des antiseptiques plus que celle des antibiotiques pour plusieurs raisons. Premièrement, le pouvoir antimicrobien des HES n'est pas spécifique, vu qu'elle agit sur la déstabilisation et la fragilisation des membranes cytoplasmiques des cellules procaryotes mais d'une façon non ciblée [115]. Au contraire, les antibiotiques ont une cible bien déterminée à l'échelle moléculaire. Ceci permet à ces substances d'agir envers le microorganisme cible d'une façon spécifique et à de très faibles concentrations [329]. Deuxièmement, les HES attaquent comme les antiseptiques des microorganismes, quelle que soit la phase de multiplication: la phase de latence et même l'état VNC (viable non cultivable) [330]. Au contraire, les antibiotiques agissent généralement sur des bactéries en phase de multiplication [329]. Troisièmement, les HES de même que les antiseptiques connus par un spectre d'activité antimicrobienne très large, envers tous les types des microorganismes, non seulement les bactéries, les champignons et même les virus [330]. Tandis que le spectre d'activité des antibiotiques est généralement limité à un type de microorganisme, par exemple les bactéries, et même vis-à-vis d'une famille ou une espèce bien particulière [329].

### 3.3. Etude de la combinaison des huiles essentielles avec des miels

Nous avons cité dans la partie bibliographique qu'il y a quatre types d'effets qui pourraient être le résultat d'une synergie, parmi lesquels: L'élimination ou la neutralisation des effets indésirables par les composés dans le mélange: même s'il ne s'agit pas d'un effet synergique réel, il génère une meilleure efficacité thérapeutique. Vu que les HEs sont des substances irritantes à certaines concentrations [115], le mélange de ces derniers avec le miel va permettre de diminuer les concentrations efficaces (CMI) d'HE par quatre jusqu'à huit fois (diminue sa toxicité) en même temps l'augmentation de l'activité des miels est assurée.

Afin de déterminer le type d'interaction résultant de la combinaison entre l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et les différents échantillons du miel vis-à-vis des différentes souches testées, nous avons utilisé comme test le checkerboard assay dont le but est de mesurer l'activité inhibitrice du mélange en déterminant la concentration fractionnaire inhibitrice (CFI). Les résultats obtenus (tableaux 20-25) sont traduits soit par des interactions positives (synergie) ou négatives (antagonisme), soit pas d'interaction et soit par un effet additif.

Parmi les 12 échantillons du miel mélangés avec l'huile essentielle testés contre *E.coli* 87, sept échantillons (M 2, M 4, M 5, M 6, M 7, M 8 et M 12) n'ont donné aucune interaction, alors que les cinq échantillons (M 1, M 3, M 9, M 10 et M 11) ont donné une interaction additive (tableau 20).

**Tableau 20:** Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre *E. coli* 87

Miels	CMI combinée / CMI de miel seul	CFI de miel	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI d'HE	Σ CFI	Interaction
M 1	62,5/125	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 2	62,5/62,5	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 3	62,5/125	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 4	125/125	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 5	250/250	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 6	125/125	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 7	250/125	2	0,0625/0,125	0,5	2,5	Pas d'interaction
M 8	250/125	2	0,0625/0,125	0,5	2,5	Pas d'interaction
M 9	62,5/125	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 10	62,5/125	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 11	62,5/125	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 12	250/250	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction

Alors que pour les 12 échantillons du miel testés sur *E.Coli* 97 avec l'HE, cinq échantillons du miel n'ont présenté aucune interaction (M 4, M 6, M 7, M 9, et M 12), par comparaison avec deux échantillons (M 1 et M 2) qui ont présenté une interaction additive,

deux échantillons (M 3 et M 10) ont montré une interaction synergique partielle, et un seul échantillon (M 11) a révélé une interaction synergique (Tableau 21).

**Tableau 21:** Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre *E. coli 97*

Miels	CMI combinée / CMI de miels seul	CFI de miel	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI d'HE	Σ CFI	Interaction
M 1	125/250	0,5	0,125/0,5	0,25	0,75	Synergie partielle
M 2	125/250	0,5	0,125/0,5	0,25	0,75	Synergie partielle
M 3	125/250	0,5	0,0625/0,5	0,125	0,625	Synergie partielle
M 4	250/250	1	0,250/0,5	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 5	-	-	0,125/0,5	0,25	-	-
M 6	250/250	1	0,0625/0,5	0,125	1,125	Pas d'interaction
M 7	250/250	1	0,125/0,5	0,25	1,25	Pas d'interaction
M 8	-	-	0,125/0,5	0,25	-	-
M 9	250/250	1	0,250/0,5	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 10	125/250	0,5	0,0625/0,5	0,125	0,625	Synergie partielle
M 11	62,5/250	0,25	0,031/0,5	0,062	0,312	Synergie
M 12	250/250	1	0,0625/0,5	0,125	1,125	Pas d'interaction

Sur les 12 échantillons de miel testés, la combinaison entre neuf échantillons de miel (M 2, M 4, M 5, M 6, M 7, M 8, M 9, M 10, et M 11) et l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* n'a donné aucun type d'interaction, face à trois échantillons (M 1, M 3 et M 12) qui ont donné une interaction additive contre *E.coli 57* (Tableau 22).

**Tableau 22:** Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre *E. coli 57*

Miels	CMI combinée / CMI de miels seul	CFI de miel	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI d'HE	Σ CFI	Interaction
M 1	125/250	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 2	125/125	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 3	125/250	0,5	0,0625/0,125	0,5	1	Additif
M 4	250/125	2	0,0625/0,125	0,5	2,5	Pas d'interaction
M 5	250/125	2	0,03125/0,125	0,25	2,25	Pas d'interaction
M 6	250/125	2	0,0625/0,125	0,5	2,5	Pas d'interaction
M 7	125/125	1	0,03125/0,125	0,25	1,25	Pas d'interaction
M 8	250/125	2	0,125/0,125	1	3	Pas d'interaction
M 9	125/125	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 10	125/125	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 11	125/125	1	0,0625/0,125	0,5	1,5	Pas d'interaction
M 12	125/250	0,5	0,03125/0,125	0,25	0,75	Additif

Douze échantillons du miel mélangés avec l'HE testée contre *Pseudomonas aeruginosa* montré que sept échantillons (M 3, M 4, M 5, M 8, M 9, M 11, M 12) n'ont présenté aucune interaction sur la souche, face à quatre échantillons (M 1, M 6, M 7 et M 10) qui ont présenté une interaction synergique partielle et un échantillon (M 2) a donné une interaction additive (Tableau 23).

**Tableau 23:** Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre *Pseudomonas aeruginosa*

Miels	CMI combinée / CMI de miels seul	CFI de miel	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI d'HE	Σ CFI	Interaction
M 1	62.5/125	0.5	0.0625/0.5	0.125	0.625	Synergie partielle
M 2	62.5/125	0.5	0.25/0.5	0.5	1	Additif
M 3	125/125	1	0.125/0.5	0.25	1.25	Pas d'interaction
M 4	125/125	1	0.125/0.5	0.25	1.25	Pas d'interaction
M 5	250/250	1	0.25/0.5	0.5	1.5	Pas d'interaction
M 6	125/250	0.5	0.125/0.5	0.25	0.75	Synergie partielle
M 7	62.5/125	0.5	0.0625/0.5	0.125	0.625	Synergie partielle
M 8	250/250	1	0.125/0.5	0.25	1.25	Pas d'interaction
M 9	125/125	1	0.125/0.5	0.25	1.25	Pas d'interaction
M 10	62.5/125	0.5	0.0625/0.5	0.125	0.625	Synergie partielle
M 11	125/125	1	0.125/0.5	0.25	1.25	Pas d'interaction
M 12	250/250	1	0.125/0.5	0.25	1.25	Pas d'interaction

Pour les combinaisons testées sur *Streptococcus faecalis*, trois combinaisons (M 4, M 5 et M 6) n'ont donné aucune interaction sur la souche testée, face à six échantillons (M 2, M 3, M 7, M 9, M 10) dont la combinaison avec l'HE a donné une interaction synergique partielle et deux échantillons (M 11 et M 1) qui ont montré une interaction synergique (Tableau 24).

**Tableau 24:** Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre *Streptococcus faecalis*

Miels	CMI combinée / CMI de miels seul	CFI de miel	CMI combinée / CMI de HE seul	CFI d'HE	Σ CFI	Interaction
M 1	62,5/250	0,25	0,0625/1	0,0625	0,3125	Synergy
M 2	125/250	0,5	0,0625/1	0,0625	0,5625	Synergie partielle
M 3	125/250	0,5	0,0625/1	0,0625	0,5625	Synergie partielle
M 4	250/250	1	0,03125/1	0,03125	1,03125	Pas d'interaction
M 5	250/250	1	0,0625/1	0,0625	0,0625	Pas d'interaction
M 6	250/250	1	0,03125/1	0,03125	1,03125	Pas d'interaction
M 7	125/250	0,5	0,03125/1	0,03125	0,53125	Synergie partielle
M 8	-	-	0,0625/1	0,0625	-	-
M 9	125/250	0,5	0,0625/1	0,0625	0,5625	Synergie partielle
M 10	125/250	0,5	0,0625/1	0,0625	0,5625	Synergie partielle
M 11	31,25/250	0,125	0,03125/1	0,03125	0,15625	Synergie
M 12	125/250	0,5	0,03125/1	0,03125	0,53125	Synergie partielle

Pour les 12 échantillons du miel testés contre *Staphylococcus aureus*, sept échantillons (M 1, M 3, M 4, M 6, M 8, M 9 et M 11) combinés avec l'HE n'ont donné aucune interaction, face à quatre échantillons (M 2, M 7, M 10 et M 12) qui ont montré une interaction synergique partielle (Tableau 25).

**Tableau 25:** Résultats de la combinaison d'HE de l'origan et de miels contre *staphylococcus aureus*

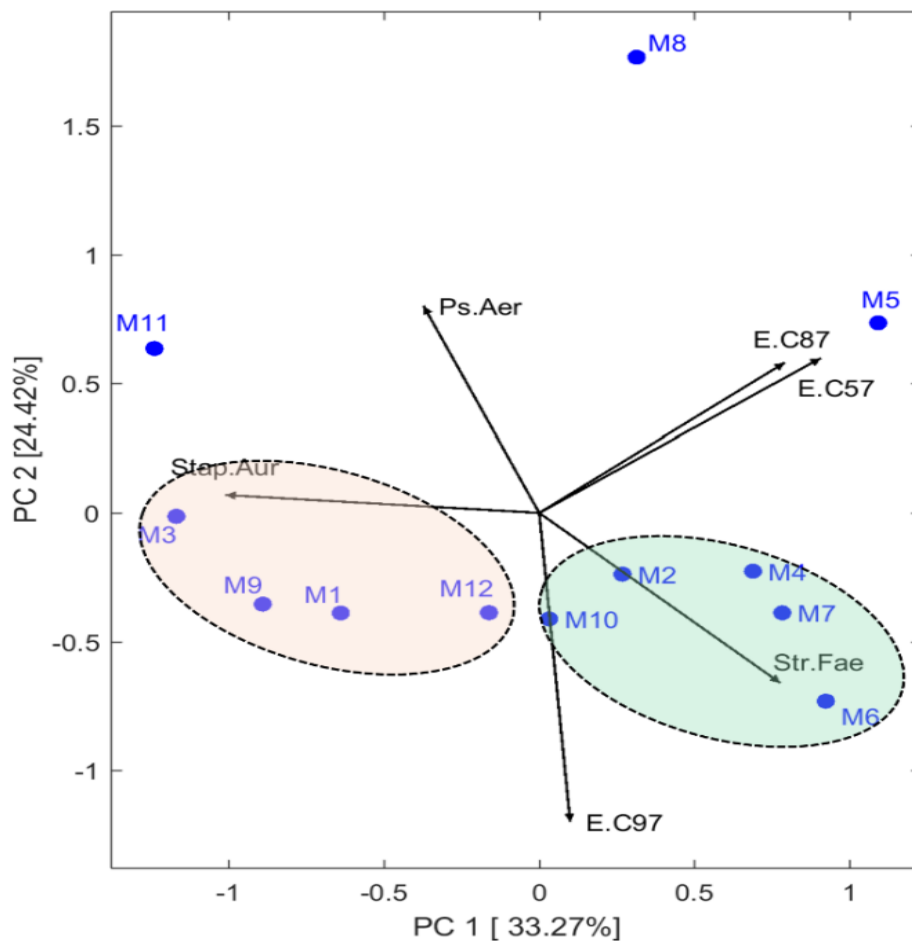
Miels	CMI combinée/ CMI de miels seul	CFI de miel	CMI combinée/ CMI de HE seul	CFI d'HE	Σ CFI	Interaction
M 1	125/125	1	0,125/1	0,125	1,125	Pas d'interaction
M 2	31,25/62,5	0,5	0,125/1	0,125	0,625	Synergie partielle
M 3	125/62,5	2	0,0625/1	0,0625	2,0625	Pas d'interaction
M 4	125/125	1	0,0625/1	0,0625	1,0625	Pas d'interaction
M 5	-	-	0,031/1	0,031	-	-
M 6	125/125	1	0,125/1	0,125	1,125	Pas d'interaction
M 7	31,25/62,5	0,5	0,031/1	0,031	0,531	Synergie partielle
M 8	250/250	1	0,125/1	0,125	1,125	Pas d'interaction
M 9	125/62,5	2	0,125/1	0,125	2,125	Pas d'interaction
M 10	31,25/62,5	0,5	0,0625/1	0,0625	0,5625	Synergie partielle
M 11	125/62,5	2	0,0625/1	0,0625	2,0625	Pas d'interaction
M 12	125/250	0,5	0,0625/1	0,0625	0,5625	Synergie partielle

D'après les résultats obtenus dans les tableaux (20-25), les douze échantillons de miel testés contre six souches en combinaison avec l'huile essentielle: De 72 combinaisons, trois (4,16%) une synergie totale, 27 (37,5%) une interaction synergique et additive partielle, 38 (52,77%) n'avaient aucune interaction et quatre (4,44%) n'avaient aucun effet sur les souches bactériennes. Le meilleur effet synergique a été obtenu avec la combinaison d'huile essentielle et d'échantillon de miel M 11; cet effet a été observé sur deux bactéries (*Escherichia coli* (ATB: 97) et *Streptococcus faecalis*) avec des valeurs CFI de 0,312 et 0,156 respectivement, et la combinaison d'huile essentielle et de miel M 1 sur *Streptococcus faecalis* avec CFI était de 0,31.

La combinaison du miel avec de l'huile essentielle réduit les CMI de l'HE de 1-4 fois pour les bactéries Gram-positives et 1-8 fois pour les Gram-négatives. Le synergisme le plus faible a été obtenu avec le miel et l'huile essentielle contre *Escherichia coli* (ATB: 57) avec CFI allant de 0,75 à 2,25. En fait, Il y a peu de travaux publiés sur l'effet de la combinaison entre des HEs et des miels; dans toutes ces études, il est constaté qu'il existe des interactions positives en utilisant la méthode isobogrammes (est un graphique en deux dimensions avec sur chaque axe la concentration d'un composé), mais ceux-ci peuvent être considérés comme des additifs selon l'indice de concentration fractionnaire inhibitrice (CFI) [331]. Cette interaction synergique semble être due à différents mécanismes incluant l'inhibition des enzymes protecteurs et l'inhibition séquentielle des voies biochimiques communes [332].

### 3.4. Corrélations et analyse multi variée

L'utilisation des valeurs CFI résultantes après avoir combiné les échantillons de miel et l'HE pour exécuter la ACP a montré un effet réduit de la composante géographique (figure 54). Chacun des deux groupes principaux était un mélange d'échantillons appartenant aux deux origines géographiques et était discriminé par la première composante principale, qui conservait 33,27% des données utilisées. Le premier groupe (la zone ombrée orange) a été formé par les échantillons de miel M1 et M3 de la Palestine et les échantillons M9 et M12 du Maroc. Le second groupe se trouvait dans la partie droite du graphique, corrélant les valeurs CFI de *Streptococcus faecalis*.



**Figure 54:** ACP des échantillons de miel analysés en utilisant le CFI résultant de la combinaison de miels avec de l'HE comme intrant. E. C87: *Escherichia coli* BLSE (ATB: 87) BGN; E. C57: *Escherichia coli* (ATB: 57) B6N; E. C97: *Escherichia coli* (ATB: 97) BGM; Stap.Aur: *Staphylococcus aureus*; Ps. Aes: *Pseudomonas aeruginosa*; Str. Fae: *Streptococcus faecalis*.



Compte tenu de l'étude de l'effet des paramètres physicochimiques des échantillons de miel sur l'activité finale, une étude de corrélation entre les paramètres évalués et le CFI de la combinaison de chaque échantillon de miel a été réalisée (tableau 26). La teneur en mélanoidines s'est avérée influencer positivement l'activité antibactérienne obtenue après l'association avec l'HE, et ses valeurs présentaient une corrélation négative avec les valeurs CFI contre *Escherichia coli* (ATB: 57) et *Streptococcus faecalis* ( $p < 0,05$ ). Le CFI résultant contre les mêmes souches bactériennes a été influencé positivement par le contenu phénolique, mais une corrélation négative significative n'a été observée que dans le cas d'*Escherichia coli* (ATB: 57). Des corrélations négatives ont également été observées entre le CFI contre *Escherichia coli* (ATB: 57) d'un côté et la conductivité électrique ( $p < 0,05$ ) et la teneur en minéraux ( $p < 0,01$ ) de l'autre côté (tableau 26). L'acidité libre a eu un effet positif significatif ( $p < 0,05$ ) sur le CFI acquis contre *Escherichia coli* (ATB:57).

**Tableau 26:** Coefficients de Pearson corrélation entre les paramètres physico-chimiques du miel et le CFI des combinaisons les miels et l'HE

	CFI <i>E. coli</i> (ATB:87) BGN	CFI <i>E. coli</i> (ATB:57)	CFI <i>E. coli</i> (ATB:97)	CFI <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	CFI <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	CFI <i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>
Acidité libre	-	-0,641*	-	-	-	-
Phénols	-	-0,593*	-	-	-	-
Mélanoidines	-	-0,584*	-	-	-	-0,607*
Teneur en minéraux	-	-0,711**	-	-	-	-

\*  $P < 0,05$ . \*\*  $P < 0,01$ .

Les corrélations rapportées peuvent indiquer une voie spécifique de l'effet du miel sur les souches bactériennes. Des études antérieures ont montré l'importance des teneurs en mélanoidines et en composés phénoliques sur l'activité antimicrobienne du miel [97, 333, 334].

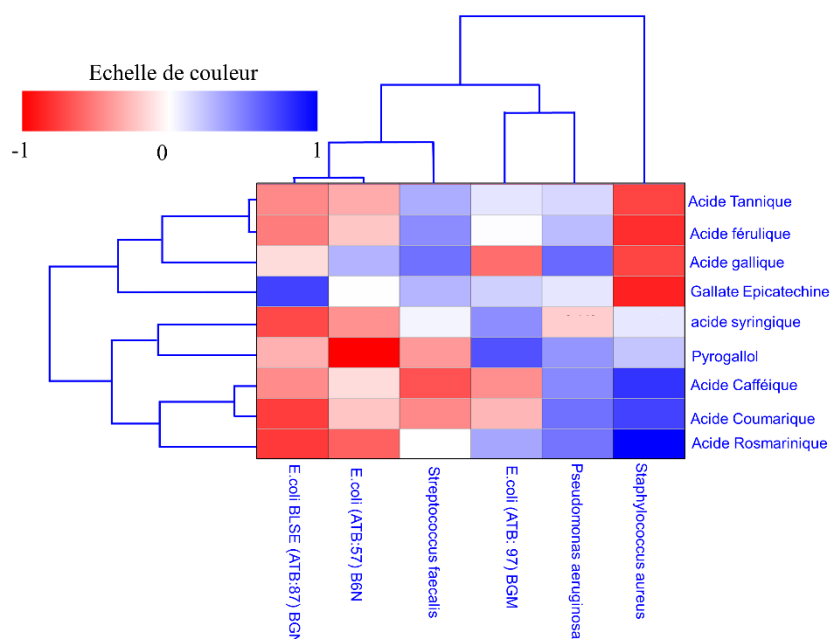
Pour étudier l'effet de l'activité initiale contre une souche bactérienne sur le comportement acquis après la combinaison avec l'HE, une étude de corrélation a été réalisée et les résultats sont illustrés dans le tableau 27. En général, aucune influence significative n'a été enregistrée. *Escherichia coli* (ATB: 97) semble avoir une influence significative sur l'activité résultante après la combinaison avec l'HE. Une corrélation négative significative ( $p < 0,05$ ) a été obtenue entre les CMI des échantillons de miel contre *Escherichia coli* (ATB: 97) et le CFI de la combinaison contre la même souche bactérienne.

**Tableau 27:** Coefficients de corrélation de Pearson entre la CMI des échantillons de miel et le FIC des combinaisons de miel et d'HE

	CFI <i>E. coli</i> (ATB:87)	CFI <i>E. coli</i> (ATB:57)	CFI <i>E. coli</i> (ATB:97)	CFI <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	CFI <i>S. aureus</i>	CFI <i>S. faecalis</i>
CMIs sur <i>E. coli</i> (ATB:87)	0,0242					
CMIs sur <i>E. coli</i> (ATB:57)		-0,6564*				
CMIs sur <i>E. coli</i> (ATB:97)			0,04684			
CMIs sur <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>				0,3197		
CMIs sur <i>S. aureus</i>					0,5543	
CMIs sur <i>S. faecalis</i>						-0,02040

\* La corrélation est significative au niveau  $P < 0,05$ .

L'intégration des valeurs  $r$  de la corrélation entre le facteur CFI et les composés phénoliques d'un côté et la capacité du regroupement du dendrogramme d'un autre côté est explorée dans une tentative d'investiguer l'existence d'une possible relation entre les composés phénoliques et la synergie entre le miel et l'huile essentielle. Les résultats sont illustrés par la figure 55.



**Figure 55:** Intégration des valeurs  $r$  de la corrélation entre les CFI et les composés phénoliques illustrée en échelle de couleur d'un côté, et la capacité de regroupement du dendrogramme

En termes de similarité entre les espèces bactériennes, trois comportements peuvent être observés vis à vis à de la sensibilité envers les Aromiels utilisés. *Staphylococcus Aureus* montre un comportement unique, et d'après la figure 45, il s'est avéré que plus un miel est

riche en acides tannique, férulique, gallique et épicatechine galate, plus il a tendance à établir une synergie avec l'huile essentielle utilisée.

Le comportement inverse existe lorsque le miel est riche en acides caféique, coumarique, et rosmarinique, et avec un faible taux dans le cas du pyrogallol et d'acide syringique où une corrélation positive peut être observée avec les valeurs CFI. Un comportement totalement opposé peut être observé dans le cas *Streptococcus Faecallis*.

Dans le cas d'*Escherichia coli* (ATB : 97) BGM et *Pseudomonas aeruginosa*, une corrélation positive a été obtenue avec la majorité des composés phénoliques identifiés dans le présent travail suggérant la faible contribution de la composante phénolique dans la synergie des Aromiels. Pourtant des exceptions sont: l'acide syringique dans le cas *Pseudomonas aeruginosa* et des acides gallique, caféique et coumarique dans le cas *Escherichia coli* (ATB : 97) BGM. Ces derniers cas ont présenté une contribution positive à la possible synergie. Par contre les deux souches restantes d'*Escherichia coli* ont montré une synergie augmentant avec la richesse en composés phénoliques. Epicatechine gallate fait l'exception dans le cas d'*Escherichia coli* BLSE (ATB : 87) BGN et l'acide gallique dans le cas d'*Escherichia coli* (ATB : 57) B6N.

Ignorant les exceptions qui peuvent être observées, les composés phénoliques identifiés peuvent être divisé en deux groupes considérant leurs effets opposés envers la synergie entre les miels et l'huile essentielle. Un premier groupe est constitué par les acides tannique, férulique, gallique et épicatechine galate, alors que le deuxième est constitué des acides caféique, coumarique, rosmarinique, syringique et le pyrogallol.

## **Chapitre IV**

### **Effets protecteur du miel, de l'huile essentielle et leur mélange (Aromiel) sur la toxicité de tétrachlorure de carbone chez le rat**

**Article 4:** Hamada Imtara, Noori Al-Waili, Abderrazak Aboulghazi, Abdelfattah Abdellaouli, Thia Al-Waili, Badiaa Lyoussi. Chemical composition and antioxidant content of *Thymus vulgaris* honey and *Origanum vulgare* essential oil; their effect on CCL4 -induced toxicity. (Soumis)

## 1. Introduction

On considère le foie parmi les organes les plus importants dans notre organisme, il joue un rôle primordial dans le métabolisme, la transformation, le transport et la clairance des xénobiotiques, également il a un rôle majeur dans la purification du sang en transformant des produits chimiques potentiellement dangereux en produits inoffensifs, plusieurs facteurs peuvent causer des lésions hépatiques, cependant les mécanismes physiopathologiques de l'hépatotoxicité induite par les xénobiotiques ne sont pas encore complètement élucidés mais sont généralement associés à la conversion métabolique des xénobiotiques en espèces réactives de l'oxygène (ROS), capables d'induire l'oxydation de la membrane biologique des phospholipides et des protéines, entraînant des modifications de la fonction cellulaire et de la mort cellulaire [335–337].

Les produits naturels riches en composés antioxydants, plus précisément les produits apicoles et les huiles essentielles qui sont connus dans le monde entier par leur efficacité et leur innocuité [338]. Parmi les produits les plus riches en antioxydants, on trouve le miel qui a été considéré comme un aliment et un médicament pour le traitement de nombreuses maladies dans presque toutes les cultures et les traditions depuis l'Antiquité [4]. La valeur du miel due principalement aux nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques qu'il contient, notamment anti-inflammatoire et hépatoprotecteur. Ces derniers sont dus à la présence de nombreux composants chimiques à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins et les composés phénoliques connus pour leur capacité à capturer les radicaux libres et donc la réduction du taux de ROS [339].

L'*Origanum vulgare* est considéré comme l'une des espèces les plus populaires d'*Origanum*, Les herbes de cette famille connus par leurs vertus thérapeutiques variées, en l'occurrence pour leurs efficacités biologiques et hépatoprotectrice, en tant qu'antioxydants puissants, ce qui leur confère des potentialités contre les dommages causés par le stress oxydatif [340].

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'effet protecteur de l'Aromiel contre la néphro et hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone chez le rat wistar dans le but de l'exploration d'une éventuelle synergie du miel et de l'huile essentielle vis-à-vis de cette intoxication.

## **2. Matériel et méthodes**

Les résultats précédents (chapitre I+II) révèlent que les différents échantillons des miels analysés et d'HE de l'*Origanum vulgare* riches en composés phénoliques répondent aux normes internationales. Les résultats ont montré que le miel du thym possède l'activité antioxydante la plus importante, par ailleurs, il s'est avéré que l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* possède une activité antioxydante considérable. Pour cette raison, ces échantillons (miel du thym + HE d l'*Origanum vulgare*) feront l'objet de l'étude synergique contre l'hépto-néphrotoxicité causée par le CCl<sub>4</sub> chez le rat.

### **2.1. Animaux d'expérience**

L'expérience a été réalisée sur 45 rats Wistar mâles adultes d'un poids corporel de 221 ± 22 g. Les animaux ont été maintenus dans une pièce à lumière diffuse et à température contrôlée avec un cycle de lumière diurne de 12 h, où la température (25 ± 1 ° C) et l'humidité relative (55 ± 5%) ont été maintenues constantes. Les animaux ont eu accès gratuitement au régime alimentaire standard et à l'eau avant les expériences. Toutes les procédures expérimentales réalisées sur des animaux de laboratoire (Rats Wistar) dans cette étude étaient en accord avec les directives standard internationalement reconnues pour l'utilisation des animaux et le protocole a été approuvé par notre comité institutionnel de soin des animaux selon les spécifications techniques Françaises. Soins et utilisation des animaux de laboratoire.

### **2.2. Induction de l'hépto- néphrotoxicité par la CCl<sub>4</sub>**

Pour reproduire le modèle de hépto- néphrotoxicité, nous avons utilisé la CCl<sub>4</sub> dissoute dans une huile d'olive et administrée par injection intraperitoniale avec une dose de 1 ml/kg [341], deux fois par semaine pendant deux semaine.

### **2.3. Traitement des animaux**

Pour évaluer l'effet protecteur contre CCl<sub>4</sub> sur les rats durant 14 jours, neuf groupes de rats ont constitués de 5 rats chacun et chaque groupe correspond à un traitement particulier (tableau 28):

**Tableau 28:** Groupes de rats traités (n=45)

Groupe	Traitement	Dose
<b>Groupes témoins</b>		
<b>Groupe I (n=5)</b>	Eau distillée (Témoin)	10 ml/kg
<b>Groupe II (n=5)</b>	Tween 80 (2%)	10 ml/kg
<b>Groupe III (n=5)</b>	CCl <sub>4</sub>	1 ml/kg
<b>Groupes en préventives</b>		
<b>Groupe IV (n=5)</b>	Miel	1 g/kg
<b>Groupe V (n=5)</b>	HE	50 mg/kg
<b>Groupe VI (n=5)</b>	Aromiel	0.5g du miel et 25mg de l'HE/kg
<b>Groupes en curatives</b>		
<b>Groupe VII (n=5)</b>	Miel + CCl <sub>4</sub>	Miel (1 g/kg) CCl <sub>4</sub> (1 ml/kg)
<b>Groupe VIII (n=5)</b>	HE + CCl <sub>4</sub>	HE (50 mg/kg) CCl <sub>4</sub> (1 ml/kg)
<b>Groupe IX (n=5)</b>	Aromiel + CCl <sub>4</sub>	Aromiel (0.5g du miel et 25mg de l'HE/kg) CCl <sub>4</sub> (1 ml/kg)

A la fin de la période de traitement, les animaux ont été sacrifiés. Des échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes héparinés puis centrifugés à 4000 RPM (Rotation par minute) pendant 10 minutes. Le plasma obtenu de chaque échantillon a été décanté et conservé en aliquotes à -20 °C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques envisagés.

#### 2.4. Analyses biochimiques

- Les paramètres évaluant la fonction hépatique explorés par cette étude sont les transaminases (Aspartate Amino Transférase = ASAT et Alanine Amino Transférase= ALAT) et la Phosphatase alcaline (PAL).
- Profil lipidique: Cholestérol total-TC, triglycéride-TG, lipoprotéines de basse densité-LDL, lipoprotéines de très basse densité-VLDL et lipoprotéines de haute densité-HDL.
- Bilirubine et protéines (bilirubine totale, bilirubine directe et protéines totales).
- Paramètres d'exploration de la fonction rénale: créatinine, urée.

- Électrolytes: Sodium, potassium, calcium.

La détermination des valeurs des paramètres étudiés a été réalisée avec un analyseur automatisé (Architect c8000) [349].

## 2.5. Analyses statistiques

L'interprétation statistique des résultats a été effectuée avec le test One-Way ANOVA et le test post-hoc de Tukey. Les résultats ont été donnés en moyenne  $\pm$  écart type. La valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

## 3. Résultats et discussion

Jusqu'à aujourd'hui, les maladies du foie étaient l'une des maladies les plus répandues dans le monde, avec des millions de personnes mourant de cette maladie. De nombreuses causes entraînent des dommages au foie tels que le virus de l'immunodéficience humaine, l'hépatite C et l'hépatite B, ainsi que des infections bactériennes, des agents chimiques, des antibiotiques et des pesticides [342, 343]. Peu de médicaments sont utilisés pour traiter les maladies du foie constituées de sources naturelles. L'efficacité de ces médicaments dépend principalement de leur capacité à maintenir une fonction physiologique normale ou à réduire les effets nocifs liés aux facteurs hépatiques. Ainsi, de nombreuses personnes ont recours à la médecine traditionnelle dans le traitement des maladies du foie [336, 344]. De nombreuses études et chercheurs ont montré l'importance des plantes médicinales et des produits apicoles dans le traitement des maladies du foie et des reins. Cette importance est attribuée à leur présence sur les composés phénoliques qui ont une grande capacité de récupération des ROS [344]. Dans cette partie de notre étude, nous avons testé le miel du *Thymus vulgaris*, l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et la formulation de l'Aromiel dans le traitement des lésions hépatiques et rénales induites par le  $\text{CCl}_4$  chez le rat.

Les marqueurs hépatiques et rénaux sont des molécules biochimiques qui peuvent détectés à une concentration anormale dans le sang ou d'autres fluides corporels et indique leur perturbations. Ils sont des protéines ou des glycoprotéines, plus rarement des enzymes.

### 3.1. Profil enzymatique: Les transaminases

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Elles permettent, lors des réactions énergétiques, le transfert d'une fraction d'un

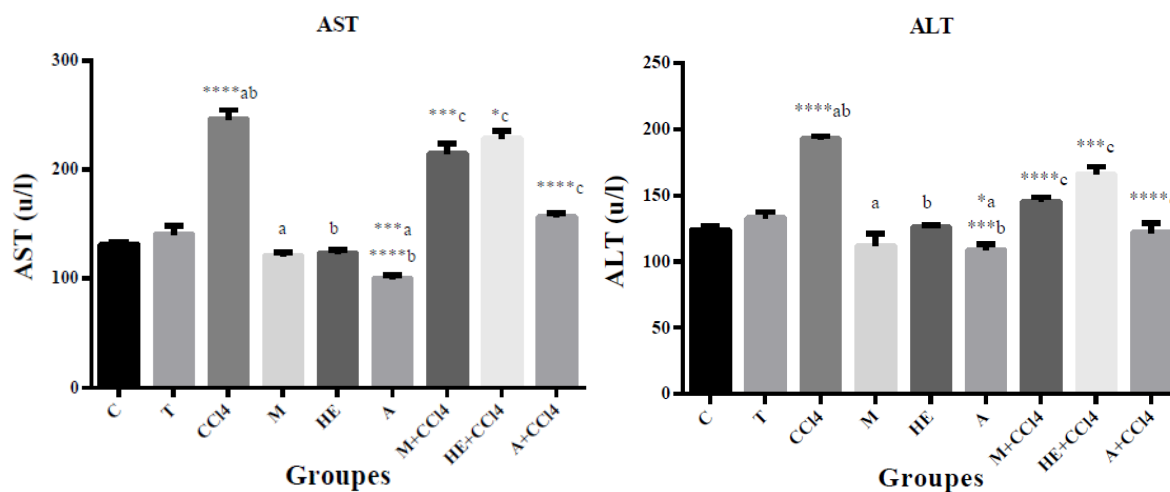


acide aminé à un autre. L'augmentation de leur taux dans le sang témoigne d'une lésion cellulaire, le plus souvent dans le foie, parfois dans le cœur, les muscles ou les reins [345]. Au niveau hépatique, elle indique des hépatites virales, infectieuses ou toxiques, une cirrhose ou un alcoolisme [346]. Dans notre étude une observation visuelle a montré que l'administration du  $\text{CCl}_4$  entraînait des changements histologiques significatifs indiquant des lésions hépatiques telles que: nécrose, fibrose, stéatose et dégénérescence mousseuse des hépatocytes et cirrhose du foie.

L'alanine aminotransférase (ALT) est un marqueur sensible et spécifique d'une atteinte hépatocellulaire. Une élévation des ALT provoque une maladie hépatique (lyse des hépatocytes), sauf en cas de destruction de cellules musculaires, ou de myopathie systémique [345]. Dans les groupes d'études, il a été observé que les animaux atteints de toxicité induite par  $\text{CCl}_4$  présentaient une augmentation très hautement significative ( $p < 0.0001$ ) des niveaux des ALT en comparaison au groupe contrôle (figure 56); l'augmentation de cette enzyme d'hépatocytolyse reflétait précisément des lésions hépatiques causées par  $\text{CCl}_4$ , tout en étant en accord avec diverses études précédentes [335, 336, 341, 344]. En revanche, l'administration de miel et d'huile essentielle séparément aux animaux atteints de toxicité induite par  $\text{CCl}_4$  entraînaient une diminution significative ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.001$  respectivement) des valeurs des enzymes hépatiques par rapport au groupe  $\text{CCl}_4$  n'ayant reçu qu'un aliment standard, révélant, ainsi l'effet hépatoprotecteur de ces produits. En outre, l'administration de la formulation d'Aromiel à un dernier groupe dont l'hépatotoxicité a été aussi induite par  $\text{CCl}_4$  a causé une hépatoprotection plus importante que celle de l'huile essentielle, mais d'une significativité égale à celle observée dans le cas du miel. Pourtant la valeur de la moyenne des ALT du groupe traité par l'Aromiel était plus similaire à celle du groupe contrôle que les deux autres produits utilisés séparément.

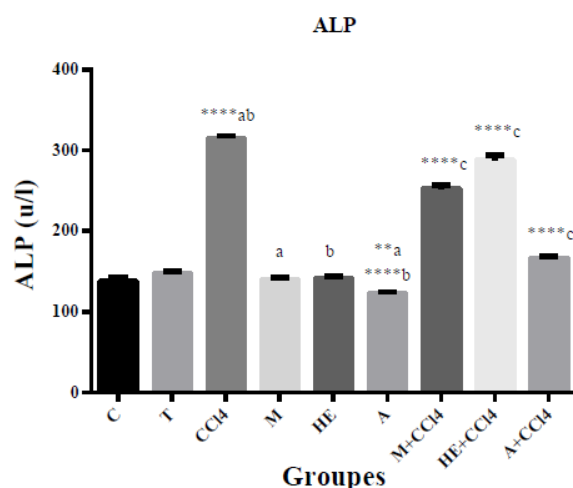
L'Aspartate aminotransférase (AST) est localisée au niveau tissulaire dans une grande variété de tissus surtout les muscles, tissu cardiaque et le foie et en faible quantité dans les reins, le cerveau, pancréas, rate, poumon...etc [347]. Concernant les résultats de l'AST, un comportement similaire à celui des ALT a été observé avec des différences dans les niveaux de significativité des différences entre les groupes étudiés. En comparaison au groupe contrôle, le group  $\text{CCl}_4$  non traité a démontré une augmentation très significative ( $p < 0.0001$ ). Au contraire de ALT, le groupe traité par l'Aromiel a montré une hépatoprotection ( $p < 0.0001$ ) plus importante que celles de miel et de l'huile essentielle utilisé séparément avec

$p < 0.001$ ,  $p < 0.05$  respectivement, en comparaison au groupe hépatotoxique non traité (figure 56).



**Figure 56:** Taux plasmatique en AST et ALT (marqueur hépatique) chez les différents groupes de rats traités. Les valeurs sont présentées en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . <sup>a</sup> par rapport au contrôle ; <sup>b</sup> par rapport au groupe tween; <sup>c</sup> par rapport au groupe CCl<sub>4</sub>.

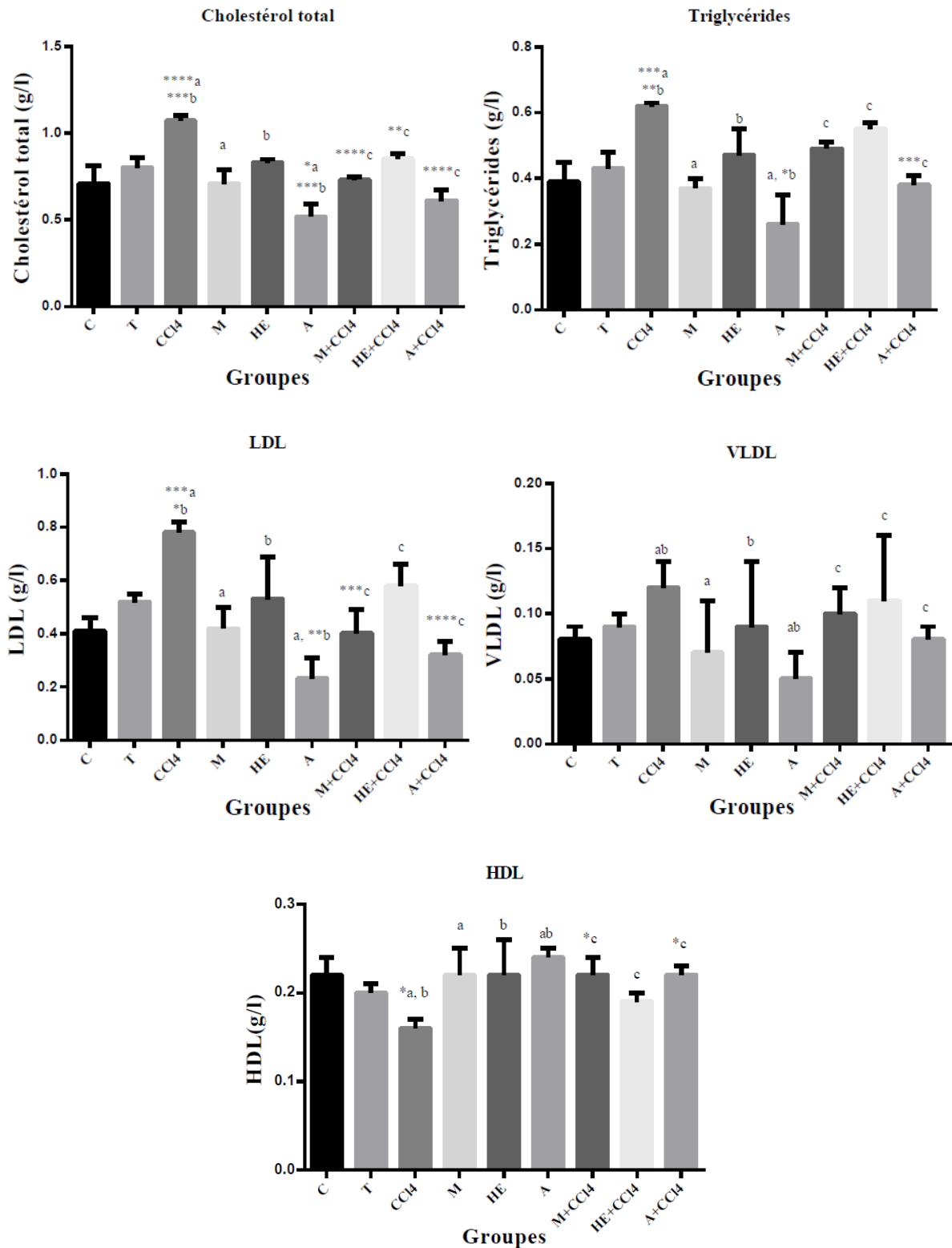
La phosphatase alcaline (ALP) est localisée au niveau tissulaire dans tous les tissus humains surtout dans la bile, les os et le foie en sont particulièrement riches mais aussi dans l'intestin, le placenta, les testicules, les ovaires, les reins, les poumons, les globules rouges et les leucocytes. Au niveau cellulaire, ces enzymes sont localisées dans les membranes cytoplasmiques. La mesure de son activité dans le sérum est faible en particulier pour le diagnostic et la surveillance des maladies hépatobiliaires (cirrhose, hépatite ou cancer) et maladies osseuses [348]. En termes de significativité, dans le cas des ALP, les trois groupes ayant reçu un traitement après l'injection de CCl<sub>4</sub> ont montré le même niveau d'hépatoprotection ( $p < 0.0001$ ) en comparaison au groupe hépatotoxique non traité (figure 57). Pourtant la valeur de la moyenne des ALP du groupe traité par l'Aromiel était plus similaire à celle du groupe contrôle que les deux autres produits utilisés séparément. Les résultats de notre étude sont en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études expérimentales utilisant le miel de différentes origines botaniques et l'extrait d'*Origanum vulgare*. Ces effets proviennent principalement des polyphénols et des flavonoïdes que ces produits contiennent [44, 335, 344, 344, 349]. Parmi les trois enzymes, l'enzyme ALT est plus spécifique au foie et constitue donc le meilleur paramètre pour détecter les lésions hépatiques [350]. Le groupe traité avec Aromiel a un résultat proche du groupe non traité sur l'enzyme ALT; nous amenant à la conclusion que l'Aromiel a une valeur thérapeutique importante au niveau hépatique.



**Figure 57:** Taux plasmatique en ALP (marker hépatique) chez les différents groupes de rats traités. Les valeurs sont présentées en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . <sup>a</sup> par rapport au contrôle ; <sup>b</sup> par rapport au groupe tween; <sup>c</sup> par rapport au groupe CCl<sub>4</sub>.

### 3.2. Profil lipidique

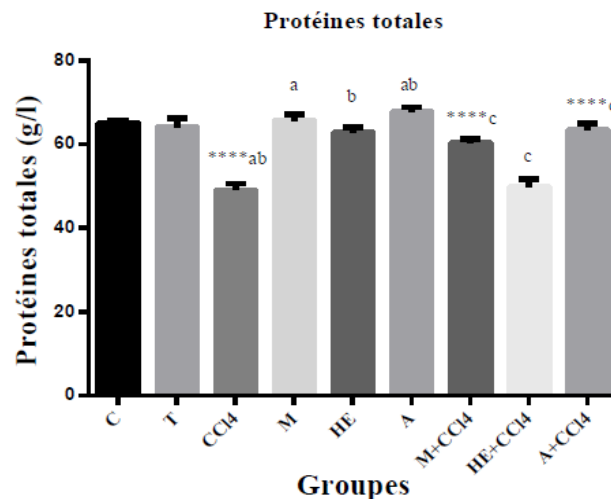
De nombreuses études ont également montré que le mécanisme le plus important des lésions hépatiques causées par CCl<sub>4</sub> était dû à la peroxydation lipidique, elle-même due à la génération des ROS [44]. Les résultats illustrés dans la figure 58 montrent que l'administration de CCl<sub>4</sub> à des rats augmente significativement les taux de triglycérides ( $p < 0,001$ ), de cholestérol ( $p < 0,0001$ ) et de LDL ( $p < 0,001$ ) et diminue celle de HDL ( $p < 0,05$ ) par rapport au groupe témoin. L'augmentation du profil lipidique implique une peroxydation lipidique sévère et des lésions physiologiques dans des organes après administration de CCl<sub>4</sub> [351]. Concernant les groupes traités avec l'Aromiel, une diminution significative des triglycérides ( $p < 0,001$ ), de cholestérol ( $p < 0,0001$ ) et de LDL ( $p < 0,0001$ ), tandis qu'une augmentation significative a été observé dans le cas de l'HDL ( $p < 0,05$ ). L'Aromiel a pu, donc, préserver l'intégrité cellulaire. Une telle activité peut être la conséquence de l'activité de piégeage des radicaux libres du miel et de l'huile essentielle illustrée précédemment. La valeur supérieure de l'HDL a été observée dans le cas du groupe ayant reçu Aromiel sans CCl<sub>4</sub>.



**Figure 58:** Taux plasmatique en cholestérol, triglycéride, LDL, VLDL et HDL chez les différents groupes de rats traités. Les valeurs sont présentées en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . <sup>a</sup> par rapport au contrôle ; <sup>b</sup> par rapport au groupe tween; <sup>c</sup> par rapport au groupe CCl<sub>4</sub>.

### 3.3. Profil protéique

Un autre paramètre utilisé pour estimer la gravité des lésions de la cellule hépatique et rénal est la réduction de protéines totales (PT) [44]. Les résultats de la figure 59 ont montré une réduction significative ( $p < 0.0001$ ) des protéines sériques totaux chez les rats traités au  $\text{CCl}_4$ , confirmant ainsi la gravité de l'hépto-néphropathie. Par rapport au groupe n'ayant reçu que  $\text{CCl}_4$ , l'administration de miel a augmenté de manière significative ( $p < 0,001$ ) le profil de protéines totales, alors que l'augmentation dans le cas de l'huile essentielle n'était pas significative. L'administration des deux produits combinés donne un effet amplifié, et le taux de protéines totales a augmenté significativement ( $p < 0,001$ ) dans les groupes traités par Aromiel. Ainsi, cela suggère que l'Aromiel a la capacité de favoriser la synthèse des protéines, ce qui conduit à une concentration élevée de protéines au niveau du foie et des reins [44].

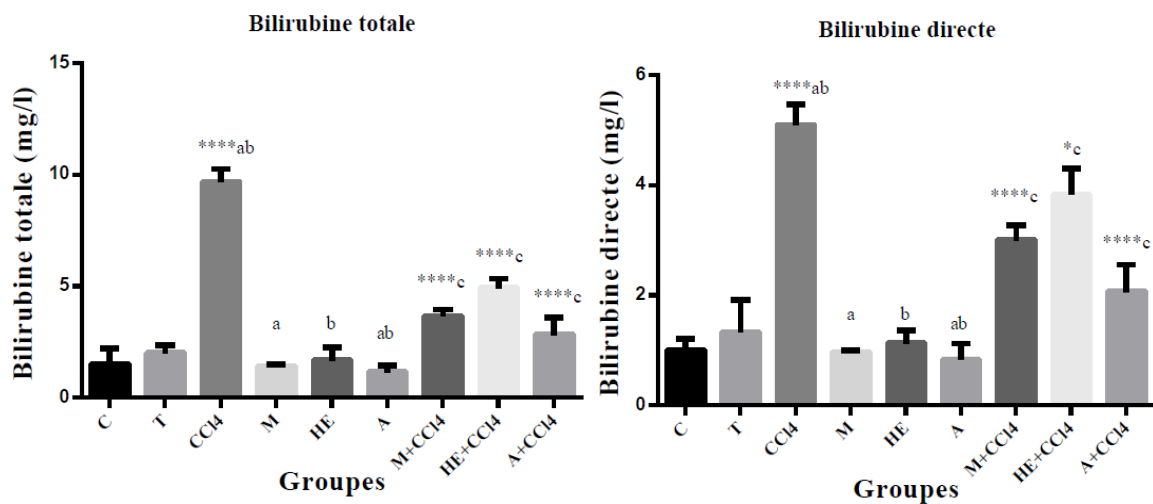


**Figure 59:** Taux plasmatique en protéines totales chez les différents groupes de rats traités. Les valeurs sont présentées en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .<sup>a</sup> par rapport au contrôle ; <sup>b</sup> par rapport au groupe tween; <sup>c</sup> par rapport au groupe  $\text{CCl}_4$ .

### 3.4. Les Bilirubines

La bilirubine est un pigment jaune provenant de la dégradation de l'hémoglobine, et dont l'accumulation anormale dans le sang et les tissus détermine un ictère (ou jaunisse). L'augmentation de la synthèse de la bilirubine ou son métabolisme hépatique défectueux (en raison d'une absorption, d'une conjugaison et d'une excrétion défectueuses dans la bile) détermine l'hyperbilirubinémie [352, 353], qui est fréquente dans les lésions hépatiques. Cela s'est bien révélé dans notre étude pour le groupe traité avec  $\text{CCl}_4$ . Les résultats concernant les

taux de bilirubine totale et de bilirubine directe suivent la même cinétique; des diminutions significatives ( $p < 0.0001$ ) dans les niveaux de ces deux paramètres sont potentialisées par l'administration de la formulation d'Aromiel (figure 60). Le miel seul a montré un niveau similaire de significativité ( $p < 0.0001$ ). Pourtant les valeurs des moyennes des deux paramètres du groupe traité par l'Aromiel ont été plus similaires aux moyennes du groupe contrôle. Les groupes de rats qui ont reçu le miel, l'huile essentielle et l'Aromiel sans une administration préalable de  $\text{CCl}_4$ , n'ont montré aucune différence en comparaison au groupe contrôle. La bilirubine est une substance hydrophobe et potentiellement toxique qui circule dans le plasma lié à l'albumine. Elle ne peut donc pas être filtrée ou éliminée dans les reins, mais pour son élimination; il devait être transformée en un conjugué soluble dans l'eau et dans la bile [44]. Ceci plaide en faveur de l'implication de l'Aromiel dans ce mécanisme de transformation.



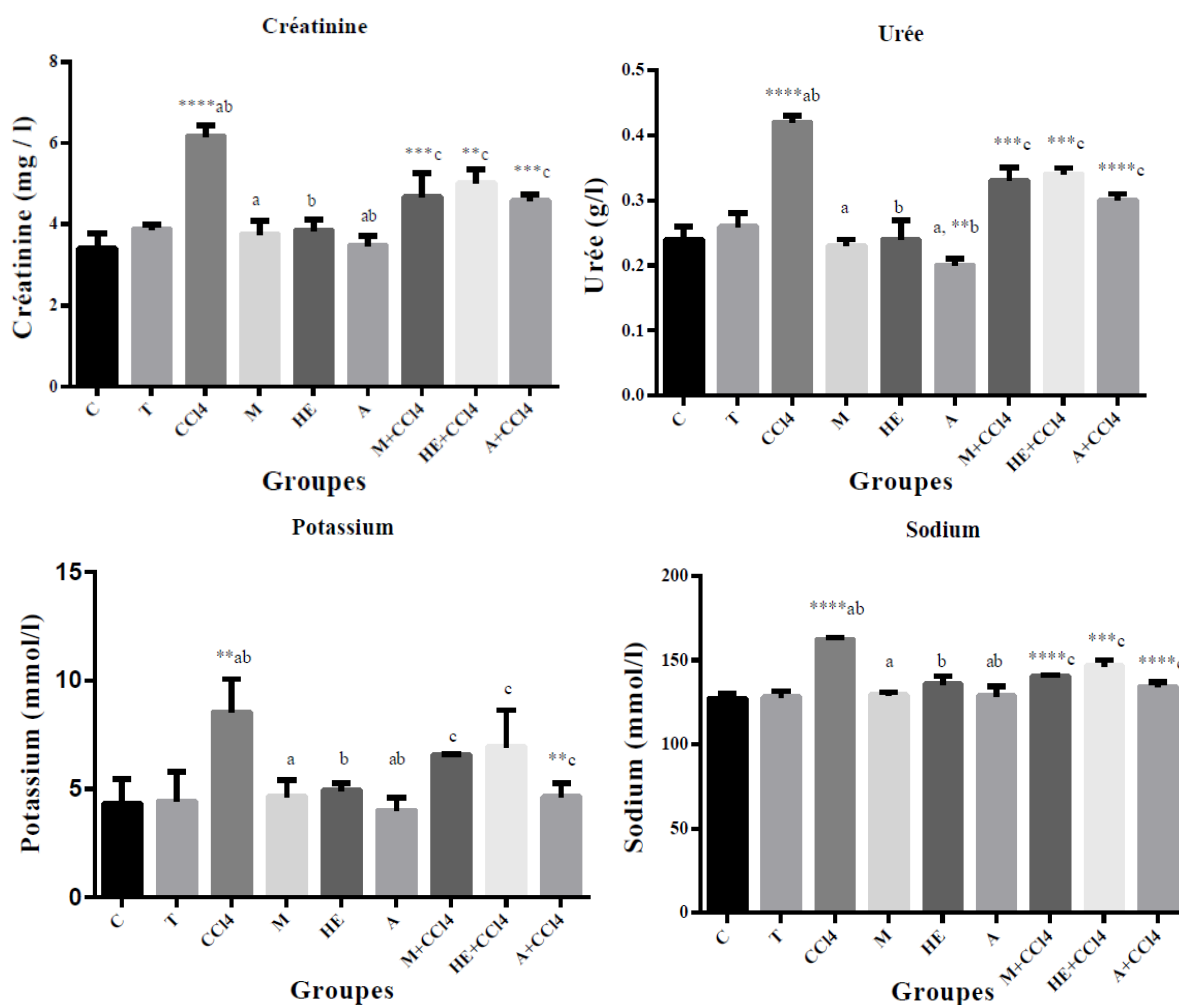
**Figure 60:** Taux plasmatique en bilirubine totale et bilirubine directe chez les différents groupes de rats traités. Les valeurs sont présentées en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . <sup>a</sup> par rapport au contrôle ; <sup>b</sup> par rapport au groupe tween; <sup>c</sup> par rapport au groupe  $\text{CCl}_4$ .

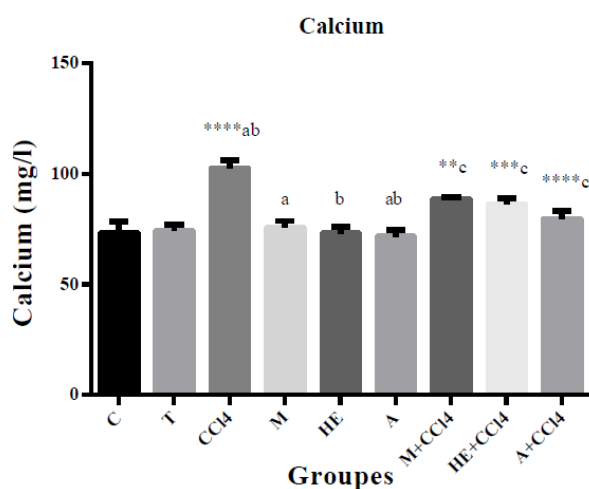
### 3.5. Profil rénal

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'administration de  $\text{CCl}_4$  chez le rat entraîne une altération remarquable de la fonction rénale associée à un stress oxydatif important au niveau des cellules épithéliales rénales, entraînant une augmentation des enzymes rénales dans le sérum [354]. De plus, le mécanisme de toxicité rénale par  $\text{CCl}_4$  est presque le même que celui du foie, avec une forte affinité pour le cortex rénal qui contient

principalement le cytochrome P-450 [355]. L'augmentation du taux sérique de la créatinine, de l'urée et la détermination des électrolytiques s'observe le plus souvent avec une réduction de la fonction rénale [349, 354].

Dans notre étude, l'injection de  $\text{CCl}_4$  a significativement augmenté la créatinine ( $p < 0.0001$ ), l'urée ( $p < 0.0001$ ), le potassium ( $p < 0.01$ ), le sodium ( $p < 0.0001$ ) et le calcium ( $p < 0.0001$ ) au niveau plasmatique. L'administration de rats avec le miel, l'HE d'*Origanum vulgare* et de leur mélange a significativement diminué les taux des paramètres étudiés. Les valeurs les plus importantes ont été observées lors de l'administration de l'Aromiel avec des taux de significativité de  $p < 0.001$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.0001$  et  $p < 0.0001$  dans le cas de créatinine, urée, potassium, sodium et calcium, respectivement en les comparant au groupe néphrotoxique non traité (Figure 61). Ceci indique que la formulation Aromiel protège éventuellement le tissu rénal contre les dommages oxydatifs induits par  $\text{CCl}_4$  et indique le maintien de la fonction rénale. Les résultats de notre étude sont en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études [335, 344, 349].





**Figure 61:** Taux plasmatique en créatinine, urée, sodium potassium et calcium (marker rénal) chez les différents groupes de rats traités. Les valeurs sont présentées en Moyenne  $\pm$  Ecart type. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .<sup>a</sup> par rapport au contrôle; <sup>b</sup> par rapport au groupe tween; <sup>c</sup> par rapport au groupe CCl<sub>4</sub>.

D'après l'étude bibliographique, il est établi que les anomalies induites par le CCl<sub>4</sub> sont liées à la génération de radicaux libres. De ce fait le rôle protecteur des produits naturels peut être dû à la capacité de leurs molécules bioactives à piéger les radicaux libres. Dans le cas de notre travail, et suite à l'analyse GC/MS de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* dans le chapitre I, deux composés majeurs ont été identifiés: le thymol et le carvacrol, ces composés sont connus pour leurs activités antioxydantes et donc leurs effets protecteurs [335]. L'analyse HPLC du miel de *Thymus vulgaris* a révélé la présence d'épicatéchine galate qui correspond au pic le plus élevé et à l'acide férulique, les deux composés également connus pour leur activité antioxydante élevée et donc leur effet protecteur [356, 357]. L'administration du mélange d'huile essentielle de l'*Origanum vulgare* et de miel du *Thymus vulgaris* a eu un effet synergique additif, il est suggéré que cet effet est dû à l'interaction entre les polyphénols principalement identifiés dans les deux échantillons. De cette observation, on peut dire que la formulation d'Aromiel a un effet thérapeutique plus important que l'huile essentielle et le miel seuls.



# Conclusion et Perspectives

Dernièrement, la recherche des effets synergétiques dans le domaine de la phytothérapie s'est imposée comme une nouvelle activité clé. Différentes combinaisons peuvent être étudiées, allant de simples molécules bioactives d'origine synthétique ou naturelle aux mélanges de produits naturels à l'état brut, en passant par des mélanges de produits naturels et de molécules chimiosynthétiques ou d'antibiotiques. Grâce à leurs compositions, particulières et d'une grande complexité, le miel et les huiles essentielles possèdent des propriétés intéressantes dans les domaines alimentaire, cosmétique et thérapeutiques. C'est dans cette optique que la présente thèse s'est penchée sur l'étude de la synergie entre ces deux produits naturels dont le mélange est source d'Aromiel.

L'analyse des paramètres physico-chimiques des différents échantillons de miels de Palestine et du Maroc ainsi que ceux de l'HE d'*Origanum vulgare*, a permis une bonne discrimination géographique en analyse ACP entre les différents produits qui étaient alignés aux standards internationaux.

L'analyse de la composition par HPLC des miels et l'HE d'*Origanum vulgare* étudiés a confirmé leur activité antioxydante élevée en rapport avec la teneur considérable en composés phénoliques. L'acide syringique, l'acide tannique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide coumarique, l'acide gallique, l'épicatéchine gallate et le pyrogallol sont les principaux composés identifiés dans les échantillons de miel. Il est à mentionner que l'acide tannique a été identifié pour la première fois dans le miel dans le présent travail. Par ailleurs, nous avons constaté une corrélation intéressante entre la concentration en composés phénolique du miel et le pouvoir anti radicalaire.

Nos résultats concernant l'activité antibactérienne sont prometteurs. Sur les 72 combinaisons, 4% présentaient une synergie totale, 37.5% présentaient une interaction synergique et additive partielle, 53% n'avaient aucune interaction et 4.5% n'avaient aucun effet sur les souches bactériennes. Le meilleur effet synergique a été obtenu avec la combinaison huile essentielle et échantillons de miel du Dagmos et de miel du Morar. Aussi, l'analyse statistique a révélé que plus un miel est riche en acides tannique, férulique, gallique, épicatechine galate et en mélanoidines, plus il a tendance à établir une synergie avec l'huile essentiel employée. L'acidité et une conductivité élevée sont aussi des facteurs influençant positivement la synergie.

Notre travail s'est intéressé également à l'étude de l'effet hépato-néphroprotecteur de l'Aromiel formé par le miel du *Thymus vulgaris* et de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* contre la toxicité induite par le CCl<sub>4</sub>. L'administration de l'Aromiel était liée à une diminution du niveau de toxicité du CCl<sub>4</sub>, objectivée par les biomarqueurs enzymatiques sanguins et la récupération d'une fonction rénale correcte chez les rats traités en comparaison au groupe non traité.

Il ressort de cette étude que l'Aromiel est associé à une activité thérapeutique supérieure à celle des deux produits naturels quand ces derniers sont utilisés séparément. En pratique, plusieurs conclusions ont été soulevées dans le présent travail :

- ➔ Obtention d'un Aromiel ayant un effet supérieur aux effets des produits constituant le mélange. Cet effet est dépendant de la composition des produits constituant et de la nature de l'activité biologique ciblée.
- ➔ L'activité de l'Aromiel est supérieure à celle de l'HE seule alors que cette dernière est utilisée en doses faibles dans le mélange. Ceci suggère le potentiel rôle du miel autant que vecteur augmentant la biodisponibilité de l'huile essentielle.
- ➔ L'activité supérieure de l'Aromiel a pu être objectivée dans des modèles biologiques complexes (souches bactériennes, modèles animaux de stress oxydatif) sous forme d'effets pharmacologiques prometteurs.

Ce travail, innovateur dans le domaine de l'Aromiel, nécessite d'autres études approfondies et plus ciblées. Il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres du statut antioxydant (SOD, Vitamine E, glutathion-Stransférase..). Des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer d'une part les composés qui interviennent dans l'établissement de l'effet de la combinaison et d'autre part les mécanismes impliqués. D'autres effets sont à investiguer pour adapter certaines combinaisons à des utilisations spécifiques. Et si ces mélanges sont à développer dans un proche avenir, ils doivent nécessairement répondre aux normes de qualité conventionnelles, et être adaptés en nature et dose de produits mélangés, à une anomalie spécifique.

# Références

- [1] Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius Commission Standards. Codex Stan 12-1981 2001:1–8.
- [2] Products N. 100 % pure natural essential oil-aromatherapy.
- [3] Couic-Marinié F, Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités Pharmaceutiques* 2013; 52:18–21.
- [4] Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2013; 16:731–42.
- [5] Afroz R, Em T, Zheng W, Pj L. *Molecular Pharmacology of Honey* 2016; 6.
- [6] Djilani A, Dicko A. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. *Nutrition, Well-Being and Health* 2010:156–78.
- [7] Cruz-Vega D, Verde-Star MJ, Salinas-Gonzalez NR, Rosales-Hernandez B, Estrada-Garcia I, Mendez-Aragon P, et al. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica* 2009; 22:557–9.
- [8] Couderc V. Toxicité des huiles essentielles. Thèse de Doctorat Vétérinaire Toulouse 2001:84.
- [9] Gertsch J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. *Planta Medica* 2011; 77:1086–98.
- [10] Lefebvre G, Daumas F. Une histoire de la médecine égyptienne antique. [Gustave Lefebvre. Essai sur la médecine égyptienne de l'époque pharaonique]. 2018:165–75.
- [11] Viel C, Doré J-C. Histoire et emplois du miel, de l'hydromel et des produits de la ruche. *Revue d'histoire de La Pharmacie* 2003; 91:7–20.
- [12] ROSSANT A. Le Miel , Un Composé Complexe Aux Propriétés Surprenantes. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie 2011.
- [13] Mickaël B. Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie 2010.
- [14] Lefief-Delcourt A. Le miel malin: Tous les bienfaits au quotidien de cet ingrédient délicieux et 100 % naturel. 2010.
- [15] DIRECTIVE 2001/112/CE DU CONSEIL du 20 décembre 2001 2014:1–16.
- [16] Núñez J. Nectar flow by melliferous flora and gathering flow by *Apis mellifera ligustica*. *Journal of Insect Physiology* 1977; 23:265–75.
- [17] Wykes GR. An investigation of the sugars present in the nectar of flowers of various species. *New Phytologist* 1952; 51:210–5.
- [18] Clément H. Le traité Rustica de l'apiculture. Rustica; 2011.
- [19] Toullec ANK. Abeille noire, *Apis mellifera mellifera*, historique et sauvegarde. Thèse de doctorat vétérinaire 2008:1–168.

- [20] Marchenay P, Bérard L. L'homme, l'abeille et le miel. De Borée; 2007.
- [21] Masson C, Arnold G. Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the workerbee. *Journal of Insect Physiology* 1984; 30:7–14.
- [22] Guerriat H. Etre performant en apiculture. H. Guerriat; 1996.
- [23] Gharbi M. Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie. Thèse 2012:1–268.
- [24] Lequet L. Du nectar à un miel de qualité: contrôles analytiques du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur. 2010.
- [25] Elamine Y, Aazza S, Lyoussi B, Dulce Antunes M, Estevinho LM, Anjos O, et al. Preliminary characterization of a Moroccan honey with a predominance of *Bupleurum spinosum* pollen. *Journal of Apicultural Research* 2017; 8839:1–13.
- [26] Louveaux J. La technologie du miel. 1959.
- [27] Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal* 2018; 12.
- [28] Kwakman PHS, te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. How honey kills bacteria. *The FASEB Journal* 2010; 24:2576–82.
- [29] Cherbuliez T, Domerego R. L'apithérapie médecine des abeilles. Amyris; 2003.
- [30] Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Science & Nutrition* 2018.
- [31] Stocker A, Schramel P, Kettrup A, Bengsch E. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2005; 19:183–9.
- [32] Alves A, Ramos A, Gonçalves MM, Bernardo M, Mendes B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis* 2013; 30:130–8.
- [33] Cherbuliez T, Domerego R. L'apithérapie médecine des abeilles. Amyris; 2003.
- [34] Alqarni AS, Owayss AA, Mahmoud AA. Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry* 2016; 9:114–20.
- [35] Malik KI, Malik MN, Aslam A. Honey compared with silver sulphadiazine in the treatment of superficial partial-thickness burns. *International Wound Journal* 2010; 7:413–7.
- [36] Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research* 2002; 22:1041–7.
- [37] Amiot MJ, Aubert S, Gonnet M, Tacchini M. Article de recherche Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie* 1989; 20:115-125.

- [38] Guillén I, Gabaldón JA, Núñez-Delicado E, Puchades R, Maquieira A, Morais S. Detection of sulphathiazole in honey samples using a lateral flow immunoassay. *Food Chemistry* 2011; 129:624–9.
- [39] Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry* 2011; 127:1023–30.
- [40] Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal* 2018; 12:35.
- [41] Aazza S, Lyoussi B, Antunes D, Miguel MG. Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2014; 65:449–57.
- [42] Lee HS, Nagy S. Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems. *Journal of Food Processing and Preservation* 1990; 14:171–8.
- [43] Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 2007; 7:159–65.
- [44] Andrițoiu CV, Andrițoiu V, Cuciureanu M, Nica-Badea D, Bibire N, Popa M. Effect of apitherapy products against carbon tetrachloride-induced toxicity in wistar rats. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2014; 55:835–47.
- [45] Dong R, Zheng Y, Xu B. Phenolic Profiles and Antioxidant Capacities of Chinese Unifloral Honeys from Different Botanical and Geographical Sources. *Food and Bioprocess Technology* 2013; 6:762–70.
- [46] Boukraâ L, Sulaiman SA. Rediscovering the antibiotics of the hive. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2009; 4:206–13.
- [47] Ville L. *plantes magiques du XiXème siècle à nos jours* 2017.
- [48] Pierre Franchomme, Roger Jollois DP. *L'aromathérapie exactement - Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques*. 2001.
- [49] Abrassart J-L. *Aromathérapie essentielle: huiles essentielles et parfums pour le corps et l'âme*. G. Trédaniel; 1997.
- [50] Belaiche. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, tome 2. Les Maladies infectieuses*. Maloine; 1996.
- [51] Aromathérapie: un peu d'histoire - Aromaterapia - Nutranews. [http://www.nutranews.org/sujet.pl?id=57&langue\\_id=7](http://www.nutranews.org/sujet.pl?id=57&langue_id=7) (accessed October 5, 2018).
- [52] Pitman V. *Aromatherapy : a practical approach*. Nelson Thornes; 2004.
- [53] AFSSA. *Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles* 2008:1–18.
- [54] Hakim Alilou. *Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc*:

- Asteriscus graveolens subsp. odoratus (Schousb.) Greuter et Asteriscus imbricatus (Cav.) DC. 2012.
- [55] Guinoiseau E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse, université de Corse-Pasquale Paoli, 2010.
- [56] Sharma S, Sangwan NS, Sangwan RS. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Science* 2003; 84:544–50.
- [57] Lobstein A. Composition chimique des huiles essentielles. *Françoise Couic-Marinière Annelise Lobstein* 2013:22–5.
- [58] Pibiri M-C, Roulet C-A, Seigneux C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. *CISBAT 2001 - EPFL* 2001:211–6.
- [59] Başer KHC, Buchbauer G. *Handbook of essential oils: science, technology, and application*. 2009.
- [60] Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015; 5:601–11.
- [61] Karleskind A, Association française pour l'étude des corps gras. *Manuel des corps gras. Technique et Documentation - Lavoisier*; 1992.
- [62] Bilgrami KS, Sinha KK, Sinha AK. Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion & garlic extracts. *The Indian Journal of Medical Research* 1992; 96:171–5.
- [63] Davidson PM, Branen AL. *Food antimicrobials-an introduction*. vol. 145. 2005. doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C.
- [64] Jean Bruneton. *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*. Brigitte Peyrot. Lavoisier, Paris: 2016.
- [65] Petersen M, Hans J, Matern U. *Biosynthesis of Phenylpropanoids and Related Compounds. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Oxford, UK: Wiley-Blackwell; p. 182–257.
- [66] PIBIRI M-C. assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Faculté environnement naturel, architectural et construit*, 2005.
- [67] Pierre Franchomme, Roger Jollois DP. *L'aromathérapie exactement Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. Fondements, démonstration, illustration, et applications d'une science médicale naturelle*. 2010.
- [68] Inouye S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy* 2003; 13:95–107.
- [69] Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44:1202–5.



- [70] Meyers M. *Oregano and Marjoram: an Herb Society of America Guide To the Genus Origanum*. The Herb Society of America, Kirtland, USA 2005:1–66.
- [71] Gargilius Martialis (0210-0260), Maire B, Hostettmann K, Fuchs M. *Se soigner par les plantes les &quot;Remèdes&quot; de Gargile Martial*. Éd. BHMS; 2007.
- [72] Fleurentin J. *Les plantes qui nous soignent : traditions et thérapeutique*. Éd. "Ouest-France; 2007.
- [73] Dubois J, Mitterand H, Dauzat A. *Dictionnaire étymologique*. Larousse; 2013.
- [74] *Origanum vulgare*. 2002.
- [75] Quezel Pierre - Santa Sébastien. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. 1962.
- [76] Kintzios SE. *Oregano: the genera Origanum and Lippia*. Taylor and Francis; 2002.
- [77] Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. *Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM 2016; 2016:3012462*.
- [78] Bagamboula C., Uyttendaele M, Debevere J. *Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri*. *Food Microbiology* 2004; 21:33–42.
- [79] Vale-Silva L, Silva M-J, Oliveira D, Goncalves M-J, Cavaleiro C, Salgueiro L, et al. *Correlation of the chemical composition of essential oils from Origanum vulgare subsp. virens with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi*. *Journal of Medical Microbiology* 2012; 61:252–60.
- [80] Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. *Antifungal Activities of Origanum vulgare subsp. hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa Essential Oils against Human Pathogenic Fungi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46:1739–45.
- [81] Korukluoglu M, Gurbuz O, Sahan Y, Yigit A, Kacar O, Rouseff R. *Chemical characterization and antifungal activity of origanum onites l. essential oils and extracts*. *Journal of Food Safety* 2009; 29:144–61.
- [82] Burt S. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94:223–53.
- [83] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. *Biological effects of essential oils – A review*. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46:446–75.
- [84] Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. *Essential Oils, Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review*. *Medicines* 2016; 3:25.
- [85] COLLECTIF. *Dictionnaire Vidal*. OVP; 1990.
- [86] Micali M, Fiorino M, Parisi S. *The Chemistry of Thermal Food Processing Procedures*. 2016.

- [87] Baser KHC, Özek T, Tümen G, Sezik E. Composition of the Essential Oils of Turkish *Origanum* Species with Commercial Importance. *Journal of Essential Oil Research* 1993; 5:619–23.
- [88] Gertsch J. Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology: Forth and Back to Intelligent Mixtures. *Planta Medica* 2011; 77:1086–98.
- [89] Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 2011; 82:34–7.
- [90] E. Huchet JC et LG. Les constituants chimiques du miel 1996. <https://www.apiservices.biz/fr/articles/classes-par-popularite/326-les-constituants-chimiques-du-miel> (accessed October 6, 2018).
- [91] Al-Khalifa AS, Al-Arifly IA. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry* 1999; 67:21–5.
- [92] Recondo MP, Elizalde BE, Buera MP. Modeling temperature dependence of honey viscosity and of related supersaturated model carbohydrate systems. *Journal of Food Engineering* 2006; 77:126–34.
- [93] Bogdanov S. Harmonised Methods of the International IHC. *Bee Product Science*, 2009:1–62.
- [94] Bogdanov S, Ruoff K, Oddo LP. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 2004; 35:4–17.
- [95] Bogdanov S, Lüllmann C, Martin P, von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G, et al. Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee World* 1999; 80:61–9.
- [96] Souza B, Roubik D, Barth O, Heard T, Enríquez E, Carvalho C, et al. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia* 2006; 31:867–75.
- [97] Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018; 2018:1–14.
- [98] Pataca L, Neto W, Marcucci M, Poppi R. Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry. *Talanta* 2007; 71:1926–31.
- [99] De la Barrera E, Nobel PS. Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science* 2004; 9:65–9.
- [100] Silva LR, Videira R, Monteiro AP, Valentão P, Andrade PB. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal* 2009; 93:73–7.
- [101] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Allured Pub. Corp*; 2007.
- [102] Terrab A, Díez MJ, Heredia FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry* 2002; 79:373–9.

- [103] Acquarone C, Buera P, Elizalde B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry* 2007; 101:695–703.
- [104] Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 1998; 63:549–62.
- [105] Felsner ML, Cano CB, Bruns RE, Watanabe HM, Almeida-Muradian LB, Matos JR. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004; 17:737–47.
- [106] Jonathan W. White, Jr., Mary L. Riethof MHS, and Irene Kushnir E. *Composition of american honeys*. Washington, D.C: 1962.
- [107] El-Haskoury R, Kriaa W, Lyoussi B, Makni M. Ceratonia siliqua honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. *Journal of Food and Drug Analysis* 2018; 26:67–73.
- [108] Piana ML, Oddo LP, Bentabol A, Bruneau E, Bogdanov S, Guyot Declerck C. Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie* 2004; 35:26–37.
- [109] Gonnet, M., Vache G. *Le gout du miel*. Paris: 1985.
- [110] Negueruela AI, Perez-arquillue and C. Color Measurement of Rosemary Honey in the Solid State by Reflectance Spectroscopy with Black Background. *J AOAC Int* 2000; 83(3):669-74.
- [111] Januário JGB, Oliveira AS, Dias SS, Klososki SJ, Pimentel TC. Kefir ice cream flavored with fruits and sweetened with honey: Physical and chemical characteristics and acceptance. *International Food Research Journal* 2018; 25:179–87.
- [112] Anabiotec B. *Analyse organoleptique et chimique du miel en fonction de son vieillissement , de son origine et de sa conservation .* 2014.
- [113] Jollois R , Pénoël D , Franchomme P, Mars J. *L’aromathérapie exactement : encyclopédie de l’utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d’une science médicale naturelle* e. Jollois; 2001.
- [114] Miguel MG. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 2010; 25:291–312.
- [115] Tisserand R, Young R. *Essential oil safety : a guide for health care professionals*. 1995.
- [116] Mayer F. *Utilisations therapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite*. Universite de lorraine, 2012.
- [117] Lucchesi M-E. *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l’extraction des huiles essentielles*. Université de la Réunion, 2005.
- [118] Tomi F, Bradesi P, Casanova J. Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis* 1995.
- [119] G. Schwedt. *Methodes d’analyse*. 1993.

- [120] J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier JPC. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège* 2007; 62:628–38.
- [121] Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences* 2011; 27:405–12.
- [122] MacLaren D (Don), British Association of Sport and Medicine. *Nutrition and sport*. Elsevier; 2007.
- [123] Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Medicine (Auckland, NZ)* 2006; 36:327–58.
- [124] Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona M-C, Pénicaud L, Casteilla L. Les espèces actives de l’oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Revue synthèse* 2006; 22:47–53.
- [125] Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences* 2011; 27:405–12.
- [126] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 2007; 74:324–9.
- [127] Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* 2013; 1:483–91.
- [128] Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal* 2011; 434:201–10.
- [129] Sharma V, Collins LB, Chen T-H, Herr N, Takeda S, Sun W, et al. Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget* 2016; 7:25377–90.
- [130] Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* 2010; 44:479–96.
- [131] Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research* 2006; 40:1250–8.
- [132] Baraibar MA, Friguet B. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Experimental Gerontology* 2013; 48:620–5.
- [133] Stark G. Functional Consequences of Oxidative Membrane Damage. *Journal of Membrane Biology* 2005; 205:1–16.
- [134] Atkin MA, Gasper A, Ullegaddi R, Powers HJ. Oxidative Susceptibility of Unfractionated Serum or Plasma: Response to Antioxidants in Vitro and to Antioxidant Supplementation. *Clinical Chemistry* 2005; 51:2138–44.
- [135] Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncology* 2012; 2012:137289.
- [136] Nakajima K, Nakano T, Tanaka A. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clinica Chimica Acta* 2006; 367:36–47.

- [137] Barouki R. Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences* 2006; 22:266–72.
- [138] Zhao Z, Zhao C, Zhang XH, Zheng F, Cai W, Vlassara H, et al. Advanced Glycation End Products Inhibit Glucose-Stimulated Insulin Secretion through Nitric Oxide-Dependent Inhibition of Cytochrome *c* Oxidase and Adenosine Triphosphate Synthesis. *Endocrinology* 2009; 150:2569–76.
- [139] Cano N, Societe francophone de nutrition enterale et parenterale. *Traite de nutrition artificielle de l'adulte. Le Pharmacien Hospitalier et Clinicien* 2007; 45:154.
- [140] Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2006; 64:390–6.
- [141] Rizzo AM, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, et al. Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers. *Advances in experimental medicine and biology* 2010; 698:52–67.
- [142] Negre-Salvayre A, Salvayre R. Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire. *Fondamental* 2005; 12.
- [143] Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J-O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 2002; 16:233–9.
- [144] Rodríguez-Carrizalez AD, Castellanos-González JA, Martínez-Romero EC, Miller-Arevillaga G, Villa-Hernández D, Hernández-Godínez PP, et al. Oxidants, antioxidants and mitochondrial function in non-proliferative diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes* 2014; 6:167–75.
- [145] Delattre J, Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques . Éd. Tec & doc-Éd. médicales internationales ; 2007.
- [146] Nicolosi RJ, Lawton CW, Wilson TA. Vitamin E reduces plasma low density lipoprotein cholesterol, LDL oxidation, and early aortic atherosclerosis compared with black tea in hypercholesterolemic hamsters. *Nutrition Research* 1999; 19:1201–14.
- [147] Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 2003; 361:2017–23.
- [148] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 2010; 4:118–26.
- [149] Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 2006; 13:24-29.
- [150] Schmitt B, Ferry C, Daniel N, Weill P, Kerhoas N, Legrand P. Effet d'un régime riche en acides gras  $\omega$ 3 et en CLA 9-cis, 11-trans sur l'insulinorésistance et les paramètres du diabète de type 2. *F o n d a m e n t a l* 2006;13.
- [151] Kehrer JP. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Critical Reviews in Toxicology* 1993; 23:21–48.
- [152] Ursini F, Tubaro F, Rong J, Sevanian A. Optimization of Nutrition: Polyphenols and

- Vascular Protection. *Nutrition Reviews* 2009; 57:241–9.
- [153] Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS. *Dietary tannins : consequences and remedies*. CRC Press; 1990.
- [154] Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009; 2:270–8.
- [155] Spencer JPE, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004; 423:148–61.
- [156] Sarni-Manchado P, Cheynier V. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Éditions Tec & Doc; 2006.
- [157] Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81:230S–242S.
- [158] Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65:1199–206.
- [159] Williamson G, Clifford MN. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity *British Journal of Nutrition* 2010; 104:S48–66.
- [160] F. Shahidi. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 2015.
- [161] Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* 2015; 5:27986–8006.
- [162] Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. *Polyphenols in human health and disease*. 2014.
- [163] Yao L, Datta N, Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Martos I, Singanusong R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry* 2003; 81:159–68.
- [164] Uthurry CA, Hevia D, Gomez-Cordoves C. Role of honey polyphenols in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2011; 3:141–59.
- [165] Gheldof N, Wang X-H, Engeseth NJ. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50:5870–7.
- [166] Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 2016; 5:e47.
- [167] Nieto G. *Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family*. Medicines (Basel, Switzerland) 2017; 4.
- [168] Laub GR. Discovery of the sulfa drugs. *Southern Medical Journal* 1986; 79:782.
- [169] Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiologie*. De Boeck; 2003.

- [170] Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *Journal of Natural Products* 2003; 66:1022–37.
- [171] Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology* 2006; 71:1006–15.
- [172] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2015; 13:42–51.
- [173] Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 2007; 128:1037–50.
- [174] Dzidic S, Bedeković V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacologica Sinica* 2003; 24:519–26.
- [175] Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 2002; 252:91–106.
- [176] Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2013; 12:371–87.
- [177] Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 2004; 10:S122–9.
- [178] Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2017; 7:478–82.
- [179] Pierre G, Dirk C, Yolande A, Cock Jo D, Meyere Frank D, Ridder Henri D, et al. Les infections nosocomiales en Belgique, volet II: Impact sur la mortalité et sur les coûts. 2009.
- [180] Bereket W, Hemalatha K, Getenet B, Wondwossen T, Solomon A, Zeynudin A, et al. Update on bacterial nosocomial infections 2012.
- [181] Régnier B, Brun-Buisson C. *L'infection en réanimation*. Masson; 1988.
- [182] Anas M. *les infections nosocomiales a propos de 55 cas colliges au maroc*. 2002.
- [183] Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M. *Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien*. Doin; 1995.
- [184] Barrett T, Barry Beaty UJ, Collins F, Martin Blaser UJ, York N, Richard Bradbury U, et al. *Emerging Infectious Diseases*. 2018.
- [185] OMS. *Prévention des infections nosocomiales*. 2002.
- [186] Botton B. *Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle*. Masson; 1990.
- [187] Bobadilla MSN. *A new antibacterial agent : in vitro bacteriological characterization and in vitro / in vivo performance of sustained release formulations*. Université lille nord de France, 2015.
- [188] Khayreddine B. *Essential oils , an alternative to synthetic food additives and thermal treatments*. MedCrave Group LLC 2018.

- [189] Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10:813–29.
- [190] Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. [Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination]. *Die Pharmazie* 1993; 48:301–4.
- [191] Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 2004; 18:435–48.
- [192] Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:8022–8.
- [193] Carson CF, Mee BJ, Riley T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46:1914–20.
- [194] Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68:1561–8.
- [195] Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 2000; 88:308–16.
- [196] Cosentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 1999; 29:130–5.
- [197] Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91:453–62.
- [198] Almasaudi SB, Al-Nahari AAM, Abd El-Ghany ESM, Barbour E, Al Muhayawi SM, Al-Jaouni S, et al. Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2017; 24:1255–61.
- [199] Bizerra FC, Da Silva PI, Hayashi MAF, Hayashi MAF. Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Frontiers in Microbiology* 2012; 3:398.
- [200] Buba F, Gidado A, Shugaba A. *Biochemistry & Analytical Biochemistry Physicochemical and Microbiological Properties of Honey from North* 2013; 2.
- [201] Brudzynski K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology* 2006; 52:1228–37.
- [202] Omardien S, Brul S, Zaat SAJ. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2016; 4:111.
- [203] Malanovic N. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2016; 1858:936–46.



- [204] Bachanová K, Klaudiny J, Kopernický J, Šimúth J. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 2002; 33:259-269.
- [205] Majtan J. Methylglyoxal-a potential risk factor of manuka honey in healing of diabetic ulcers. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM* 2011; 295494.
- [206] Kwakman PHS, Te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *Plos one* 2011; 6:e17709.
- [207] Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8:412.
- [208] Brudzynski K, Sjaarda C. Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey. *Plos one* 2015; 10:e0120238.
- [209] Olofsson TC, Butler È, Markowicz P, Lindholm C, Larsson L, Vásquez A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal* 2016; 13:668–79.
- [210] De LAN, Legendre DS. Les fondamentaux de la pathologie digestive - Chapitre 6 : foie - voies biliaires. *CDU-HGE/Editions Elsevier-Masson* 2014: 1–39.
- [211] Encyclopaedia Britannica inc. *The new encyclopaedia Britannica*. 2016.
- [212] Walker RM. Francis Glisson and his capsule. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 1966; 38:71–91.
- [213] Jean-Pierre Benhamou, Johannes Bircher, Neil McIntyre, Mario Rizzetto JR. *Hépatologie clinique*. 2002.
- [214] Marieb EN, Lachaine R. *Biologie humaine principes d'anatomie et de physiologie*. Pearson Education France; 2008.
- [215] Wolfgang Kühnel. *Atlas de poche d'histologie*. 560th ed. 2015.
- [216] Bedossa P, Callard P. [Alcoholic liver disease. From morphology to pathogenesis]. *Annales de Pathologie* 1995; 15:324–31.
- [217] Tortora GJ, Derrickson B, Forest M, Martin L. *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck; 2007.
- [218] Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6:244–51.
- [219] Wang PP, Beaune P, Kaminsky LS, Dannan GA, Kadlubar FF, Larrey D, et al. Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes. *Biochemistry* 1983; 22:5375–83.
- [220] Böhm F, Köhler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth

- factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine* 2010; 2:294–305.
- [221] Jean-Yves Scoazec. *Cellules souches et régénération hépatique*. EMC Hépatologie 2003.
- [222] Sørensen KK, McCourt P, Berg T, Crossley C, Couteur D Le, Wake K, et al. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2012; 303:R1217–30.
- [223] Deugnier Y. *Anatomo - physiologie du foie* 2005;1.
- [224] Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126:955–63.
- [225] Robert S. *Caractérisation des signaux de danger et de la signalisation cellulaire dans le développement de la fibrose hépatique*. Université de Rennes, 2016.
- [226] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *The Lancet* 2008; 371:838–51.
- [227] Pinzani M, Romanelli RG, Magli S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *Journal of Hepatology* 2001; 34:764–7.
- [228] Livingston SE, Deubner H, Bruden DL, McMahon BJ, Homan CE, Townshend-Bulson LJ, et al. Factors associated with the progression of fibrosis on liver biopsy in Alaska Native and American Indian persons with chronic hepatitis C. *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien de Gastroenterologie* 2010; 24:445–51.
- [229] Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, Yucesoy B. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicology Letters* 2001; 120:317–21.
- [230] Raucy JL, Kraner JC, Lasker JM. Bioactivation of Halogenated Hydrocarbons by Cytochrome P4502E1. *Critical Reviews in Toxicology* 1993; 23:1–20.
- [231] Weber LWD, Boll M, Stampfl A, Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes : Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes : Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model 2016; 8444:105–36.
- [232] Gillet C. *Tétrachlorure de carbone*. 2005.
- [233] Mégarbane B, Deye N, Baud F. Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. *Reanimation* 2007; 16:632–42.
- [234] Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1985; 1:27–38.
- [235] McCay PB, Lai EK, Poyer JL, DuBose CM, Janzen EG. Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 1984; 259:2135–43.
- [236] Cheeseman KH, Albano EF, Tomasi A, Slater TF. The effect of the administration of

- cobaltic protoporphyrin IX on drug metabolism, carbon tetrachloride activation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions* 1984; 50:143–51.
- [237] McCay PB, Poyer JL. Enzyme-Generated Free Radicals as Initiators of Lipid Peroxidation in Biological Membranes. *The Enzymes of Biological Membranes*, Boston, MA: Springer US; 1976, p. 239–56.
- [238] Ruchirawat M, Mostafa MH, Shank RC, Weisburger EK. Inhibitory effects of carbon tetrachloride on dimethylnitrosamine metabolism and DNA alkylation. *Carcinogenesis* 1983; 4:537–9.
- [239] Morel P, Tallineau C, Pontcharraud R, Piriou A, Huguet F. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochemistry International* 1998; 33:531–40.
- [240] Naab OA, Tamame MA, Caccavari MA. Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2008; 6:566.
- [241] Inc P. Determination of Hydroxymethylfurfural (HMF) in Honey. 2015.
- [242] AFNOR. Huiles essentielles recueil sur CD-ROM. 2009.
- [243] Bilal GM. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. Faculte des sciences appliquees, 2016.
- [244] CAILLAUD M-A. Étude de l'espèce *Origanum vulgare* L. 2013.
- [245] Ouis N. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. 2015.
- [246] Huile essentielle d'origan: utilisation, propriétés et bienfaits n.d. <https://www.passeportsante.net/fr/Solutions/HuilesEssentielles/Fiche.aspx?doc=huile-essentielle-origan> (accessed October 5, 2018).
- [247] El Brahim Rajae. Caractérisation morphologique et phénologique de quelques accessions d'*Origanum compactum*. Département des sciences de la vie, 2014.
- [248] Vale-Silva L, Silva M-J, Oliveira D, Goncalves M-J, Cavaleiro C, Salgueiro L, et al. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. virens with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology* 2012; 61:252–60.
- [249] Andi SA, Nazeri V, Hadian J, Zamani Z. Variability of Essential Oil Composition of *Origanum vulgare* L. ssp. Populations from Iran. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2011; 5:152-155.
- [250] Derwish, Benziane Z, Manar, Boukir A, Taouil R. phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of EOs of *O. vulgare* from Morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 2010; 5:120-129.
- [251] Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial

- essential oils. *Industrial Crops and Products* 2013; 43:587–95.
- [252] Fallico B, Zappalà M, Arena E, Verzera A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry* 2004; 85:305–13.
- [253] Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry* 2007; 100:1649–53.
- [254] Prica N, Živkov-Baloš M, Jakšić S, Mihaljev Ž, Kartalović B, Babić J, et al. Moisture and Acidity As Indicators of the Quality of Honey Originating From Vojvodina Region. *Arhiv Veterinarske Medicine* 2014; 7:99–109.
- [255] Aazza S, Lyoussi B, Antunes D, Miguel MG. Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial portuguese honeys. *Journal of Food Science* 2013; 78.
- [256] Stankovic M. Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts from leaves and roots of *Jovibarba heuffelii* (Schott.) A. Löve and D. Löve. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012; 6(33):4804-4810.
- [257] Khalil MI, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam MA, Islam MN, et al. Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. *Molecules* 2012; 17:11199–215.
- [258] Laudine L. Du nectar a un miel de qualite : controles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur. *Universite claudes-bernard - Lyon*, 2010.
- [259] Velásquez Giraldo A V. Caracterización físico-química y microbiológica de la miel de *Apis mellifera* sp. del Suroeste de Antioquia, Colombia. *Ingeniería y Ciencia - IngCienc* 2013; 9:61–74.
- [260] Ajlouni S, Sujirapinyokul P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chemistry* 2010; 119:1000–5.
- [261] Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples 2018:1–10.
- [262] Aazza S, Lyoussi B, Antunes D, Miguel MG. Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2014; 65:449–57.
- [263] Bettar I, González-Miret ML, Hernanz D, Marconi A, Heredia FJ, Terrab A. Characterisation of Moroccan Spurge (*Euphorbia*) honeys by their physicochemical characteristics, mineral contents and colour. *Arabian Journal of Chemistry* 2015.
- [264] Cavia MM, Fernández-Muiño MA, Alonso-Torre SR, Huidobro JF, Sancho MT. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chemistry* 2007; 100:1728–33.
- [265] Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, Bogdanov S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry* 2009; 112:863–7.
- [266] El Sohaimy SA, Masry SHD, Shehata MG. Physicochemical characteristics of honey

- from different origins. *Annals of Agricultural Sciences* 2015; 60:279–87.
- [267] Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry* 2011; 127:1023–30.
- [268] Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P, Estevinho L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48:544–8.
- [269] Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 1998; 63:549–62.
- [270] Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Bello-López MÁ, Callejón-Mochón M, Jiménez-Sánchez JC, Guiraúm-Pérez A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta* 2005; 65:686–91.
- [271] Silva LR, Videira R, Monteiro AP, Valentão P, Andrade PB. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal* 2009; 93:73–7.
- [272] Terrab A, Díez MJ, Heredia FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry* 2002; 79:373–9.
- [273] Karabagias IK, Louppis AP, Karabournioti S, Kontakos S, Papastephanou C, Kontominas MG. Characterization and classification of commercial thyme honeys produced in specific Mediterranean countries according to geographical origin, using physicochemical parameter values and mineral content in combination with chemometrics. *European Food Research and Technology* 2017; 243:889–900.
- [274] Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Science & Nutrition* 2018; 1-10.
- [275] Marini F. *Chemometrics in food chemistry*. Elsevier Ltd; 2013.
- [276] Amiot MJ, Aubert S, Gonnet M, Tacchini M, Les MT. Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie* 1989; 20:115-125.
- [277] Yao L, Datta N, Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Martos I, Singanusong R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry* 2003; 81:159–68.
- [278] Silva TMS, dos Santos FP, Evangelista-Rodrigues A, da Silva EMS, da Silva GS, de Novais JS, et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis* 2013; 29:10–8.
- [279] Nicholson RL, Hammerschmidt R. Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 1992; 30:369–89.
- [280] Morton LW, Caccetta RA-A, Puddey IB, Croft KD. Chemistry And Biological Effects Of Dietary Phenolic Compounds: Relevance To Cardiovascular Disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000; 27:152–9.

- [281] Taghvaei M, Jafari SM. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52:1272–82.
- [282] Singleton V L RJAJ. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. New York: Wiley 1964:331.
- [283] OIV RIDMD. Méthode OIV-MA-AS2-10 Indice de Folin-Ciocalteu. 2009.
- [284] Samatha T, Shyamsundarachary R, Srinivas P, Rama Swamy N. Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *oroxylum indicum* l.kurz. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2012; 5: 177-179.
- [285] Sugathakumar Adithya E, Santha Lakshmi M, Hephzibah Christabel P, Mahalingam Sasikumar J. In vitro antioxidant, anti-lipid peroxidation activities and HPLC analysis of methanol extracts from bark and stem of *Mahonia leschenaultia* takeda. *Asian Journal of Plant Science and Research* 2013; 3:116–26.
- [286] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 1999; 269:337–41.
- [287] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 1995; 28:25–30.
- [288] HPLC - Systems Chemistry <https://www.ru.nl/systemschemistry/equipment/chromatography/hplc/> (accessed October 7, 2018).
- [289] Aljadi AM, Yusoff KM. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2003; 33:229–36.
- [290] Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz ALTG, De Carvalho JE, Pastore GM. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49:1610–5.
- [291] Dar MY, Shah WA, Rather MA, Qurishi Y, Hamid A, Qurishi MA. Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil and major constituents of *Cymbopogon jawarancusa* (Kashmir). *Food Chemistry* 2011; 129:1606–11.
- [292] Ljiljana P. Stanojević, Jelena S. Stanojević, Dragan J. Cvetković DPI. Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.). *Biologica Nyssana* 2016; 7:131–9.
- [293] Pontis JA, Costa LAMA da, Silva SJR da, Flach A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Science and Technology (Campinas)* 2014; 34:69–73.
- [294] Moniruzzaman M, Sulaiman S, Khalil M, Gan S. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal* 2013; 7:138.

- [295] Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare L* . Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2018; 2018.
- [296] Paramás AMG, Bárez JAG, Marcos CC, García-Villanova RJ, Sánchez JS. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). Food Chemistry 2006; 95:148–56.
- [297] R A, EM T, W Z, PJ L. Molecular Pharmacology of Honey. Clinical and Experimental Pharmacology 2016; 06:1–13.
- [298] dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GEP. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2006; 29:2236–40.
- [299] Andrade P, Ferreres F, Gil MI, Tomás-Barberán FA. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. Food Chemistry 1997; 60:79–84.
- [300] Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y. Reactive oxygen species and intracellular Ca<sup>2+</sup>, common signals for apoptosis induced by gallic acid. Biochemical Pharmacology 1998; 55:1973–81.
- [301] Shiota S, Shimizu M, Mizushima T, Ito H, Hatano T, Yoshida T, et al. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). Biological & Pharmaceutical Bulletin 1999; 22:1388–90.
- [302] Danila A-M, Kotani A, Hakamata H, Kusu F. Determination of Rutin, Catechin, Epicatechin, and Epicatechin Gallate in Buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench by Micro-High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007; 55:1139–43.
- [303] Souquet J-M, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. Phytochemistry 1996; 43:509–12.
- [304] Hinneburg I, Damien Dorman HJ, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. Food Chemistry 2006; 97:122–9.
- [305] Duh P-D, Tu Y-Y, Yen G-C. Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). LWT - Food Science and Technology 1999; 32:269–77.
- [306] Belhaj O, Oumato J, Zrira S. Étude Physico-Chimique De Quelques Types De Miels Marocains. Rev Mar Sci Agron Vét 2015; 3:71–5.
- [307] NICKLIN J. Microbiologie. 2000.
- [308] Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management 2015; 40:277–83.
- [309] Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clinical Microbiology Reviews 2015; 28:337–418.

- [310] L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques n.d. <http://www.who.int/fr/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed October 6, 2018).
- [311] Freire-Moran L, Aronsson B, Manz C, Gyssens IC, So AD, Monnet DL, et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria Time to react is now. *Drug Resistance Updates* 2011; 14:118–24.
- [312] Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:95-99.
- [313] Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Stojanović NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 20:932–52.
- [314] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. 2015.
- [315] Furtado GL, Medeiros AA. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: significance of the intermediate category. *Journal of Clinical Microbiology* 1980; 12:550–3.
- [316] Nishio EK, Ribeiro JM, Oliveira AG, Andrade CGTJ, Proni EA, Kobayashi RKT, et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports* 2016; 6:21641.
- [317] Helander IM, Kilpeläinen I, Vaara M. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a <sup>31</sup>P-NMR study. *Molecular Microbiology* 1994; 11:481–7.
- [318] Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005; 49:2474–8.
- [319] Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases* 2006; 10:236–41.
- [320] Hammer KA, Carson CF, Riley T V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *American Journal of Infection Control* 1996; 24:186–9.
- [321] Mandal S, DebMandal M, Pal NK, Saha K. Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2010; 3:961–4.
- [322] Bouhlali E dine T, Bammou M, Sellam K, Benlyas M, Alem C, Filali-Zegzouti Y. Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *Journal of King Saud University - Science* 2016; 28:136–42.



- [323] Boukraa L. Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic* 2008; 13:330–3.
- [324] Brudzynski K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology* 2006; 52:1228–37.
- [325] Montenegro G, Mejías E. Biological applications of honeys produced by *Apis mellifera*. *Biological Research* 2013; 46:341–5.
- [326] Adeleke OE, Olaitan JO, Okpekpe EL. Comparative antibacterial activity of honey and gentamicin against *Escherichia coli* and *pseudomonas aeruginosa*. *Annals of Burns and Fire Disasters* 2006; 19:201–4.
- [327] Alzahrani HA, Alsabehi R, Boukraâ L, Abdellah F, Bellik Y, Bakhotmah BA. Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins. *Molecules* 2012; 17:10540–9.
- [328] Von Döhren H. *Antibiotics: Actions, origins, resistance*, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. \$99.95 (hardcover). *Protein Science* 2009; 13:3059–60.
- [329] Thormar H. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. J. Wiley; 2011.
- [330] Chin NX, Weitzman I, Della-Latta P. In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with flucanazole and itraconazole against *Candida species* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41:850–2.
- [331] Ait Dra L, Ait Sidi Brahim M, Boualy B, Aghraz A, Barakate M, Oubaassine S, et al. Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products* 2017; 109:746–52.
- [332] H B, A B, B M. Antibacterial effect of polyphenols extracted from different honeys against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Clinical Investigation* 2017; 07:1–5.
- [333] Bueno-Costa FM, Zambiasi RC, Bohmer BW, Chaves FC, Silva WP da, Zanusso JT, et al. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology* 2016; 65:333–40.
- [334] Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary And Alternative Medicine* 2014; 14:225.
- [335] Rabe NM, Aboraya AO. Hepatoprotective effect of dill (*Anethum graveolens* L.) and Fennel (*foeniculum vulgare*) oil on hepatotoxic rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 2014; 13:303–9.
- [336] Asaduzzaman M, Nahar L, Hasan M, Khatun A M SH, , Hasan N, Tamannaa Z, Huda N, Fazley Rabbi M, Ray M, Nur Islam M, Maniruzzaman M MIM, N D, S and S. Antihyperglycemic Activity, Antihyperlipidemic Activity, Hepatoprotective Activity and Histopathological Analysis of Natural Honey in Streptozotocin Induced Diabetic

- Rats. *Journal of Cytology & Histology* 2016; 07:2–6.
- [337] Xijun Wang, Aihua Zhang HS. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 63:570–7.
- [338] Saranraj P, S. Sivasakthi, Feliciano GD. Pharmacology of Honey: A Review. *Advances in Biological Research* 2016; 10 (4): 271-289.
- [339] Miraj S. Antioxidant, anticancer, antimicrobial potential of *Origanum vulgare* 2016; 8:89–97.
- [340] Makni M, Chtourou Y, Barkallah M, Fetoui H. Protective effect of vanillin against carbon tetrachloride (CCI 4)-induced oxidative brain injury in rats. *Toxicology and Industrial Health* 2012; 28:655–62.
- [341] Zimmerman HJ. Drug-Induced Liver Disease. *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver* 1999; 4:427–57.
- [342] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: Eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189:113–27.
- [343] Saral Ö, Yildiz O, Aliyazicioğlu R, Yuluğ E, Canpolat S, Öztürk F, et al. Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences* 2016; 46:194–202.
- [344] Fernando De Ritis Mcagg. An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: The transaminase serum activities. *Clinica Chimica Acta* 1957; 2:424–8.
- [345] Teeter MM, Yamano A, Stec B, Mohanty U. On the nature of a glassy state of matter in a hydrated protein: Relation to protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98:11242–7.
- [346] Bedossa P. Assessment of hepatitis C: Non-invasive fibrosis markers and/or liver biopsy. *Liver International* 2009; 29:19–22.
- [347] Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2014; 29:269–78.
- [348] Andritoiu CV, Ochiuz L, Andritoiu V, Popa M. Effect of apitherapy formulations against carbon tetrachloride-induced toxicity in Wistar rats after three weeks of treatment. *Molecules* 2014; 19:13374–91.
- [349] Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal* 2005; 172:367–79.
- [350] Shukla S, Bhadauria M, Jadon A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Indian Journal of Experimental Biology* 2004; 42:993–7.
- [351] Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 2004; 113:1776–82.
- [352] Barrett KE, Ganong WF. *Ganong’s review of medical physiology*. McGraw-Hill Medical; 2012.

- [353] Adewole S, Salako A, Doherty O, Naicker T. Effect of melatonin on carbon tetrachloride- induced kidney injury in wistar rats. *African Journal of Biomedical Research* 2010; 10: 153–164.
- [354] Abraham P, Wilfred G, Cathrine. Oxidative damage to the lipids and proteins pf the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 1999; 289:177–9.
- [355] Srinivasan M, Rukkumani R, Ram Sudheer A, Menon VP. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2005; 19:491–6.
- [356] Malavolta M, Mocchegiani E. *Molecular basis of nutrition and aging*. Academic Press; 2016.

# Annexes

## Research Article

# Honey Antibacterial Effect Boosting Using *Origanum vulgare* L. Essential Oil

Hamada Imtara, Youssef Elamine, and Badiâa Lyoussi 

Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environmental Health, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdallah, BP 1796 Atlas, 30 000 Fez, Morocco

Correspondence should be addressed to Badiâa Lyoussi; lyoussi@gmail.com

Received 11 December 2017; Accepted 10 January 2018; Published 15 March 2018

Academic Editor: Laura De Martino

Copyright © 2018 Hamada Imtara et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The appearance of new bacterial strains which cause pathogenic diseases and which are resistant to the most used antibiotics requires probing new antibacterial agents sources. Therefore, the main aim of the present work was to follow the antibacterial activity of honey samples from Palestine and Morocco, after the combination with *Origanum vulgare* L. essential oil, and figure out whether the honey physicochemical parameters and geographic origin influence the final activity. The results of this study showed good geographical discrimination between the Palestinians and Moroccan honey samples. The antioxidant and antimicrobial activities showed a significant correlation with honey color, melanoidins, and phenolic and flavonoids contents. Furthermore, the possible effect of honey physicochemical parameters on the gained antimicrobial activities was assessed using the principal component analysis (PCA). Some parameters showed a promising effect and seem to be important in the process of honey samples selection. Namely, melanoidins content, phenolic content, electrical conductivity, and mineral content were shown to be positively influencing the gained antibacterial activity after the combination with essential oil against the tested strains, although a significant negative correlation was seen with the FIC only in the case of *Escherichia coli* (ATB: 57).

## 1. Introduction

Multidrug resistant bacteria or superbugs pose a serious threat to the world health [1]. The world health organization published in the beginning of the current year (2017) a report listing the most dangerous superbugs to which new antibiotics should be discovered urgently [2]. The decrease of introduction of new antibiotics to the market contributed to the emergence and spreading of superbugs to an uncontrollable extent [3]. The discovery of new antibacterial agents is mainly based on natural compounds such as nonculturable bacteria as targets and nonnatural chemical route, for example, prontosil, metronidazole, and isoniazid [4]. Another source is the screening of the bioactive compounds provided by the natural products [5].

Since ancient times, honey was used for burns and wounds healing [6, 7]. Subjecting honey to laboratory and clinical investigations during the past few decades linked its healing and anti-inflammatory properties [8] to the antimicrobial effect but also antioxidant activity [9, 10]. Honey

antimicrobial property, as the main factor in the protection of the wound, is mainly due to the osmolarity effect of high sugar concentrations, low water content, and low pH and content of other compounds [11–13]. In addition, honey contains molecules that inhibit bacterial growth, such as hydrogen peroxide and nonperoxide inhibins, as well-known as phytochemicals compounds [14, 15]. The antimicrobial activity of honey seems to vary depending on its geographical and/or botanical origins [16]. The antimicrobial specificity of honey also depends on the tested pathogen [7, 17].

Essential oils possess antiradical, antioxidant, antibacterial, antiparasitic, antifungal, and antiviral properties [18, 19]. An interesting essential oil that has been recognized as source of alternative antimicrobial and antioxidant compounds to be applied in food conservation is extracted from *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). It is a very versatile plant and has been used in traditional health care for a long time such as carminative, antispasmodic, and antiseptic. Further, its biological properties have been explored by pharmaceutical, culinary, agricultural, and cosmetic industries as spices

substances in foodstuffs, alcoholic beverages, and perfumes because of its spicy fragrance [20–22]. Oregano (*Origanum vulgare* L.) possesses an antibacterial property, and this is due mainly to its content of carvacrol and thymol and it possesses hydrophobicity characteristic, which results in the separation of the lipids from the bacterial membrane, disrupting the cell structure and making it much more permeable [23, 24]. The phenolic structure of thymol plays roles in antibacterial activity by entering the cell and permeabilizing the cytoplasm membrane, leading to a disturbed cellular metabolism [25].

The extensive investigation of the antimicrobial activities of honey and essential oils against a large category of bacterial and fungal pathogenesis is extended to test the combinations of both natural products [25, 26]. In all those studies it is found that there are positive interactions. Therefore, the main aim of the present work is to follow the changes in honey antibacterial activity, after the combination with *Origanum vulgare* L. essential oil, and figure out whether the honey physicochemical parameters influence the final activity.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Honey Samples.** Twelve varieties of honey (H1 through H12) from different botanical origins were used in this study: Palestinian honeys (H1–H6) were purchased from a Palestinian beekeeper and Moroccan honeys (H7–H12) were purchased from a Moroccan beekeeper. All of the honey samples were collected in 2015 and stored at room temperature (22–24°C) in airtight plastic containers until analysis. The labels used in the study were taken from commercial containers and based on information from beekeepers who we bought those honeys samples. Table 1 shows the labels of the used samples.

**2.2. Essential Oils Extraction.** The aerial parts (leaves and flowers) of the plant *Origanum vulgare* L. (EO) were bought from the herbalist in the region Imouzzer and were dried at room temperature, hydrodistilled for 4 h using a Clevenger type apparatus (Barnstead electrothermal, made in UK). The oils were dried over anhydrous sodium sulfate and stored in the dark at 2–4°C.

**2.3. Free Acidity, pH, Ash, Electrical Conductivity, and Moisture.** The measurements were carried out according to the Intl. Honey Commission IHC [27].

**2.4. Honey Color and Melanoidins Estimations.** Color was determined with a spectrophotometer by reading the absorbance in aqueous solutions at 635 nm (10 g honey in 20 mL water) [28]. Honey colors and their absorbance and mm pfund values were obtained using the following algorithm:

$$\text{mm Pfund} = -38.7 + 371.39 \times \text{Absorbance}. \quad (1)$$

Honey color was also determined spectrophotometrically by another method. The absorbance was measured at A560 and A720, and the net absorbance was calculated (A560–A720). Melanoidin content was estimated based on the browning index (net absorbance at A450–A720) [29]. The results were expressed as absorption units (AU).

**2.5. Determination of Mineral Elements.** The determination of potassium and sodium was performed by flame photometry using an air/butane flame. The determination of calcium and magnesium was performed by atomic absorption spectrometry [30].

**2.6. Total Phenol Content.** The total phenol content was determined according to the method described by Singleton and Rossi [31]. Total phenol content was expressed as the milligrams of the gallic acid equivalent per 100 gram of the honey mass (mg GAE/100 g).

**2.7. Total Flavonoid Content.** The total flavonoid content was determined according method described by Samatha et al. [32]. The flavonoid content was expressed as the milligrams of the quercetin equivalent per 100 gram of the honey mass (mg Q/100 g).

**2.8. Total Flavonol Content.** Total flavonol content was determined according method described by Engoor et al. [33]. The flavonol content was expressed as the milligrams of the quercetin equivalent per 100 gram of the honey mass (mg Q/100 g).

**2.9. Estimation of Total Antioxidant Capacity by Phosphomolybdate Assay.** The total antioxidant capacity was estimated by the phosphomolybdenum method according to the procedure described by Prieto et al. [34]. Total antioxidant capacity content was expressed as the milligrams of the ascorbic acid equivalent per 100 gram of the honey mass (mg AA/g).

**2.10. DPPH Scavenging Assay.** The DPPH radical scavenging activity assay was measured according to the method described by Brand-Williams et al. [35].

**2.11. Determination of Reducing Power.** The determination of reducing power assay was carried out as described by Oyaizu [36].

**2.12. Bacterial Strains and Inoculums Standardization.** In this study the antibacterial activity of EO, honeys, and mixtures (combination of honey and essential oil) were tested against six bacterial strains: four Gram-negative strains (*Escherichia coli* BLSE (ATB: 87) BGN, *Escherichia coli* (ATB: 57) B6N, *Escherichia coli* (ATB: 97) BGM, and *Pseudomonas aeruginosa*) and two Gram-positive strains (*Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*). *Escherichia coli* BLSE (ATB: 87) BGN, *Escherichia coli* (ATB: 57) B6N, and *Escherichia coli* (ATB: 97) BGM were obtained from the Hassan II university Hospital and *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus* from the Laboratory of Microbiology, FMP, Fez were used as test microorganisms. Stock cultures were kept on Muller-Hinton agar under refrigeration (4°C). The inoculum suspension was obtained by taking colonies from 24-hour cultures. The colonies were suspended in sterile saline (0.9% NaCl) and shaken for 15 seconds. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard (equivalent to  $1-5 \times 10^8$  cfu/mL) [37].

TABLE 1: Honey samples purchase information and physicochemical characterization.

Sample code	Local appellation	Scientific name of the plant	Region name	pH	Free acidity (mEq/kg)	Electrical conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Moisture (%)	Ash (%)	Color (A560–A720)	Melanoidin (A450–A720)	Pfund scale (mm)	Honey color
H1	Morar	<i>Centaurea diumulosa</i>	Al-Khalil	4.32 ± 0.01 <sup>i</sup>	21.00 ± 1.00 <sup>ab</sup>	573.67 ± 5.03 <sup>c</sup>	15 ± 0.1 <sup>f</sup>	0.320 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>f</sup>	42.94 ± 1.22 <sup>e</sup>	Light extra amber
H2	Morar akhdar	<i>Echinops spinosissimus</i>	Al-Khalil	3.71 ± 0.01 <sup>b</sup>	30.17 ± 2.08 <sup>abc</sup>	415.00 ± 5.57 <sup>f</sup>	17 ± 0.1 <sup>bcd</sup>	0.080 ± 0.00 <sup>j</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>cd</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>d</sup>	35.08 ± 2.29 <sup>ef</sup>	Light extra amber
H3	Zohif	<i>Thymus capitatus</i>	Al-Khalil	4.09 ± 0.01 <sup>g</sup>	27.00 ± 1.32 <sup>abc</sup>	554.00 ± 2.65 <sup>cd</sup>	16.75 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	0.109 ± 0.006 <sup>h</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.65 ± 0.02 <sup>e</sup>	50.97 ± 0.86 <sup>e</sup>	Light amber
H4	Rabat	<i>Conyza bonariensis</i>	Ramallah	3.66 ± 0.01 <sup>a</sup>	23.67 ± 1.89 <sup>ab</sup>	273.00 ± 4.58 <sup>h</sup>	17.9 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.093 ± 0.001 <sup>i</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>g</sup>	10.53 ± 199 <sup>g</sup>	Extra white
H5	Multifloral	<i>Thymus capitatus</i> <i>Origanum syriacum</i>	Ramallah	3.80 ± 0.02 <sup>c</sup>	30.25 ± 3.73 <sup>abc</sup>	368.00 ± 1.73 <sup>g</sup>	17.3 ± 0.2 <sup>bcd</sup>	0.178 ± 0.006 <sup>g</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.64 ± 0.05 <sup>e</sup>	51.73 ± 5.63 <sup>e</sup>	Light amber
H6	Sader	<i>Ziziphus spina-christi</i>	Jericho	4.48 ± 0.01 <sup>j</sup>	16.67 ± 1.04 <sup>a</sup>	688.67 ± 3.06 <sup>b</sup>	17.6 ± 0.2 <sup>bc</sup>	0.222 ± 0.00 <sup>f</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.55 ± 0.00 <sup>f</sup>	42.05 ± 1.10 <sup>e</sup>	Light extra amber
H7	Zaitra	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Timahdite	3.90 ± 0.01 <sup>e</sup>	3783 ± 2.25 <sup>abcd</sup>	449.00 ± 6.00 <sup>e</sup>	16.4 ± 0.1 <sup>bcd</sup>	0.235 ± 0.001 <sup>e</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.10 ± 0.02 <sup>c</sup>	132.07 ± 3.03 <sup>b</sup>	Dark amber
H8	Limon	<i>Citrus limon</i> L.	Khnichet	4.03 ± 0.01 <sup>f</sup>	14.67 ± 2.08 <sup>a</sup>	181.13 ± 0.25 <sup>i</sup>	18.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.183 ± 0.006 <sup>g</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>h</sup>	4.07 ± 3.38 <sup>g</sup>	Water white
H9	Bochnikha	<i>Armeni visnaga</i> L.	Had Kourt	4.03 ± 0.01 <sup>f</sup>	30.08 ± 2.01 <sup>abc</sup>	425.67 ± 2.08 <sup>f</sup>	17.9 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.187 ± 0.003 <sup>g</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.02 <sup>a</sup>	92.18 ± 1.79 <sup>d</sup>	Amber
H10	Kabar	<i>Capparis spinosa</i>	Moulay Yacoub	4.01 ± 0.01 <sup>f</sup>	29.33 ± 1.76 <sup>abc</sup>	422.33 ± 2.52 <sup>f</sup>	17.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.272 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.02 <sup>a</sup>	126.09 ± 3.68 <sup>b</sup>	Dark amber
H11	Daghmos	<i>Euphorbia</i> L.	Lakhsas	3.85 ± 0.01 <sup>d</sup>	34.17 ± 0.76 <sup>abcd</sup>	562.00 ± 2.65 <sup>c</sup>	21 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.309 ± 0.001 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.02 <sup>b</sup>	161.99 ± 6.34 <sup>a</sup>	Dark amber
H12	Arbousie	<i>Arbutus unedo</i>	Chefchaouen	4.25 ± 0.01 <sup>h</sup>	36.33 ± 1.89 <sup>abcd</sup>	896.67 ± 8.50 <sup>a</sup>	21 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.507 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>ab</sup>	1.16 ± 0.01 <sup>c</sup>	109.15 ± 2.14 <sup>c</sup>	Amber

Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's multiple range test.

**2.13. Agar Well Diffusion (AWD) Assay.** The AWD assay was performed in triplicate based on the method of Kirby–Bauer [38]. With modification, Mueller Hinton agar plates are inoculated by swabbing from the standardized suspensions ( $10^8$  cfu/mL). Whatman paper discs (6 mm) are deposited on the surface of preinoculated agar. Next, the disks are impregnated with 5  $\mu$ L of EO. All plates were incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the diameters of the inhibition zones were measured.

**2.14. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).** The MICs were determined by microdilution assays in 96-well plates according to the standards of the NCCLS [39]. With modification, eight concentrations of EO and six concentrations of honey are prepared in sterile haemolysis tubes. They are carried out by successive dilutions 1/2 in distilled water ranging from 500 to 15.63 mg/ml for honeys and a mixture of Mueller Hinton (MH) and DMSO broth ranging from 10 to 0.09% for EO. The concentrations of honeys obtained in the well were between 250 and 7.81 mg/ml and between 1 and 0.009% for essential oil in such a way that the concentration of DMSO does not exceed 1% in the wells. Bacterial suspensions were prepared in the same way described previously. These suspensions were diluted in MH broth and plated in 96-well plates at a density of  $5.0 \times 10^5$  CFU well<sup>-1</sup>. Finally, different concentrations of honey and EO solutions were added to each well to determine the MIC values. After the plates were incubated at 37°C for 18, 40  $\mu$ l of 0.5% triphenyltetrazolium chloride (TTC) was added to each well. After 2 h of incubation, the MIC corresponds to the lowest concentration that does not produce red color [37].

**2.15. Checkerboard Assay.** The evaluation of interaction between honeys and EO was carried out according to the modified method of Nishio et al. [3]. Briefly, eight concentrations of EO and six concentrations of honeys were prepared in sterile tubes hemolyzed by dilutions 1/2. Then, honeys concentrations are introduced vertically into eight wells in a decreasing manner going from MIC  $\times$  2 to MIC/64, while the essential oil concentrations are introduced horizontally into seven wells in a decreasing fashion from CMI  $\times$  2 to CMI/16. The analysis of the combination was obtained by calculating the fraction inhibitory concentration index (FIC) using the following formula [26]:

$$\Sigma \text{FICI} = \text{FIC}(A) + \text{FIC}(B). \quad (2)$$

FIC(A) = (MIC(A) in combination/MIC(A) alone); FIC(B) = (MIC(B) in combination/MIC(B) alone). The index values of the fractional inhibitory concentrations are interpreted as follows: FIC  $\leq$  0.5 = Synergy; FIC < 0.5–0.75  $\geq$  partial Synergy; FIC  $\leq$  0.76–1.0  $\geq$  Additive; FIC > 1–4  $\leq$  No interaction (not differential) and FIC > 4 = Antagonism.

**2.16. Statistical Analysis.** Statistical analysis was carried out by ANOVA through the GraphPad prism 6 program and using the Tukey post hoc test at  $p < 0.05$ . Correlations between the characterizing parameters of honey samples and between the honey physicochemical parameters and the FIC of honey and EOs combinations were achieved by Pearson

correlation coefficient ( $r$ ) at a significance level of 99% ( $p < 0.01$ ). The results were also subjected to a multivariate analysis (principal component analysis). All experimental data were analyzed using MultiBiplot.

### 3. Results and Discussions

**3.1. Preliminary Characterization.** Visually, no honey sample showed signs of fermentation or granulation before physicochemical and antioxidant tests began. The results are summarized in Tables 1, 2, and 3.

Table 1 resumes the physicochemical characterization results, showing the conformity with the established standard [40], with some exceptions concerning the moisture content. The pH values of all analyzed samples ranged between  $3.66 \pm 0.01$  and  $4.48 \pm 0.01$ ; the free acidity values between  $14.67 \pm 2.08$  and  $36.33 \pm 1.89$  mEq/kg showed no sign of fermentation, as the normal value are below 50 mEq/kg [40]. The electrical conductivity correlated with the Ash content results ( $R^2 = 0.7184$ ;  $p < 0.01$ ), and the minimum value was observed in sample H8 with an electrical conductivity value of  $181.13 \pm 0.25$   $\mu$ S/cm and an Ash content value of  $0.187 \pm 0.003\%$ , while sample H12 showed the highest value of both parameters  $896.67 \pm 8.50$   $\mu$ S/cm and  $0.507 \pm 0.003\%$  for electrical conductivity and Ash content, respectively. This sample exceeded the value of 800  $\mu$ S/cm established as the maximum value suitable for honey samples [41], which may be due to the richness of this honey in minerals. Electrical conductivity is considered as a very important parameter for determining the botanical origin of honey and thus differentiating between the honey of the nectar and that of the honeydew [42].

As mentioned before, samples H11 and H12 showed higher moisture content values ( $21 \pm 0.2\%$  and  $21 \pm 0.1\%$ , resp.) than 20%, the maximum suitable for honey samples [27, 41]. Such increase may allow undesirable fermentation of honey by osmotolerant yeasts, which leads to the production of carbon dioxide and ethyl alcohol, which in turn oxidizes to acetic acid and water that are responsible for the bitter taste of honey [43]. Otherwise the remaining samples were within the norms, and a minimum value ( $15 \pm 0.1\%$ ) was seen in sample H1.

Honey color is an indicator of the presence of compounds, such as phenols, terpenes, and carotenoids [28]. Such result was obtained in the analyzed samples of the present study, and the color correlated positively the phenols, flavonoids, and flavonol contents ( $r = 0.9378$ ;  $p < 0.01$ ,  $r = 0.9428$ ;  $p < 0.01$ ,  $r = 0.9336$ ;  $p < 0.01$ , resp.). Honey varies between light white and amber colors and strongly correlated with melanoidin content ( $r = 0.9196$ ;  $p < 0.01$ ), confirming their participation in the resulting honey color [28, 29]. Detailed correlations between the analyzed parameters were illustrated in Table 7.

Table 2 shows the results obtained for mineral content of six Palestinian and six Moroccan honey samples. The potassium was the most abundant species in all the analyzed samples, with values ranging between  $171.48 \pm 0.50$  in sample H6 and  $2270.32 \pm 0.29$  mg/kg in sample H3. The sodium was the second most abundant, and varies between



TABLE 2: Mineral content of honey samples.

Sample code	Potassium (mg/kg)	Sodium (mg/kg)	Calcium (mg/kg)	Magnesium (mg/kg)	Na + K +Ca + Mg (mg/kg)
H1	926.01 ± 0.90 <sup>d</sup>	106.12 ± 0.9 <sup>k</sup>	154.55 ± 5.28 <sup>f</sup>	27.73 ± 0.32 <sup>e</sup>	1214.41
H2	955.88 ± 1.14 <sup>c</sup>	159.28 ± 0.29 <sup>g</sup>	145.77 ± 1.13 <sup>g</sup>	15.42 ± 0.42 <sup>gh</sup>	1276.35
H3	2270.32 ± 0.29 <sup>a</sup>	213.55 ± 0.40 <sup>c</sup>	173.84 ± 1.95 <sup>d</sup>	42.54 ± 0.55 <sup>c</sup>	2700.25
H4	367.12 ± 0.96 <sup>i</sup>	156.43 ± 0.45 <sup>h</sup>	126.42 ± 1.07 <sup>hi</sup>	14.44 ± 1.23 <sup>gh</sup>	663.9
H5	576.86 ± 0.43 <sup>g</sup>	176.7 ± 0.26 <sup>f</sup>	133.46 ± 3.01 <sup>h</sup>	24.50 ± 0.20 <sup>f</sup>	911.52
H6	171.48 ± 0.50 <sup>k</sup>	59.79 ± 0.1 <sup>m</sup>	129.49 ± 1.1 <sup>h</sup>	9.81 ± 0.39	370.57
H7	830.26 ± 1.52 <sup>e</sup>	256.64 ± 0.28 <sup>b</sup>	166.19 ± 0.85 <sup>e</sup>	62.17 ± 0.92 <sup>b</sup>	1315.26
H8	424.24 ± 0.41 <sup>h</sup>	114.74 ± 0.44 <sup>i</sup>	79.35 ± 4.04 <sup>j</sup>	25.76 ± 0.56 <sup>f</sup>	644.55
H9	286.78 ± 1.21 <sup>j</sup>	111.16 ± 1.27 <sup>j</sup>	25.98 ± 0.22 <sup>k</sup>	17.44 ± 0.05 <sup>g</sup>	458.8
H10	598.43 ± 0.39 <sup>f</sup>	75.39 ± 0.20 <sup>l</sup>	188.50 ± 1.32 <sup>c</sup>	15.69 ± 0.46 <sup>g</sup>	878.01
H11	579.75 ± 2.17 <sup>g</sup>	179.77 ± 0.06 <sup>d</sup>	262.57 ± 1.73 <sup>b</sup>	35.16 ± 0.84 <sup>d</sup>	1054.75
H12	1723.20 ± 1.21 <sup>b</sup>	285.67 ± 0.20 <sup>a</sup>	345.92 ± 1.07 <sup>a</sup>	77.53 ± 0.58 <sup>a</sup>	2432.32

Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's multiple range test.

TABLE 3: Bioactive compounds estimations and antioxidant activities of honey samples.

Sample code	Phenols (mg GAE/100 g)	Flavonoids (mg QE/100 g)	Flavonol (mg QE/100 g)	TAC (mg AA/g)	DPPH (IC50 = mg/mL)	Reducing power (IC50 = mg/mL)
H1	32.49 ± 0.08 <sup>de</sup>	13.43 ± 0.16 <sup>e</sup>	6.07 ± 0.04 <sup>de</sup>	145.13 ± 8.85 <sup>a</sup>	20.88 ± 0.36 <sup>d</sup>	4.18 ± 0.70 <sup>ab</sup>
H2	33.20 ± 0.29 <sup>de</sup>	9.39 ± 0.02 <sup>efg</sup>	8.86 ± 0.14 <sup>d</sup>	134.46 ± 5.94 <sup>ab</sup>	31.74 ± 0.31 <sup>ef</sup>	3.15 ± 0.64 <sup>a</sup>
H3	42.13 ± 2.17 <sup>d</sup>	12.72 ± 0.28 <sup>ef</sup>	7.93 ± 0.49 <sup>d</sup>	142.87 ± 7.15 <sup>a</sup>	26.36 ± 0.25 <sup>e</sup>	3.05 ± 0.08 <sup>a</sup>
H4	17.97 ± 0.98 <sup>f</sup>	2.86 ± 1.33 <sup>i</sup>	1.34 ± 0.04 <sup>e</sup>	134.61 ± 9.12 <sup>ab</sup>	89.49 ± 1.03 <sup>g</sup>	5.55 ± 0.36 <sup>abc</sup>
H5	42.66 ± 2.24 <sup>d</sup>	17.19 ± 1.36 <sup>e</sup>	7.69 ± 0.22 <sup>d</sup>	140.32 ± 4.62 <sup>a</sup>	26.09 ± 0.58 <sup>e</sup>	6.06 ± 0.33 <sup>abc</sup>
H6	37.50 ± 2.07 <sup>d</sup>	7.47 ± 0.35 <sup>efg</sup>	6.67 ± 0.04 <sup>de</sup>	153.94 ± 5.62 <sup>a</sup>	38.09 ± 0.26 <sup>f</sup>	6.60 ± 0.25 <sup>abc</sup>
H7	74.05 ± 1.21 <sup>b</sup>	59.33 ± 1.07 <sup>a</sup>	15.08 ± 0.04 <sup>b</sup>	163.51 ± 8.55 <sup>a</sup>	10.85 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.97 <sup>a</sup>
H8	12.91 ± 0.85 <sup>f</sup>	ND	ND	148.13 ± 4.17 <sup>a</sup>	91.46 ± 1.91 <sup>g</sup>	13.06 ± 0.65 <sup>d</sup>
H9	89.53 ± 4.05 <sup>a</sup>	46.52 ± 0.56 <sup>b</sup>	18.14 ± 0.90 <sup>a</sup>	181.43 ± 9.89 <sup>a</sup>	16.84 ± 0.68 <sup>c</sup>	1.82 ± 0.19 <sup>a</sup>
H10	86.66 ± 1.31 <sup>a</sup>	50.41 ± 0.54 <sup>b</sup>	17.94 ± 0.20 <sup>a</sup>	158.90 ± 4.99 <sup>a</sup>	21.23 ± 0.18 <sup>d</sup>	3.54 ± 1.05 <sup>a</sup>
H11	64.54 ± 2.13 <sup>c</sup>	42.30 ± 0.07 <sup>bc</sup>	15.50 ± 0.56 <sup>b</sup>	143.83 ± 2.30 <sup>a</sup>	29.36 ± 0.96 <sup>ef</sup>	3.81 ± 0.02 <sup>ab</sup>
H12	78.45 ± 1.24 <sup>b</sup>	45.70 ± 2.29 <sup>bc</sup>	12.54 ± 0.33 <sup>c</sup>	133.76 ± 3.45 <sup>ab</sup>	5.61 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.04 <sup>a</sup>

Values in the same column followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) by Tukey's multiple range test; ND: not determined.

59.79 ± 0.1 mg/kg and 285.67 ± 0.2 mg/kg, followed by calcium content 25.98 ± 0.22 mg/kg and 345.92 ± 1.07 mg/kg. The magnesium content was the less value amongst the analyzed minerals, which varies from a minimum value of 9.81 ± 0.39 mg/kg to a maximum of 77.53 ± 0.58 mg/kg. The richness of honey in minerals is a widely used parameter in determining the botanical and geographical origins of honey [44]. All values found in the samples were within the ranges reported for honeys by other studies [10, 45, 46].

**3.2. Antioxidant and Antibacterial Activities.** The determination of the antioxidant profile of the twelve honey samples was studied using six assays, and the results were summarized in Table 3, while the correlations with the phenolic, flavonoids, and flavonols contents were illustrated in Table 3. The total phenolic content values ranged from 12.91 ± 0.85 mg GAE/100 g in H8 to 89.53 ± 4.05 mg GAE/100 g in H9. For flavonoid content, the highest value was detected in H10

(50.41 ± 0.54 mg QE/100 g), and the minimum value was observed in sample H4 (2.86 ± 1.33 mg QE/100 g). Samples H4 and H10 conserved their order concerning the flavonol content and showed values of 1.34 ± 0.04 mg QE/100 g and 18.14 ± 0.90 mg QE/100 g, respectively. It has to be mentioned that sample H8, presenting the lowest content of phenolic composition, did not have a detectible level of flavonoids and flavonols, using the protocols described in Materials and Methods. Many authors have studied the content of phenolic compounds of honey and have suggested that its levels depend on the floral and geographical origins [47]. Correlations between phenols, melanoidins, and flavonoids may be attributed to the fact that all these compounds absorb light in the visible range, as previously reported by Aazza et al. [45]. In the present work phenolic content correlated positively with the flavonoids and flavonols contents ( $r = 0.9408$ ;  $p < 0.0001$  and  $r = 0.9538$ ;  $p < 0.0001$ , respectively). The total antioxidant activity, expressed as mg of ascorbic

TABLE 4: Diameters of the inhibition zones (mm) generated by EO of *Origanum vulgare* L. against different bacterial strains.

Sample code	<i>E. coli</i> BLSE (ATB: 87) BGN	<i>E. coli</i> (ATB: 57) B6N	<i>E. coli</i> (ATB: 97) BGM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
EO	51.25 ± 1.41	32.5 ± 3.54	33.5 ± 3.54	13.25 ± 1.77	40.25 ± 6.01	46 ± 1.41
MIC (%)	0.125	0.125	0.5	0.5	1	1

EO: essential oil,  $n = 3$ .

acid equivalent/g honey (AAE) exceeded in samples H9 with a value of  $181.43 \pm 9.89$  mg AAE/100 g and had the minimum value in sample H12 ( $133.76 \pm 3.45$  mg AAE/100 g). The sample H12 has also the best ability to scavenge the free radicals in the DPPH assay and to reduce the ferulic ions in the reducing power assay, with values  $IC_{50} = 5.61 \pm 0.18$  mg/mL and  $IC_{50} = 3.35 \pm 0.04$  mg/mL, respectively. The remaining samples had antioxidant activity that positively correlated with the phenolic content ( $r = -0.7570$ ;  $p < 0.01$  for DPPH activity, and  $r = -0.6014$ ;  $p < 0.05$ ).

The antibacterial activity of honeys was accomplished by the MICs assay. All honey samples revealed a positive result against the test pathogens. Table 5 summarized the data of MICs of each honey sample against test bacterial strain. The MIC values of honeys ranged from 62.5 mg/ml to 250 mg/ml on six strains. Amongst the test bacterial strains, *Staphylococcus aureus* was the most sensitive and *Streptococcus faecalis* was most resistant. The results of MICs reported in this study are higher than those reported by Bouhlali et al. [48] and Mandal et al. [49], but similar to the results of MICs reported by Boukraa who found the MICs of honey ranging from 6% to 25% for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* [50]. The major antimicrobial properties of honey are known to be governed by the hydrogen peroxide levels, as well as the nonperoxide factors that contribute to honey antibacterial and antioxidant activity (phenolic acids and flavonoids) [14, 15]. Studies have shown that the antibacterial activity varies according to the phytogeographical region and then the production of the different compositions [16, 51]; more recent studies reported the presence of other antimicrobial components, namely, antimicrobial peptide Bee defensin-1, HMF, and methylglyoxal (MGO), but also phenolic compounds such as flavonoids [3].

In our study, the used essential oil of *Origanum vulgare* L. in the agar diffusion assay against the Gram-negative and Gram-positive bacterial strains studied gave a diameter of inhibition of  $51.25 \pm 1.41$  mm with *Escherichia coli* of serotype 87, A diameter of  $46 \pm 1.41$  mm with *Staphylococcus aureus*, a diameter of  $40.25 \pm 6.01$  mm with *Streptococcus faecalis*, a diameter of  $33.5 \pm 3.54$  mm with *Escherichia coli* serotype 97, and a diameter of  $32.5 \pm 3.54$  mm with *Escherichia coli* serotype 57 and finally the most small diameter of inhibition was that with *Pseudomonas aeruginosa*  $13.25 \pm 1.77$  mm. The determination of the MICs of essential oil on different bacteria strains showed that Gram-negative strains are more sensitive than Gram-positive bacteria (Table 4).

**3.3. Antimicrobial Activity of Combination of Honey Samples and *Origanum vulgare* L. Essential Oil.** The test used was the checkerboard assay in order to measure the inhibitory activity

of the mixture by determining the fractional inhibitory concentration (FIC). Table 6 shows the twelve honey samples tested against six strains in combination with the essential oil. The Fractional inhibitory concentration (FIC) was used to evaluate the synergistic activity. From 72 combinations, 3 (4.16%) had total synergism, 27 (37.5%) showed a partial synergistic and additive interaction, 38 (52.77%) had no interaction, and 4 (4.44%) had no effect on bacteria strains. The best synergistic effect was obtained with the combination of essential oil and H11 honey sample; this effect was observed on two bacteria (*Escherichia coli* (ATB: 97) and *Streptococcus faecalis*) with FIC values being 0.312 and 0.156, respectively, and the combination of essential oil and H1 honey sample on *Streptococcus faecalis* with FIC values was 0.31.

Combining honey with essential oil reduces the MICs of the honeys 1–4-fold and 1–8-fold for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. The weakest synergism was obtained with essential oil-honey against *Escherichia coli* (ATB: 57) with FIC ranging from 0.75 to 2.25. Several studies have shown the interaction between honey and other substances [25, 50, 52]; in all of these studies it is found that there are positive interactions using the isobolograms method, but these can be considered additives according to fractional inhibitory concentration index (FIC) [53]. This synergistic interaction appeared to be due to different mechanisms which included inhibition of protective enzymes and sequential inhibition of common biochemical pathways [54].

**3.4. Correlations and Multivariate Analysis.** Honey samples distribution and homogeneity based on their physicochemical parameters were studied using principal component analysis, as a powerful tool for the chemometric analysis [55]. The results were illustrated in Figure 1(a). The first component explained 48.84% and represented in its positive part color, phenolic compounds, and flavonoids, while DPPH  $IC_{50}$  and the reducing power were the dominating parameters in the negative part. The second principal component explained 17.20% of the given data and represented mainly the TAC activity in the negative part and the conductivity, Ash content, and mineral composition in the positive part.

Based on the used parameters, a good geographical discrimination was made between the Palestinians and Moroccan honey samples, which were discriminated by the first component. H8 originating from Morocco was the only exception and was misloaded with the Palestinian samples. Moroccan honey samples were in the right part of the plot and characterized by their homogeneity in terms of polyphenol, flavonoids, and flavonols, which implicated the positive correlation with colors, melanoidins estimations, and negatively the  $IC_{50}$  of DPPH activity. Those samples had also the highest value

TABLE 5: MICs values of honey samples used individually or in combination against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Sample code	<i>Escherichia coli</i> BLSE (ATB: 87) BGN		<i>Escherichia coli</i> (ATB: 57) B6N		<i>Escherichia coli</i> (ATB: 97) BGM		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Streptococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	MIC alone	MIC combined	MIC alone	MIC combined	MIC alone	MIC combined	MIC alone	MIC combined	MIC alone	MIC combined	MIC alone	MIC combined
H1	125	62.5	250	125	250	125	125	125	250	62.5	125	125
H2	62.5	62.5	125	125	250	125	125	62.5	250	125	62.5	31.25
H3	125	62.5	250	125	250	125	125	125	250	125	62.5	125
H4	125	125	125	250	250	250	125	125	250	250	125	125
H5	250	250	125	250	-	250	250	250	250	250	-	-
H6	125	125	125	250	250	250	250	125	250	250	125	125
H7	125	250	125	125	250	250	125	62.5	250	125	62.5	31.25
H8	125	250	125	250	-	250	250	250	-	-	250	250
H9	125	62.5	125	125	250	250	125	125	250	125	62.5	125
H10	125	62.5	125	125	250	125	125	62.5	250	125	62.5	31.25
H11	125	62.5	125	125	250	62.5	125	125	250	31.25	62.5	125
H12	250	250	250	125	250	250	250	250	250	125	250	125

H1-H12 honeys; MIC was defined as 99% bacteriostatic effects; n = 3, - = Not effective.

TABLE 6: Honey-EO interaction evaluation using the FIC.

Sample code	<i>Escherichia coli</i> BLSE (ATB: 87) BGN		<i>Escherichia coli</i> (ATB: 57) B6N		<i>Escherichia coli</i> (ATB: 97) BGM		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Streptococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	FIC	Interaction	FIC	Interaction	FIC	Interaction	FIC	Interaction	FIC	Interaction	FIC	Interaction
H1	1	A	1	A	0.625	PS	0.625	PS	0.3125	S	1.125	NI
H2	1.5	NI	1.5	NI	0.75	PS	0.75	A	0.5625	PS	0.625	PS
H3	1	A	1	A	0.625	PS	1.25	NI	0.5625	PS	2.0625	NI
H4	1.5	NI	2.5	NI	1.5	NI	1.25	NI	1.03125	NI	1.0625	NI
H5	1.5	NI	2.25	NI	-	-	1.5	NI	1.0625	NI	-	-
H6	1.5	NI	2.5	NI	1.125	NI	0.75	PS	1.03125	NI	1.125	NI
H7	2.5	NI	1.25	NI	1.25	NI	0.625	PS	0.53125	PS	0.531	PS
H8	2.5	NI	3	NI	-	-	1.25	NI	-	-	1.125	NI
H9	1	A	1.5	NI	1.5	NI	1.25	NI	0.5625	PS	2.125	NI
H10	1	A	1.5	NI	0.625	PS	0.625	PS	0.5625	PS	0.5625	PS
H11	1	A	1.5	NI	0.312	S	1.25	NI	0.15625	S	2.0625	NI
H12	1.5	NI	0.75	PS	1.125	NI	1.25	NI	0.53125	PS	0.5625	PS

FIC was the fractional inhibitory concentration; S = synergy, PS = partial synergy, A = additive, NI = no interaction, and - = not effective.

TABLE 7: Pearson correlation coefficients between the assessed physicochemical parameters of honey samples.

	Phenols	Flavonoids	Flavonol	TAC	DPPH	Reducing power	Color	Melanoidin	Electrical conductivity	Ash
Phenols	1	0.9408****	0.9538****	0.5915*	-0.7570**	-0.6014*	0.9378****	0.9444****	-	-
Flavonoids	0.9408****	1	0.9202****	-	-0.6400*	-	0.9428****	0.8714****	-	-
Flavonol	0.9538****	0.9202****	1	0.6682*	-0.6138*	-	0.9336****	0.9780****	-	-
TAC	0.5915*	-	0.6682*	1	-	-	-	-	-	-
Color	0.9378****	0.9428****	0.9336****	-	-0.7105**	-	1	0.9196****	-	-
Melanoidin	0.9444****	0.8714****	0.9780****	-	-0.7174**	-0.6169*	0.9196****	1	-	-
Electrical conductivity	-	-	-	-	-0.6627*	-	-	-	1	0.7184**
Ash	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7184**	1

\*Correlation is significant at the  $p < 0.05$  level. \*\* Correlation is significant at the  $p < 0.01$  level. \*\*\* Correlation is significant at the  $p < 0.005$  level. \*\*\*\* Correlation is significant at the  $p < 0.0001$  level. -: Not significant.

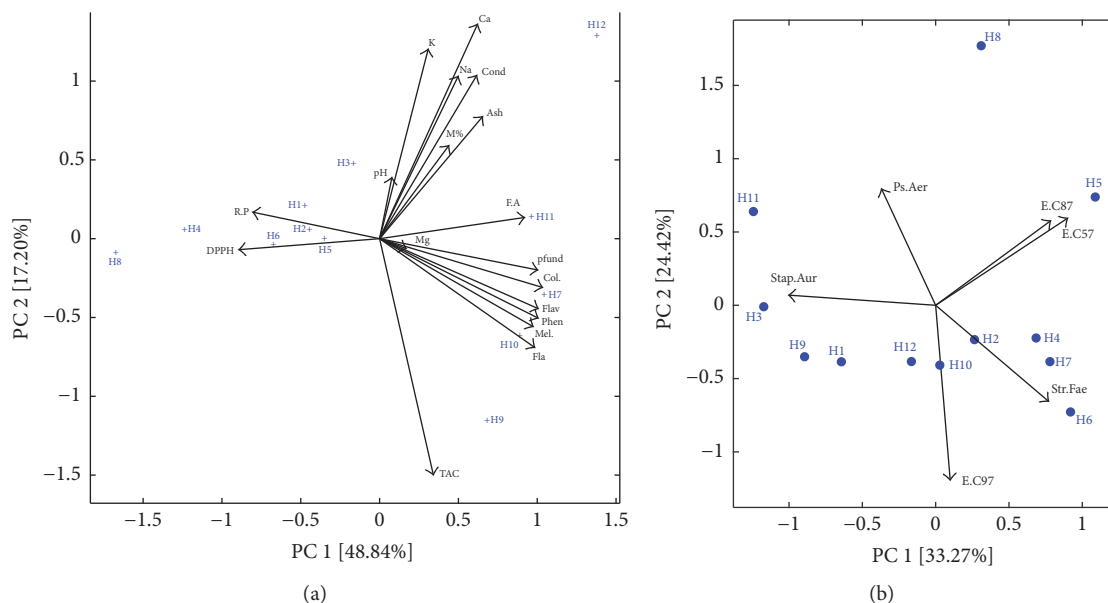


FIGURE 1: Principal component analysis (PCA). (a) Biplots of the analyzed honey samples using the physicochemical parameters as an input. K: potassium; Na: sodium; Ca: calcium; Mg: magnesium; pH; DPPH; M: moisture; Cond: conductivity; Ash; pfund; Col: color; Fla: flavonoid; Fla: flavonol; Phen: phenol; TAC; Mel: melanoidin. (b) PCA biplot of the analyzed honey samples using the resulting FIC of combining honeys with EO as an input. E. C87: *Escherichia coli* BLSE (ATB: 87) BGN; E. C57: *Escherichia coli* (ATB: 57) B6N; E. C97: *Escherichia coli* (ATB: 97) BGM; Stap. Aur: *Staphylococcus aureus*; Ps. Aer: *Pseudomonas aeruginosa*; Str. Fae: *Streptococcus faecalis*.

TABLE 8: Pearson correlation coefficients between the honey physicochemical parameters and the FIC of the combinations.

	FIC <i>Escherichia coli</i> BLSE (ATB: 87) BGN	FIC <i>Escherichia coli</i> (ATB: 57)	FIC <i>Escherichia coli</i> (ATB: 97)	FIC <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	FIC <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	FIC <i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>
Free acidity	-	-0.641*	-	-	-	-
Phenols	-	-0.593*	-	-	-	-
Melanoidin	-	-0.584*	-	-	-	-0.607*
Mineral content	-	-0.711**	-	-	-	-

\*Correlation is significant at the  $p < 0.05$  level. \*\*Correlation is significant at the  $p < 0.01$  level. Correlation is significant at the  $p < 0.005$  level. Correlation is significant at the  $p < 0.0001$  level, -: not significant.

of the minerals contents, which was also reflected by the Ash content and electrical conductivity. Palestinians samples were in the opposite side of the plot and correlated with the reducing power.

The use of the resulting FIC values after combining both honey samples and the EO to run the PCA showed little effect of the geographical origin (Figure 1(b)). Each of the two main clusters was a mixture of samples belonging to both geographical origins and was discriminated by the first principal component, which conserved 33.27% of the given data. The first cluster (the orange shadow area) was formed by honey samples H1 and H2 from Palestine, and samples H9 and H12 from Morocco. The cluster was loaded in the negative part of the first principal component linking the gained FIC value against *Staphylococcus aureus* after the combination. The second cluster was in the right part of the plot linking the FIC values against *Streptococcus faecalis*.

Despite their botanic origin, samples originating from Morocco presented high amounts of mineral content, and so, high Ash content and electrical conductivity, except for sample H8. The same phenomenon was observed in their phenols, flavonoids, and flavonols contents, which also explained their high antioxidant activity. The observation made about the minerals content can be explained by their different geographical origins, as it is well known in the literature [44]. Bioactive compounds content or the antioxidant activities are more likely to be influenced by the botanic origin of honey samples [56].

Considering the investigation of the effect of physicochemical parameters of honey sample on the final activity, after combination with the EO, correlation study between the assessed parameters and the FIC of the combination of each honey sample was made, and the results were illustrated in Table 8. The melanoidins content was showed to be positively

TABLE 9: Pearson correlation coefficients between MICs of honey samples and the FIC of the combinations.

	FIC <i>Escherichia coli</i> BLSE (ATB: 87) BGN	FIC <i>Escherichia coli</i> (ATB: 57)	FIC <i>Escherichia coli</i> (ATB: 97)	FIC <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	FIC <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	FIC <i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>
MICs of honeys on <i>Escherichia coli</i> BLSE (ATB: 87) BGN	0.0242					
MICs of honeys on <i>Escherichia coli</i> (ATB: 57)		-0.6564*				
MICs of honeys on <i>Escherichia coli</i> (ATB: 97)			0.04684			
MICs of honeys on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				0.3197		
MICs of honeys on <i>Staphylococcus aureus</i>					0.5543	
MICs of honeys on <i>Streptococcus faecalis</i>						-0.02040

\*Correlation is significant at the  $p < 0.05$  level. Correlation is significant at the  $p < 0.01$  level. Correlation is significant at the  $p < 0.005$  level. Correlation is significant at the  $p < 0.0001$  level. Not significant.

influencing the gained antibacterial activity after the combination with EO, and its values presented negative correlation with the FIC values against *Escherichia coli* (ATB: 57), and *Streptococcus faecalis* ( $p < 0.05$ ). The resulting FIC against the same bacterial strains was positively influenced by the phenolic content, but a significant negative correlation was only seen in the case *Escherichia coli* (ATB: 57). Negative correlations were also seen between the FIC against *Escherichia coli* (ATB: 57) from one side, and the electrical conductivity ( $p < 0.05$ ) and the mineral content ( $p < 0.01$ ) from the other side. The free acidity had a significant ( $p < 0.05$ ) positive effect on the gained FICI against *Escherichia coli* (ATB: 57).

The reported correlations may indicate a specific pathway of honey effect on the bacterial strains. Previous studies reported the importance of melanoidins and phenolic contents on honey antimicrobial activity and include them in the nonperoxide way [14, 15].

To investigate the effect of the initial activity against a bacterial strain on the gained interaction after the combination with the EO, correlation study was accomplished, and the results are illustrated in Table 9. In general, no significant influence was recorded. The initial honey activity against *Escherichia coli* (ATB: 97) seems to have a significant influence on the resulting activity after the combination with EO. A significant ( $p < 0.05$ ) negative correlation was obtained between the MICs of honey samples against *Escherichia coli* (ATB: 97), and the FIC of the combination against the same bacterial strain.

#### 4. Conclusion

Boosting the antimicrobial effect of honey using essential oils seems to be a promising way to investigate new pathways in the development of new antimicrobial drugs. The present work showed a synergetic effect after mixing both natural products and revealed a possible influence of honey physicochemical properties, namely, the melanoidins, phenolic contents, and the free acidity.

The observed interactions are influenced by the botanic origin of honey, and the used bacterial strains, which suggest the necessity of extending the research to investigate more honey samples and bacterial strains. In addition maximum characterizing parameters need to be probed to allow a clearer image about the possible influencing factors.

#### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### References

- [1] World Health Organization (WHO), *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, World Health Organization (WHO), 2014, <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/>.
- [2] World Health Organization (WHO), *A Global Health Guardian: Climate Change, Air Pollution And Antimicrobial Resistance*, 2017, <http://www.who.int/publications/10-year-review/chapter-guardian.pdf?ua=1>.
- [3] E. K. Nishio, J. M. Ribeiro, A. G. Oliveira et al., "Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807," *Scientific Reports*, vol. 6, 2016.
- [4] A. R. M. Coates and Y. Hu, "Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections," *British Journal of Pharmacology*, vol. 152, no. 8, pp. 1147–1154, 2007.
- [5] C. Valgas, S. M. de Souza, E. F. A. Smânia, and A. Smânia Jr., "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 38, no. 2, pp. 369–380, 2007.
- [6] F. Abdellah, L. Boukraâ, H. S. Mohamed, H. A. Alzahrani, and B. Bakhotmah, "Synergistic effect of Honey and *Thymus ciliatus* against pathogenic bacteria," *The Open Nutraceuticals Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 174–178, 2012.
- [7] N. S. Al-Waili, K. Salom, G. Butler, and A. A. Al Ghamdi, "Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control," *Journal of Medicinal Food*, vol. 14, no. 10, pp. 1079–1096, 2011.
- [8] R. A. Cooper, P. C. Molan, and K. G. Harding, "Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds," *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 92, no. 6, pp. 283–285, 1999.
- [9] M. I. Zainol, K. Mohd Yusoff, and M. Y. Mohd Yusof, "Antibacterial activity of selected Malaysian honey," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article no. 129, 2013.
- [10] S. Aazza, B. Lyoussi, D. Antunes, and M. G. Miguel, "Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial portuguese honeys," *Journal of Food Science*, vol. 78, no. 8, pp. C1159–C1165, 2013.
- [11] Y.-T. Khoo, A. S. Halim, K.-K. B.-K. Singh, and N.-A. Mohamad, "Wound contraction effects and antibacterial properties of *Tualang* honey on full-thickness burn wounds in rats in comparison to hydrofibre," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 10, article 48, 2010.
- [12] P. C. Molan, "The antibacterial properties of honey," *Chemistry in New Zealand Journal*, vol. 59, pp. 10–14, 1995.
- [13] H. A. L. Wahdan, "Causes of the antimicrobial activity of honey," *Infection*, vol. 26, no. 1, pp. 26–31, 1998.
- [14] G. Montenegro and E. Mejías, "Biological applications of honeys produced by *Apis mellifera*," *Biological Research*, vol. 46, no. 4, pp. 341–345, 2013.
- [15] O. E. Adeleke, J. O. Olaitan, and Okpekpe E. I., "Comparative antibacterial activity of honey and gentamicina gainst *Escherichiacoli* and *Pseudomonas aeruginosa*," *Annals Burns Fire Disasters.19*, pp. 201–204, 2006.
- [16] H. A. Alzahrani, R. Alsabehi, L. Boukraâ, F. Abdellah, Y. Bellik, and B. A. Bakhotmah, "Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins," *Molecules*, vol. 17, no. 9, pp. 10540–10549, 2012.
- [17] O. Sherlock, A. Dolan, R. Athman et al., "Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 10, article 47, 2010.
- [18] M. Hyldgaard, T. Mygind, and R. L. Meyer, "Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components," *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, no. 12, pp. 1–24, 2012.
- [19] S.-I. Kim, J.-Y. Roh, D.-H. Kim, H.-S. Lee, and Y.-J. Ahn, "Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential



- oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*," *Journal of Stored Products Research*, vol. 39, no. 3, pp. 293–303, 2003.
- [20] E. L. De Souza, T. L. M. Stamford, E. D. O. Lima, J. M. Barbosa Filho, and M. O. M. Marques, "Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil," *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 28, no. 2, pp. 418–422, 2008.
- [21] A. Béjaoui, B. Abdennacer, and B. Mohamed, "Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 7, no. 32, pp. 2429–2435, 2013.
- [22] A. Brochot, A. Guilbot, L. Haddioui, and C. Roques, "Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends," *MicrobiologyOpen*, vol. 6, no. 4, Article ID e00459, 2017.
- [23] M. Kacániová, N. Vukovic, L. Hleba, A. Bobková, A. Pavelková, and RovnáK., "Arpáová H, Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare*L. and *Thymus vulgaris*essential oils," *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 263–271, 2012.
- [24] S. O. Oyedemi, A. I. Okoh, L. V. Mabinya, G. Pirochenva, and A. J. Afolayan, "The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*," *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 7, pp. 1280–1286, 2009.
- [25] H. LaïdBoukraâ, A. Hasan, B. FatihaAbdellah et al., "Synergistic effect of monofloral honeys and essential oils against *Pseudomonas aeruginosa*," *British Microbiology Research Journal*, vol. 3, no. 4, pp. 564–573, 2013.
- [26] E. O. Khay, A. Bouyahya, K. El Issaoui, S. Zinebi, and J. Abrini, "Study of Synergy between *Mentha pulegium* Essential Oil, Honey and Bacteriocin-like Inhibitory Substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12," *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, vol. 3, no. 11, pp. 29–35, 2016.
- [27] S. Bogdanov, "Harmonized Methods of the International Honey Commission," 2002, <http://www.ihc-platform.net/ihc-methods2009.pdf>.
- [28] O. A. Naab, M. A. Tamame, and M. A. Caccavari, "Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina," *Spanish Journal of Agricultural Research*, vol. 6, no. 4, pp. 566–576, 2008.
- [29] K. Brudzynski and D. Miotto, "Honey melanoidins: analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity," *Food Chemistry*, vol. 127, no. 3, pp. 1023–1030, 2011.
- [30] A. Terrab, A. F. Recamales, D. Hernanz, and F. J. Heredia, "Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents," *Food Chemistry*, vol. 88, no. 4, pp. 537–542, 2004.
- [31] V. Singleton and J. A. Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, 1965.
- [32] T. Samatha, R. Shyamsundarachary, P. Srinivas, and N. R. Swamy, "Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *Oroxylum indicum* L.Kurz," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 5, no. 4, pp. 177–179, 2012.
- [33] S. Engoor, S. Mangalanandan, H.-C. Paul, and M.-S. Jagathala, "In vitro antioxidant, anti-lipid peroxidation activities and HPLC analysis of methanol extracts from bark and stem of *Mahonia leschenaultia* takeda," *Asian Journal of Plant Science and Research*, vol. 3, no. 2, pp. 116–126, 2013.
- [34] P. Prieto, M. Pineda, and M. Aguilar, "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E," *Analytical Biochemistry*, vol. 269, no. 2, pp. 337–341, 1999.
- [35] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.
- [36] M. Oyaizu, "Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine," *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, vol. 44, pp. 307–315, 1986.
- [37] D. Dimitrijević, "Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts from leaves and roots of *Jovibarba heuffelii* (Schott.) A. Löve and D. Löve," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, no. 33, 2012.
- [38] L. Gary and A. Furtado, "Single-Disk Diffusion Testing (Kirby-Bauer) of Susceptibility of *Proteus mirabilis* to Chloramphenicol: Significance of the Intermediate Category," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 14, no. 2, pp. 550–553, 1980.
- [39] National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Document M100-S11 ,Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, National committee for clinical laboratory Standard, Wayne, PA, USA, 2003.
- [40] EU Council, "Council directive 2001/11 O/EC of 20 December 2001 relating to honey," *Official Journal of European Communities*, vol. 10, pp. 47–52, 2002.
- [41] C. Codex Alimentarius, "Revised Codex Standard for Honey," Codex STAN 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2, (2001).
- [42] S. Bogdanov, K. Ruoff, and L. P. Oddo, "Physico—chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review," *Apidologie*, vol. 35, supplement 1, pp. S4–S17, 2004.
- [43] J. Chirife, M. C. Zamora, and A. Motto, "The correlation between water activity and % moisture in honey: fundamental aspects and application to Argentine honeys," *Journal of Food Engineering*, vol. 72, no. 3, pp. 287–292, 2006.
- [44] E. Anklam, "A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey," *Food Chemistry*, vol. 63, no. 4, pp. 549–562, 1998.
- [45] S. Aazza, B. Lyoussi, D. Antunes, and M. G. Miguel, "Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys," *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 65, no. 4, pp. 449–457, 2014.
- [46] M. L. González-Miret, A. Terrab, D. Hernanz, M. Á. Fernández-Recamales, and F. J. Heredia, "Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 7, pp. 2574–2580, 2005.
- [47] J. Bertoneclj, U. Doberšek, M. Jamnik, and T. Golob, "Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey," *Food Chemistry*, vol. 105, no. 2, pp. 822–828, 2007.
- [48] E. D. T. Bouhlali, M. Bammou, K. Sellam, M. Benlyas, C. Alem, and Y. Filali-Zegzouti, "Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties," *Journal of King Saud University - Science*, vol. 28, no. 2, pp. 136–142, 2016.

- [49] S. Mandal, M. DebMandal, N. K. Pal, and K. Saha, "Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar Typhi," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 3, no. 12, pp. 961–964, 2010.
- [50] L. Boukraa, "Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*," *Alternative Medicine Review*, vol. 13, no. 4, pp. 330–333, 2008.
- [51] E. Stawiarz and A. Wróblewska, "Melissopalynological analysis of multifloral honeys from the sandomierska upland area of Poland," *Journal of Apicultural Science*, vol. 54, no. 1, pp. 65–75, 2010.
- [52] N. Al-Waili, A. Al-Ghamdi, M. J. Ansari, Y. Al-Attal, and K. Salom, "Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* and *Candida Albicans* isolates in single and polymicrobial cultures," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 9, no. 9, pp. 793–800, 2012.
- [53] N.-X. Chin, I. Weitzman, and P. Della-Latta, "In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 4, pp. 850–852, 1997.
- [54] L. Ait Dra, M. Ait Sidi Brahim, B. Boualy et al., "Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics," *Industrial Crops and Products*, vol. 109, pp. 746–752, 2017.
- [55] M. Forina, S. Lanteri, and C. Armanino, "Chemometrics in food chemistry," in *Chemometrics and Species Identification*, vol. 141 of *Topics in Current Chemistry*, pp. 91–143, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany, 1987.
- [56] O. Escuredo, M. C. Seijo, and M. Fernández-González, "Descriptive analysis of *Rubus* honey from the north-west of Spain," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 46, no. 11, pp. 2329–2336, 2011.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<https://www.hindawi.com>



## ORIGINAL RESEARCH

# Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples

Hamada Imtara | Youssef Elamine | Badiâa Lyoussi 

Faculty of Sciences, Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environmental Health, Dhar El Mehraz, BP 1796 Atlas, University Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fez, Morocco

**Correspondence**

Badiâa Lyoussi, Faculty of Sciences, Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environmental Health, Dhar El Mehraz, BP 1796 Atlas, University Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fez 30000, Morocco.  
Email: lyoussi@gmail.com

**Funding information**

University Sidi Mohamed Ben Abdallah, Grant/Award Number: Laboratory PPSE

**Abstract**

Physicochemical characteristics, main minerals, and antioxidant activity were determined for Palestinian honey samples belonging to different floral and geographical origins. The features of the analyzed samples were within the established international standards for honey quality control. One clear exception was the hydroxymethylfurfural (HMF) of the Ziziphus sample purchased from the Jericho region, which is the lowest city in the word characterized by a hot desert climate. The observed HMF value was  $81.86 \pm 2.64$  mg/kg being two folds the maximum allowed in honey samples (40 mg/kg). As a second objective of the present work, the parameters were divided into two groups with different discriminatory power. The assessed physicochemical parameters, and the antioxidant activities, specific to the botanical origin discrimination, were used to run the first PCA. A strong correlation could be seen between the bioactive compounds and the antioxidant activities despite the geographical origin of the samples. Thyme and Ziziphus samples were the best samples, while citrus sample presented the lowest activity. Regarding the geographical discrimination, Ash and mineral contents in addition to the electrical conductivity were used. The output PCA conserved high represent ability of the data in the two-first components being 82.72% and 9.60%. A little discrimination between the samples produced in the north and those produced in the south of the country, but it was not perfect. The intervention of the botanical variability could be the reason.

**KEYWORDS**

antioxidant activity, honey, hydroxymethylfurfural, Palestine, physicochemical

## 1 | INTRODUCTION

In Palestine, honey constituted a source of sugar for a long time. Ceramic investigation revealed the presence of an extensive beekeeping activity, and honey production as a source of sugar, during the Mamluk and Ottoman periods (Taxel, 2006). According to the Mediterranean Beekeepers Association, honey is an important economic and medical fortune and Palestine produces about 1,250 tons of honey per year ("Ramallah Beekeepers Cooperative," 2015).

The production of honey requires an attention from the scientific community for the characterization and standards establishing. In addition, despite its small geographical area, Palestine has a high diversity of plants and great variation in topography and climate from the arid to humid (CBD, 2015). 2,000 plants species are described, from which 393 species constitute a big potential of melliferous sources (Albaba, 2015).

As a natural product made by honeybees from the nectar or the sweet juice of different parts of the flowering plants, honey is

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors. *Food Science & Nutrition* published by Wiley Periodicals, Inc.

a supersaturated sugar solution in combination with minerals, enzymes, vitamins, flavoring organic compounds, free amino acids, and numerous volatile compounds (Gorjanović et al., 2013; Kayode & Oyeyemi, 2014). The verity of its sources subject its composition to high variability, which require standardization procedures for customer's protection (Albaba, 2015). In addition to the floral origin, other factors may be determinant in the final quality of honey such as the geographical and climate characteristics as well as the processing and storage conditions (Aazza, Lyoussi, Antunes, & Miguel, 2013; Imtara, Elamine, & Lyoussi, 2018).

The sensorial, chemical, physical, and microbiological characteristics of honey determine its quality (Khalil et al., 2012). EC Directive 2001/110 has specified the criteria for ensuring honey quality (European Community, 2004), concerning mainly, the electrical conductivity, moisture content, reducing and non-reducing sugars, pH, free acidity, diastase activity, ash content, HMF, and protein content.

At the best of author's knowledge, no previous study aimed a detailed characterization of commercialized honey samples in Palestine. Therefore, the main aim of the present work was to illustrate the quality characteristics of honey samples purchased from different areas of Palestine. The samples belong to different botanical origin and were characterized using a panel of known physico-chemical parameters. In addition, ABTS, DPPH, iron reducing ability, and phosphomolybdenum reducing ability were assessed for the estimation of honey antioxidant activities. The entire data were used to study the correlations between the evaluated parameters, and to run the principal component analysis (PCA) for the discrimination of honey samples. The results were compared to the established quality standards, and to the reported honey samples belonging to the same botanical origin when it is possible.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

Ten local Palestinian honey samples were purchased from beekeeper, stored at room temperature (22–24°C) in airtight plastic containers until analysis, and labeled based on the commercial descriptions (Table 1). Visually, no sample of honey showed signs

of fermentation or granulation before the characterization. Each assay was performed in triplicate, and the results were expressed as means  $\pm$  SD.

### 2.1 | pH, free acidity, moisture, electrical conductivity, ash and proline content

The standardized methods of the International Honey Commission (IHC) were followed to assess the mentioned parameters (Bogdanov, 2009).

### 2.2 | Colour and melanoidins content estimations

The color was determined with a spectrophotometer by reading the absorbance of honey aqueous solutions at 635 nm (50% W/V) (Naab, Tamame, & Caccavari, 2008). The obtained absorbance was used to estimate the color in mmPfund following the algorithm: mmPfund =  $-38.7 + 371.39 \times$  absorbance.

Honey color was also determined spectrophotometrically by measuring the difference between two net absorbances at 560 and 720 nm. Melanoidins content was estimated based on the browning index (net absorbance at A450-A720) (Brudzynski & Miotto, 2011), and the results were expressed as absorption units (AU).

### 2.3 | Hydroxymethylfurfural

The HMF content was determined followed the spectrophotometric procedure described in (Elmer, 2015).

### 2.4 | Determination of mineral elements

A 5 ml of nitric acid 0.1 M were added to the ashes, and the mixture was stirred on a heating plate to almost complete dryness. Then, 10 ml of the same acid was added for the solubilization and made up to 25 ml with distilled water. The mineral components were determined by atomic absorption spectrometry (Silva, Videira, Monteiro, Valentão, & Andrade, 2009).

**TABLE 1** Honey samples IDs and their botanic, geographic origins, and harvest year

Code	Arabic name	English name	Scientific name	Location	Year of harvest
S 1	Zohif	Thyme	<i>Coridothymus capitatus</i>	Al-Khalil	2014
S 2	Rabat	Hairy fleabane	<i>Conyza bonariensis</i>	Salfeet	2014
S 3	Multifloral	Multifloral	<i>Multifloral</i>	Tubas	2014
S 4	Limon	Citrus	<i>Citrus limon</i>	Jenin	2014
S 5	Multifloral	Multifloral	<i>Multifloral</i>	Ramallah	2014
S 6	Rabat	Hairy fleabane	<i>C. bonariensis</i>	Nablus	2014
S 7	Rabat	Hairy fleabane	<i>C. bonariensis</i>	Qalqilya	2014
S 8	Morar	Cornflower	<i>Centaureadamulosa Boiss</i>	Nablus	2014
S 9	Jabali	Rocky Mountain	<i>Valeriana tuberosa</i>	Bethlehem	2014
S 10	Sader	Ziziphus	<i>Ziziphusspina-christi</i>	Jericho	2014

## 2.5 | Estimation of total antioxidant capacity by phosphomolybdate assay (TAC)

The TAC was estimated by the phosphomolybdenum method according to the reported procedure (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999). The assay is based on the reduction of Mo (VI)–Mo (V) by the honey solutions and subsequent formation of a green phosphate/Mo (V) complex in acid medium. Briefly, 25  $\mu$ l of honey solution was combined with 1 ml of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28-mM sodium phosphate and 4-mM ammonium molybdate). The tubes containing the reacting medium were capped and incubated in a boiling water bath at 95°C for 90 min. After cooling to room temperature, the absorbance of the solution was measured at 695 nm. The TAC of each sample was expressed as mg of ascorbic acid equivalent/g (mgAAE/g).

## 2.6 | Total polyphenolic content

The total polyphenolic content estimation was based on the Folin-Ciocalteu protocol (Singleton & Rossi, 1964). A volume of 100  $\mu$ l of honey solution was mixed with the 0.5 ml of Folin-Ciocalteu phenol reagent (1:10 dilution with distilled water) and 400  $\mu$ l of 0.7 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution. The reaction mixture was incubated for 2 hr and in darkness; and the absorbance was measured at 760 nm. The total content of each sample was expressed as mg gallic acid equivalent/100 g (mg GAE/100 g).

## 2.7 | Total flavone and flavonol content

The evaluation of flavone and flavonol content was carried out as previously described (Miguel, Nunes, Dandlen, Cavaco, & Antunes, 2014). Briefly, a volume of 500  $\mu$ l of honey dilution was mixed with the 500  $\mu$ l of  $\text{AlCl}_3$  (5%) and incubated for 1 hr at room temperature. The absorbance of the resulting solution was measured at 420 nm. The calibration curve was performed using quercetin dissolved in 96% ethanol with serial dilutions. Total flavone and flavonol content of each sample was expressed as the quercetin equivalent/100 g (QE/100 g).

## 2.8 | Determination of free radical scavenging activity by DPPH method

0.1 mM DPPH solution was prepared and added in a volume of 825 to 150  $\mu$ l of honey solutions diluted in series. The mixture was vigorously shaken and then incubated at room temperature for 1 hr in the dark. The absorbance at 517 nm was measured, and the scavenging activity of the DPPH radical was expressed as inhibition percentage using the following equation: % Inhibition = [(control absorbance – sample absorbance)/control absorbance]  $\times$  100. Butylatedhydroxytoluene (BHT) was used as positive control. The concentration providing 50% radical inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated from the graph of inhibition percentage plotted against honey concentrations (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

## 2.9 | Capacity for scavenging 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

The determination of ABTS radical scavenging ability was carried out as described previously (Miguel, 2009). The ABTS solution was made by mixing a volume of 7 mM of aqueous 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and an equal quantity of 2.4 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  followed by an incubation for 16 hr in the dark to produce cationic ABTS. A volume (825  $\mu$ l) of ABTS solution added to 150  $\mu$ l of honey solutions diluted in series. The absorbance was measured at 517 nm, and the determination  $\text{IC}_{50}$  was similar to the methodology described in the DPPH section. Trolox was used as positive control.

## 2.10 | Reducing power assay (Iron reducing activity)

A volume of 150  $\mu$ l of various honey dilutions was added to 200  $\mu$ l of 0.2 M potassium buffer (pH 6.6) and 200  $\mu$ l of potassium hexacyano ferrate (1% w/v). The mixture was vortexed and incubated for 20 min at 50°C, followed by the addition of 200  $\mu$ l of trichloroacetic acid (10% w/v), 600  $\mu$ l of distilled water, and 120  $\mu$ l of ferric chloride (0.1%, w/v). The absorbance of the mixture was measured at 700 nm. The honey concentration providing 50% inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated from the graph of optical density (Oyaizu, 1986).

## 2.11 | Statistical analysis

The statistical analysis were performed by ANOVA through the GraphPad Prism 6 program and using the Tukey's post hoc test at  $p < 0.05$ . Correlations between phenol and flavonoid contents and antioxidant activity were achieved by Pearson correlation coefficient ( $r$ ) at a significance level of 99% ( $p < 0.01$ ). The data preprocessing and the PCA were accomplished using MultBiplot64 running in MATLAB R2017a.

# 3 | RESULTS AND DISCUSSION

## 3.1 | Quality control analysis

The analyzed honey samples presented acidic pH values, between  $3.66 \pm 0.01$  in S2 and  $4.25 \pm 0.01$  in S4 (Table 2). Such values are within the range accepted for honey (Bogdanov, Ruoff, & Oddo, 2004), and were similar to those found in Algerian, Portuguese, and Morocco honeys (Aazza et al., 2013; Elamine et al., 2017; Khalil et al., 2012). The acid pH inhibits the growth of microorganisms (Terrab, Díez, & Heredia, 2002). The free acidity of honey can be explained by the presence of organic acids in equilibrium with lactones, esters, and some inorganic ions such as phosphate. A high acid value indicates the fermentation of sugars into organic acids (Abselami et al., 2018). None of these samples exceeded the permitted acidity limit (50 mEq/kg) indicating the absence of undesirable fermentation process (European Community, 2004). The maximum value was seen in sample S5 (32.67 mEq/kg), while sample S4 presented the minimal value (11.67 mEq/kg) (Table 2).

**TABLE 2** Physicochemical characterization of the analyzed samples

Code	pH	Free acidity (mEq/kg)	Moisture (%)	Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Ash (%)	Pfund scale (mm)	Color discription	Color (A560-A720)	Melanoidin (A450-A720)	HMF (mg/kg)	Proline (mg/kg)
S1	4.23 ± 0.01 <sup>a</sup>	18.67 ± 1.15 <sup>ab</sup>	19.27 ± 0.12 <sup>a</sup>	449.67 ± 3.06 <sup>a</sup>	0.208 ± 0.01 <sup>a</sup>	82.064 ± 4.33 <sup>a</sup>	Light amber	0.195 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.504 ± 0.010 <sup>a</sup>	30.05 ± 0.09 <sup>e</sup>	343.93 ± 20.96 <sup>abcd</sup>
S2	3.66 ± 0.01 <sup>cd</sup>	22.17 ± 0.29 <sup>ab</sup>	18.60 ± 0.46 <sup>a</sup>	317.83 ± 56.44 <sup>abc</sup>	0.065 ± 0.01 <sup>d</sup>	65.207 ± 3.84 <sup>ab</sup>	Light amber	0.074 ± 0.017 <sup>c</sup>	0.110 ± 0.012 <sup>bc</sup>	29.47 ± 0.15 <sup>e</sup>	482.53 ± 5.30 <sup>ab</sup>
S3	4.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	17.92 ± 1.01 <sup>ab</sup>	17.53 ± 0.58 <sup>b</sup>	417.67 ± 2.08 <sup>ab</sup>	0.102 ± 0.01 <sup>abc</sup>	45.579 ± 4.66 <sup>abc</sup>	Light extra amber	0.111 ± 0.003 <sup>ab</sup>	0.229 ± 0.010 <sup>b</sup>	22.91 ± 0.22 <sup>f</sup>	330.82 ± 14.62 <sup>abc</sup>
S4	4.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	11.67 ± 1.04 <sup>c</sup>	16.20 ± 0.1 <sup>c</sup>	261.20 ± 1.15 <sup>abc</sup>	0.150 ± 0.01 <sup>b</sup>	49.127 ± 8.48 <sup>abc</sup>	Light extra amber	0.091 ± 0.030 <sup>c</sup>	0.130 ± 0.047 <sup>bc</sup>	16.02 ± 0.12 <sup>g</sup>	258.94 ± 5.32 <sup>e</sup>
S5	3.78 ± 0.01 <sup>cd</sup>	32.67 ± 0.29 <sup>a</sup>	18.87 ± 0.46 <sup>a</sup>	432 ± 3 <sup>ab</sup>	0.104 ± 0.02 <sup>abc</sup>	75.077 ± 2.17 <sup>a</sup>	Light amber	0.077 ± 0.022 <sup>c</sup>	0.218 ± 0.025 <sup>b</sup>	39.46 ± 0.37 <sup>b</sup>	471.52 ± 15.98 <sup>ab</sup>
S6	3.82 ± 0.01 <sup>c</sup>	27.33 ± 0.76 <sup>a</sup>	19 ± 0.2 <sup>a</sup>	386.33 ± 2.31 <sup>ab</sup>	0.173 ± 0.02 <sup>a</sup>	63.433 ± 1.83 <sup>ab</sup>	Light amber	0.113 ± 0.009 <sup>ab</sup>	0.156 ± 0.007 <sup>b</sup>	10.16 ± 0.53 <sup>h</sup>	368.51 ± 3.46 <sup>abc</sup>
S7	3.87 ± 0.01 <sup>c</sup>	31.83 ± 1.15 <sup>a</sup>	19.13 ± 0.12 <sup>a</sup>	533.67 ± 3.06 <sup>a</sup>	0.152 ± 0.01 <sup>b</sup>	62.768 ± 2.27 <sup>ab</sup>	Light amber	0.115 ± 0.020 <sup>ab</sup>	0.185 ± 0.017 <sup>b</sup>	41.28 ± 0.37 <sup>b</sup>	720.87 ± 5.18 <sup>a</sup>
S8	3.73 ± 0.01 <sup>cd</sup>	29.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	17.07 ± 0.23 <sup>b</sup>	379 ± 2.65 <sup>ab</sup>	0.119 ± 0.01 <sup>ab</sup>	76.186 ± 8.98 <sup>a</sup>	Light amber	0.115 ± 0.028 <sup>ab</sup>	0.252 ± 0.020 <sup>b</sup>	37.09 ± 0.19 <sup>bc</sup>	473.87 ± 5.27 <sup>a</sup>
S9	3.84 ± 0.01 <sup>c</sup>	22.08 ± 0.95 <sup>ab</sup>	18.73 ± 0.64	346.67 ± 2.08 <sup>ab</sup>	0.079 ± 0.01 <sup>d</sup>	73.746 ± 7.06 <sup>ab</sup>	Light amber	0.150 ± 0.022 <sup>a</sup>	0.204 ± 0.022 <sup>b</sup>	33.22 ± 0.07 <sup>d</sup>	229.44 ± 3.24 <sup>e</sup>
S10	3.88 ± 0.01 <sup>c</sup>	29.17 ± 2.57 <sup>a</sup>	20.20 ± 0.4 <sup>a</sup>	482.67 ± 12.74 <sup>a</sup>	0.178 ± 0.05 <sup>a</sup>	100.96 ± 2.27 <sup>a</sup>	Amber	0.239 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.537 ± 0.012 <sup>a</sup>	81.86 ± 2.64 <sup>a</sup>	569.82 ± 10.80 <sup>a</sup>

Note. Values in the same column followed by the same letter are not significant different ( $p < 0.05$ ) by the Tukey's multiple range test.

**TABLE 3** Mineral content in the analyzed honey samples

Code	K (mg/kg)	Na (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Pd (mg/kg)
S 1	471.63 ± 0.55 <sup>c</sup>	68.47 ± 0.49 <sup>e</sup>	96.95 ± 0.35 <sup>b</sup>	22.98 ± 0.11 <sup>f</sup>	4.24 ± 0.03 <sup>b</sup>	25.20 ± 1.52 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>f</sup>	0.56 ± 0.01 <sup>f</sup>
S 2	190.23 ± 0.74 <sup>j</sup>	56.42 ± 0.68 <sup>f</sup>	65.48 ± 0.56 <sup>h</sup>	23.29 ± 0.15 <sup>f</sup>	2.25 ± 0.05 <sup>bcd</sup>	2.23 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.57 ± 0.01 <sup>f</sup>
S 3	250.94 ± 0.39 <sup>h</sup>	74.06 ± 0.02 <sup>d</sup>	98.65 ± 0.15 <sup>b</sup>	39.36 ± 0.22 <sup>b</sup>	8.75 ± 1.36 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>cde</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.94 ± 0.01 <sup>a</sup>
S 4	203.92 ± 0.17 <sup>i</sup>	35.19 ± 0.93 <sup>h</sup>	92.01 ± 0.60 <sup>d</sup>	30.26 ± 0.51 <sup>e</sup>	3.80 ± 1.39 <sup>bc</sup>	1.27 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.95 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.79 ± 0.01 <sup>d</sup>
S 5	435.93 ± 0.16 <sup>d</sup>	51.65 ± 1.46 <sup>g</sup>	74.98 ± 2.07 <sup>e</sup>	32.00 ± 0.15 <sup>d</sup>	2.49 ± 0.97 <sup>bcd</sup>	1.15 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>f</sup>	0.57 ± 0.01 <sup>f</sup>
S 6	441.32 ± 0.90 <sup>e</sup>	73.88 ± 0.35 <sup>d</sup>	71.26 ± 0.15 <sup>f</sup>	22.65 ± 0.11 <sup>f</sup>	5.47 ± 1.52 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.22 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.02 <sup>b</sup>
S 7	495.48 ± 1.94 <sup>a</sup>	69.56 ± 1.59 <sup>e</sup>	68.01 ± 0.08 <sup>g</sup>	33.95 ± 0.28 <sup>c</sup>	3.56 ± 0.23 <sup>b</sup>	2.35 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.96 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>c</sup>
S 8	322.54 ± 0.86 <sup>f</sup>	196.51 ± 0.36 <sup>a</sup>	138.41 ± 0.73 <sup>a</sup>	54.15 ± 0.91 <sup>a</sup>	4.77 ± 0.83 <sup>b</sup>	13.76 ± 0.77 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>e</sup>
S 9	238.85 ± 1.01 <sup>g</sup>	110.77 ± 1.38 <sup>c</sup>	64.49 ± 0.05 <sup>h</sup>	20.48 ± 0.17 <sup>g</sup>	4.29 ± 0.69 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>g</sup>	0.51 ± 0.01 <sup>g</sup>
S 10	476.40 ± 1.51 <sup>b</sup>	115.04 ± 0.04 <sup>b</sup>	94.56 ± 0.39 <sup>c</sup>	34.48 ± 0.17 <sup>c</sup>	3.93 ± 1.20 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.02 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.84 ± 0.02 <sup>c</sup>

Note. Values in the same column followed by the same letter are not significant different ( $p < 0.05$ ) by the Tukey's multiple range test.

The moisture content of a honey sample depends on the environmental conditions and the manipulation by the beekeepers, which explain its usual year to year variations (Acquarone, Buera, & Elizalde, 2007). The moisture of the studied honey samples was within the standards (not more than 20%) (Codex Alimentarius Commission, 2001; European Community, 2004), except the Ziziphus honey (S10) with a moisture values of 20.2%. This value is similar to the Moroccan Ziziphus honey (Aazza, Lyoussi, Antunes, & Miguel, 2014) and higher than the Sudanese and Algerian Ziziphus honeys (Idris, Mariod, & Hamad, 2011; Zerrouk, Seijo, Escuredo, & Rodríguez-Flores, 2018), which explain the governance of the environmental conditions on determining this parameter. 16.9% was the minimum value, seen in the case the sample S4. High moisture content allows the fermentation of honey by undesirable osmo-tolerant yeasts and thus the formation of ethyl alcohol and carbon dioxide. In addition, ethyl alcohol can in turn oxidize to acetic acid and water giving a bitter taste to the honey (Chirife, Zamora, & Motto, 2006).

The Ash content of honey samples, determining the mineral richness and the resulting electrical conductivity are important parameters in determining the botanical origin of a honey sample (Aazza et al., 2013). In addition, the mentioned parameters serve as differentiating features between nectar and honeydew honeys (Louveaux, 1959). The Ash content of the analyzed samples was between  $0.065 \pm 0.01\%$  (S2) and  $0.208 \pm 0.01\%$  (S1), being below 0.6%, the determined threshold for honey samples (Codex Alimentarius Commission, 2001). The results of our study show that the electrical conductivity values of the honey samples vary between  $261.2 \pm 1.15 \mu\text{S}/\text{cm}$  in sample S4 (Citrus) and a maximum of  $533.67 \pm 3.06 \mu\text{S}/\text{cm}$  in sample S7 (hairy fleabane) (Table 2). The electrical conductivity measures the ionizable organic and inorganic substances and is not suitable to surpass  $800 \mu\text{S}/\text{cm}$ , from a quality control point of view (Codex Alimentarius Commission, 2001). The values were similar to other Palestinian honey samples (Imtara et al., 2018), published earlier by the same group for other purposes, and to other samples from different botanical and geographical origins (Aazza et al., 2013; Elamine et al., 2017; Imtara et al., 2018). Other criteria used to determine the nutritional value of honey, with direct

relation with the ash content and electrical conductivity is the mineral content (Table 3). Quantitatively speaking, potassium was the most important mineral among the eight evaluated elements, with prevalence in the sample S7 ( $495.48 \pm 1.94 \text{ mg}/\text{kg}$ ), while S2 had the lowest value ( $190.23 \pm 0.74 \text{ mg}/\text{kg}$ ). Sodium and calcium came in second place after potassium. The samples S8 had the highest sodium and calcium concentrations being present at levels of  $196.51 \pm 0.36$  and  $138.41 \pm 0.73 \text{ mg}/\text{kg}$ , successively. In addition, the trace minerals of Fe, Zn, Cu, and Pd were detected in all honey samples at low concentrations (Table 3). All values found in the samples were within the ranges reported for honeys from other study (Aazza et al., 2013; Fernández-Torres et al., 2005; Imtara et al., 2018). The mineral composition of honey samples is also a potential indicator of its geographical origin, as well as a biomarker of possible pollution by toxic metals (Alves, Ramos, Gonçalves, Bernardo, & Mendes, 2013; Pohl, 2009).

The correlation matrix of some analyzed physicochemical parameters and the mineral compositions are illustrated in Table 6. Ash content has a strong positive correlation with potassium ( $r = 0.708$ ,  $p < 0.05$ ), explaining the prevalence of potassium in all analyzed honey samples (Table 3). The same correlation was reported previously (Hazali et al., 2017). As the Ash content determines the electrical conductivity of honeys (Guler, Bakan, Nisbet, & Yavuz, 2007), a strong positive correlation was also seen between the potassium levels and the electrical conductivity ( $r = 0.847$ ,  $p < 0.001$ ).

Proline, an essential free amino acid used for quality control of honey samples (Paramás, Báñez, Marcos, García-Villanova, & Sánchez, 2006). Values below  $180 \text{ mg}/100 \text{ g}$  may indicate the none ripeness of a honey sample and/or adulteration (Bogdanov et al., 1999). None of the analyzed samples presented less amount with the maximum proline content found in hairy fleabane sample (S7) ( $720.87 \pm 5.18 \text{ mg}/\text{kg}$ ) coming from Qalqilya. This value was three folds higher than the minimum value seen in Rocky Mountain honey sample (S9) coming from Bethlehem ( $229.44 \pm 3.24 \text{ mg}/\text{kg}$ ) (Table 2).

Regarding the color classification, multifloral honey from tubas and Citrus honey presented light extra amber color, Ziziphus honey had an amber color, while the remaining samples presented light



**TABLE 4** Pearson correlation coefficients among compounds and antioxidant activity

	Phenols	Flavones and flavanol	Antioxidant capacity	Proline	Color	Melanoidin	DPPH	ABTS	Reducing power
Phenols	1	0.637*	0.007	-0.057	0.599*	0.643*	-0.082	-0.619*	-0.878***
Flavones and flavanol	0.637*	1	-0.654*	0.329	0.893***	0.942***	-0.738*	-0.504	-0.778**
Antioxidant capacity	0.007	-0.654*	1	-0.296	-0.439	-0.526	0.727**	0.135	0.243
Proline	-0.057	0.329	-0.296	1	0.098	0.134	-0.458	-0.493	-0.234
Color	0.599*	0.893***	-0.439	0.098	1	0.911***	-0.500	-0.384	-0.681*
Melanoidin	0.643*	0.942***	-0.526	0.134	0.911***	1	-0.681*	-0.558*	-0.672*
DPPH	-0.082	-0.738*	0.727**	-0.458	-0.500	-0.681*	1	0.418	0.139
ABTS	-0.619*	-0.504	0.135	-0.493	-0.384	-0.558*	0.418	1	0.614*
Reducing power	-0.878***	-0.778***	0.243	-0.234	-0.681*	-0.672*	0.139	0.614*	1

\*\*\*\*Correlation is significant at the  $P < 0.0001$ ; \*\*\*Correlation is significant at the  $P < 0.001$ ; \*\*Correlation is significant at the  $P < 0.01$ ; \*Correlation is significant at the  $P < 0.05$ .

amber colors. The color of honey is influenced by various factors, including mineral content (Gomes, Dias, Moreira, Rodrigues, & Estevinho, 2010). The estimations of melanoidin, which are heterogeneous polymers of high molecular weight of brown color, have a very important role in discriminating the botanical origin of honey samples (Da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa, & Fett, 2016). They are formed when sugars and amino acids combine (through the Maillard reaction) at high temperatures and low water activity (Amarowicz, 2009). In this way, the darkness of some honeys can be mainly attributed to the melanoidin which may indicate long periods of storage and/or honey heating processes (Borrelli, Visconti, Mennella, Anese, & Fogliano, 2002; Martins & Jongen, 2001).

As honey color is also governed by the polyphenolics and melanoidin content (Aazza et al., 2013, 2014). A strong positive correlation was obtained between color, from one side, and melanoidin and polyphenols, from the other side, with  $r$  values of 0.599 ( $p < 0.05$ ), 0.911 ( $p < 0.001$ ), respectively. The color of the analyzed samples correlated also, with high significance ( $p < 0.001$ ), the amounts of flavones and flavanol ( $r = 0.893$ ).

Regarding HMF level, another sensitive parameter for heating and storage conditions (Aazza et al., 2014), eight of the analyzed samples presented levels less than the maximum established by international standards ( $< 40$  mg/kg) (Codex Alimentarius Commission, 2001; European Community, 2004). In contrast, honey sample S7 showed slight higher value in comparison to the norms, while S10 originating from Jericho presented a very high amount of HMF being  $81.86 \pm 2.64$  mg/kg. The last value could be explained by the semi-arid microclimate characterized by mild to warm winter and hot dry summer known in Jericho region. Also the storage conditions in Jordan Valley (Jericho) characterized by hot desert climate may be key influencing factor to change the honey quality and can therefore explain the high value of HMF (Awad, Rzaq, & Busse, 2014). It has been mentioned that the HMF content may be influenced by the temperature, storage conditions, the physicochemical properties of honey (pH, acidity, moisture, etc.) and by the concentrations of metallic ions such as manganese, zinc, magnesium, and iron (II) presenting honey (Shapla, Solayman, Alam, Khalil, & Gan, 2018).

### 3.2 | Bioactive compounds and antioxidant activity

The results of this section are illustrated in Table 5. Regarding the bioactive compounds, namely polyphenolic, flavones and flavanol, a great variability was seen among the analyzed samples, suggesting the intervention of the reported floral influence (Fernández-Torres et al., 2005), as they originate from different botanical sources. The lowest polyphenolic content value was obtained in hairy fleabane (S2) from Salfet ( $26.96 \pm 0.71$  mg/100 g), while the highest value was obtained in thyme honey (S1) from Al-Khalil ( $70.73 \pm 0.71$  mg/100 g). This value is similar to that found in thyme honey from Morocco (Aazza et al., 2014). The highest content of flavones and flavanol was found in S10 honey with a value of  $8.23 \pm 0.59$  mg QE/100 g, while a minimum value of  $0.18 \pm 0.04$  mg QE/100 g was seen in samples S3 (Table 5).

**TABLE 5** The content of phenols, flavones, and flavonols, total antioxidant capacity (TAC) and antioxidant activity (DPPH, ABTS and reducing power)

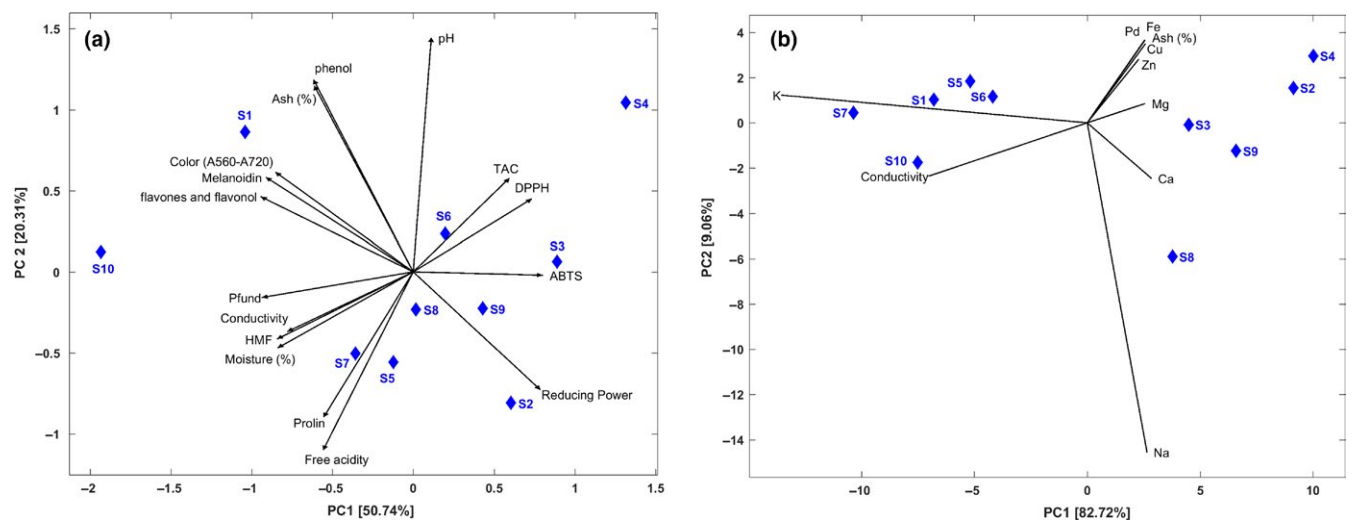
Code	Phenols (mg GAE/100 g)	Flavones and flavonol(mg QE/100 g)	TAC (mg AA/g)	DPPH (IC50 = mg/ml)	ABTS (IC50 = mg/ml)	Reducing power (IC50 = mg/ml)
S 1	70.73 ± 0.84 <sup>a</sup>	5.09 ± 0.05 <sup>b</sup>	84.18 ± 2.77	9.04 ± 0.68 <sup>f</sup>	3.26 ± 0.20 <sup>d</sup>	3.42 ± 0.04 <sup>bc</sup>
S 2	26.96 ± 0.71 <sup>f</sup>	–	87.04 ± 2.33	23.53 ± 0.81 <sup>e</sup>	13.79 ± 0.32 <sup>ab</sup>	5.03 ± 0.12 <sup>a</sup>
S 3	27.72 ± 0.12 <sup>f</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>e</sup>	111.97 ± 2.48	39.68 ± 0.05 <sup>d</sup>	12.09 ± 0.10 <sup>ab</sup>	5.32 ± 0.10 <sup>a</sup>
S 4	54.78 ± 0.16 <sup>d</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>e</sup>	117.98 ± 2.02	86.90 ± 1.69 <sup>a</sup>	15.62 ± 0.61 <sup>a</sup>	3.86 ± 0.06 <sup>bc</sup>
S 5	41.64 ± 1.03 <sup>e</sup>	0.69 ± 0.12 <sup>e</sup>	94.85 ± 1.65	40.29 ± 0.98 <sup>d</sup>	3.73 ± 0.51 <sup>d</sup>	4.12 ± 0.07 <sup>b</sup>
S 6	58.98 ± 1.32 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.10 <sup>e</sup>	120.04 ± 1.59	75.47 ± 2.41 <sup>b</sup>	3.77 ± 0.16 <sup>d</sup>	3.85 ± 0.03 <sup>bc</sup>
S 7	40.43 ± 0.70 <sup>e</sup>	1.05 ± 0.09 <sup>d</sup>	102.66 ± 1.15	38.86 ± 1.56 <sup>d</sup>	5.53 ± 0.92 <sup>d</sup>	4.00 ± 0.04 <sup>b</sup>
S 8	44.06 ± 1.07 <sup>e</sup>	2.90 ± 0.22 <sup>c</sup>	81.18 ± 3.01	44.40 ± 0.06 <sup>d</sup>	8.06 ± 0.13 <sup>c</sup>	3.85 ± 0.03 <sup>bc</sup>
S 9	30.82 ± 0.28 <sup>f</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>e</sup>	87.29 ± 2.17	57.93 ± 2.72 <sup>c</sup>	16.28 ± 0.25 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.18 <sup>b</sup>
S 10	63.24 ± 0.60 <sup>b</sup>	8.23 ± 0.59 <sup>a</sup>	83.98 ± 1.35	14.81 ± 2.16 <sup>f</sup>	3.60 ± 0.21 <sup>d</sup>	2.84 ± 0.09 <sup>bc</sup>
BHT	–	–	–	0.009 ± 0.0001 <sup>g</sup>	–	–
Trolox	–	–	–	–	0.019 ± 0.003 <sup>e</sup>	–
Ascorbic acid	–	–	–	–	–	0.003 ± 0.001 <sup>d</sup>

Note. Values in the same column followed by the same letter are not significant different ( $p < 0.05$ ) by the Tukey's multiple range test.

**TABLE 6** Pearson correlation coefficients among ash, conductivity, Pfund, melanoidin, and mineral elements

	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Pd
Ash	0.708*	-0.061	0.223	-0.060	0.067	0.510	0.376	0.338
Conductivity	0.847***	0.121	-0.011	0.189	0.076	0.182	0.021	0.235
Pfund	0.550*	0.446	0.145	0.003	-0.414	0.372	-0.003	-0.335
Melanoidin	0.567*	0.273	0.366	0.076	0.053	0.571*	-0.082	-0.033

\*\*\*Correlation is significant at the  $P < 0.001$ ; \*\*Correlation is significant at the  $P < 0.01$ ; \*Correlation is significant at the  $P < 0.05$ .



**FIGURE 1** Principal component analysis of the assessed parameters. (a) PCA of the physicochemical parameters and the antioxidant activities. (b) PCA of the mineral content, ash, and electrical conductivity. K: potassium; Na: sodium; Ca: calcium; Mg: magnisium; Fe: iron; Zn: zinc; Cu: copper; Pd: palladium

The ability of the analyzed samples to scavenge DPPH free radicals, expressed as IC<sub>50</sub> mg/ml, was also evaluated. The lowest IC<sub>50</sub> was seen in the case of samples S1 and S10, being, so, the most

efficient samples regarding the DPPH free radicals scavenging. Their values were 9.04 ± 0.68 and 14.81 ± 2.16 mg/ml, respectively. Both samples presented the highest values of polyphenolic compounds

(70.73 ± 0.84 mg GAE/100 g and 63.24 ± 0.60 mg GAE/100 g), flavones and flavonol contents (5.09 ± 0.05 mg QE/100 g and 8.23 ± 0.59 mg QE/100 g) among the analyzed. Such relation could be seen clearly through the negative correlation between the mentioned bioactive compounds and the DPPH IC<sub>50</sub> (Table 4). Both *r* values were negative, but the significant level was reached only in the case of flavones and flavonol contents (*r* = −0.738; *p* < 0.05). Similar results, and correlation behavior were obtained by other groups when analyzing honeys samples from different botanical and geographical origins (Bertoncelj, Doberšek, Jamnik, & Golob, 2007; Khalil et al., 2012). BHT was used as positive control with a very low IC<sub>50</sub> in comparison to honey samples (0.009 ± 0.0001 mg/ml).

Antioxidant activity was also assessed by the ABTS assay (Table 5), through which, we found that sample S1 was the most active presenting an IC<sub>50</sub> of 3.26 ± 0.20 mg/ml. This results concordat the ones of the DPPH assay, which also explain the negative correlation between the IC<sub>50</sub> of ABTS and the polyphenolic content (*r* = −0.619; *p* < 0.05). Honey sample S9 honey presented the highest IC<sub>50</sub> 16.28 ± 1.25 mg/ml, being the less active sample. Trolox was used as positive control with IC<sub>50</sub> of 0.019 ± 0.003 mg/ml.

The reducing power of the studied honey samples is dose-dependent. The results illustrated in Table 5 shows that the sample originating from Jericho was the most reducing sample, while Tubas honey had the lowest activity (5.32 ± 0.10 mg/ml). A possible effect of polyphenolic, flavones, and flavonol could be seen through the resulted positive correlation with the ability of samples to reduce the Fe<sup>3+</sup> ions. The *r* values were *r* = −0.878 (*p* < 0.001) and *r* = −0.778 (*p* < 0.001) for polyphenols and flavonoids, successively.

For the three antioxidant activity, a possible role of Maillard reaction products, estimated by the melanoidin content, was clearly illustrated by the established positive correlation. In the present work, melanoidin showed significant (*p* < 0.05) correlations with the IC<sub>50</sub> of DPPH, ABTS and the reducing power with *r* values of −0.681, −0.558, and −0.672, respectively.

Sample S6 presented the highest total antioxidant activity with a value of 120.03 ± 1.59 mg AAE/g, while sample S10 honey had the lowest activity (83.98 ± 1.35 mg AAE/g honey).

### 3.3 | Multivariate analysis

To further understand the distribution of the analyzed samples, based on the assessed parameters, principal component analysis was used (PCA). PCA is known to be a good tool for information extraction from multivariate matrices and concentrate it in only few components (Bevilacqua, Bucci, Magri, Magri, & Nescatelli, 2013). The scores of the obtained components are then used to plot the data in an interpretable way.

In the present work, the evaluated parameters were divided into two main groups. The first group was formed by all parameters except the mineral content and was used as matrix to extract the information resulting from the botanical origin effect. The purpose was to cluster the Palestinian samples by their similarities in terms of physicochemical properties and antioxidant features. A second

one was formed by the contents of minerals, the ash content, and the electrical conductivity. It is well established that this group of parameters, and besides being influenced by the botanical origin, it may indicate the geographical origins. It is then important to illustrate if there is a finger print characterizing samples produced in a specific Palestinian region. The results of both PCAs were illustrated in Figure 1a and b, successively.

Figure 1a describes the distribution of the honey samples based on the parameter illustrated as black narrows. The projection of each narrow on a given axis (component) reflects its represent ability/correlation with the same component. Honey samples were plotted as blue full diamonds. Considering the given data, 50.74% was conserved in the first principal component, which explained on the negative part color intensity, melanoidin, flavones, flavonol, and the slightly the polyphenols. Consequently, the first component correlated positively the IC<sub>50</sub> of the assessed antioxidant activities. In addition, the same component correlated also the HMF, moisture contents and the electrical conductivity, but negatively. For the second component, 20.31% of the given data was retained and represented, mainly the pH, Ash content and polyphenolic content, in the positive part, and proline and free acidity in the negative part.

Thyme (S1) and Ziziphus (S10) honey samples shared the features regarding the bioactive compounds, and color intensity, being so the most antioxidant samples. This feature is already reported for both botanical origins (Aazza et al., 2014). The variability of the secondary plants, which may be specific to Palestine, seems to do not be significantly influencing, and both botanical origins seem to be a good option when honey antioxidant ability is desired. Honey samples labeled as hairy fleabane, Multifloral, Cornflower and Rocky Mountain shared the lowest pH values and high proline content in comparison to the remaining samples. Low pH value is a property that inhibits the growth of undesirable microbial entities. In addition, the authors of the present work reported that low pH values is favorable parameters when a synergetic affect with essential oils against microbial strains is targeted (Imtara et al., 2018).

Regarding the study of the geographical component in discriminating the analyzed honey samples, the given data (ash, mineral contents and electrical activity) was highly conserved in the first two principal components explaining 82.72% and 9.06%, respectively. Two main clusters could be distinguished regarding the first principal component. The first cluster was formed by S1, S5, S6, S7, and S10 and were characterized by high potassium content (the most abundant element among the assessed minerals [table]) and electrical conductivity. Among the mentioned honey samples, S6 was the only one harvested in the north part of Palestine. The second cluster was formed by S9 and S2 produced in the south of the country, and the remaining samples (S3, S4, and S8) provided from the north part. The five samples presented less potassium content and electrical conductivity and, relatively, less amounts of the remaining parameters.

The geographical clustering was not perfect, and exception could be seen. This may be due to the intervention of the botanic

origin, as it is well documented to be also crucial in determining the mineral profile of honey samples (Karabagias et al., 2017). However, the discrimination of samples using the mineral profile, the ash content and the electrical conductivity was clearer than in the case of the parameters used in Figure 1a.

## 4 | CONCLUSION

Except the high HMF content of the honey sample originating from Jericho, no abnormal feature could be highlighted about the analyzed Palestinian honey. As it is the lowest city above the sea level in the world, the resulting climate may be the reason of the HMF increase. Such a feature needs to be a central interest in a possible study with extended sampling to other botanical honey from the same region. This will discriminate the possible effect of the botanical source and highlight at which level extreme climate of the region affects the quality of the produced honey samples.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors of the present work declare no conflicts of interest in relation to published information. The authors are responsible for the content and writing of the article.

## ORCID

Badiaa Lyoussi  <http://orcid.org/0000-0001-6090-6558>

## REFERENCES

- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2013). Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial portuguese honeys. *Journal of Food Science*, 78(8), C1159–C1165. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12201>
- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2014). Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(4), 449–457. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.873888>
- Abselami, A., Tahani, A., Sindic, M., Fauconnier, M. L., Bruneau, E., & Elbachiri, A. (2018). Physicochemical properties of some honeys produced from different flora of Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 9(3), 879–886. <https://doi.org/10.26872/jmes.2018.9.3.97>
- Acquarone, C., Buera, P., & Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 101(2), 695–703. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.058>
- Albaba, I. (2015). A list of important honeybee nectariferous and polleniferous plant species in the West Bank Governorates, Palestine. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 5, 114–121. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2015.02.005>
- Alves, A., Ramos, A., Gonçalves, M. M., Bernardo, M., & Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.009>
- Amarowicz, R. (2009). Antioxidant activity of maillard reaction products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 109–111. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900011>
- Awad, S., Rząd, I., & Busse, P. (2014). The ringing site in jericho (Palestine) – development of bird migration and parasitological research on the great rift valley flyway. *Ring*, 35(1), 55–63. <https://doi.org/10.2478/ring-2013-0003>
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.060>
- Bevilacqua, M., Bucci, R., Magri, A. D., Magri, A. L., & Nescatelli, R. (2013). Chemometrics in food chemistry. *Data Handling in Science and Technology*, 28, 171–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00005-3>
- Bogdanov, S. (2009). Harmonised methods of the international IHC. *Bee Product Science*, 5, 1–62. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., ... Vit, P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: Review by the International Honey Commission. *Bee World*, 80(2), 61–69. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099428>
- Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35, 4–17. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6527–6533. <https://doi.org/10.1021/jf025686o>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brudzynski, K., & Miotto, D. (2011). Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 127(3), 1023–1030. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.075>
- CBD (2015). *Fifth national report to the convention on biological diversity*. Available from: <https://www.cbd.int/doc/world/ps/ps-nr-05-en.pdf>
- Chirife, J., Zamora, M. C., & Motto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.009>
- Codex Alimentarius Commission (2001). Codex Alimentarius Commission Standards. Codex Stan 12-1981, 1–8. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-88242-8>
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196(April), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Elamine, Y., Aazza, S., Lyoussi, B., Dulce Antunes, M., Estevinho, L. M., Anjos, O., ... Miguel, M. G. (2017). Preliminary characterization of a Moroccan honey with a predominance of *Bupleurum spinosum* pollen. *Journal of Apicultural Research*, 8839(January), 1–13. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1265759>
- European Community (2004). Directive 2001/83/EC on the community code relating to medicinal products for human use as amended by Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January. *Official Journal of the European Union*, (November 2001), 67–128.
- Federazione Apicoltori Mediterraneo, Ramallah Beekeepers Cooperative (2015). [http://www.fedapimed.com/members\\_palestine.html](http://www.fedapimed.com/members_palestine.html)
- Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J. L., Bello-López, M. Á., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J. C., & Guiraúm-Pérez, A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65(3), 686–691. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.07.030>

- Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., & Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 544–548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.029>
- Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., & Sužnjević, D. Ž. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.12.004>
- Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., & Yavuz, O. (2007). Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chemistry*, 105(3), 1119–1125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.024>
- Hazali, N., Kharsa, B. E., Ibrahim, M., Masri, M., Anuar, M. N. N., & Azoddein, A. A. M. (2017). Macrominerals and their correlations with ash, electrical conductivity and pH of Malaysian trigona and tualang bee honey. *International Journal of Allied Health Sciences*, 1(1), <http://journals.iium.edu.my/ijahs/index.php/IJAHs/article/view/56>.
- Idris, Y. M. A., Mariod, A. A., & Hamad, S. I. (2011). Physicochemical properties, phenolic contents and antioxidant activity of Sudanese honey. *International Journal of Food Properties*, 14(2), 450–458. <https://doi.org/10.1080/10942910903243673>
- Imtara, H., Elamine, Y., & Lyoussi, B. (2018). Honey antibacterial effect boosting using *Origanum vulgare* L. essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/7842583>
- Karabagias, I. K., Louppis, A. P., Karabournioti, S., Kontakos, S., Papastefanou, C., & Kontominas, M. G. (2017). Characterization and classification of commercial thyme honeys produced in specific Mediterranean countries according to geographical origin, using physicochemical parameter values and mineral content in combination with chemometrics. *European Food Research and Technology*, 243(5), 889–900. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2803-0>
- Kayode, J., & Oyeyemi, S. D. (2014). Physico-chemical investigation of honey samples from bee farmers in Ekiti State, Southwest Nigeria. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2(January), 246–249. <https://doi.org/10.11648/j.jps.20140205.26>
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., ... Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199–11215. <https://doi.org/10.3390/molecules170911199>
- Louveaux, J. (1959). La technologie du miel. *Les Annales de l'Abeille*, 2, 343–354. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00890128/document>
- Martins, S. I. F. S., & Jongen, W. M. F. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science and Technology*, 11, 364–373. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00022-X)
- Miguel, M. G. (2009). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 291–312. <https://doi.org/10.1002/ffj.1961>
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., & Antunes, M. D. (2014). Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology*, 34(1), 16–23. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612014000100002>
- Naab, O. A., Tamame, M. A., & Caccavari, M. A. (2008). Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(4), 566–576.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Paramás, A. M. G., Báñez, J. A. G., Marcos, C. C., García-Villanova, R. J., & Sánchez, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, 95(1), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.008>
- Pohl, P. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.015>
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: Effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0408-3>
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.05.005>
- Singleton, V. L., & Rossi Jr, J. A. (1964). *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. New York, NY: Wiley, 331.
- Taxel, I. (2006). Ceramic evidence for beekeeping in palestine in the Mamluk and Ottoman periods Itamar Taxel. *Levant*, 8914(March), 203–212. <https://doi.org/10.1179/lev.2006.38.1.203>
- Terrab, A., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2002). Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, 79(3), 373–379. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00189-9)
- White, J. W. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 62, 509–514.
- Zerrouk, S., Seijo, M. C., Escuredo, O., & Rodríguez-Flores, M. S. (2018). Characterization of *Ziziphus lotus* (jujube) honey produced in Algeria. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 1–9. <https://doi.org/10.1080/0218839.2017.1399663>

**How to cite this article:** Imtara H, Elamine Y, Lyoussi B. Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Sci Nutr*. 2018;00:1–10. <https://doi.org/10.1002/fsn.3.754>

## Evaluation of antioxidant, diuretic, and wound healing effect of Tulkarm honey and its effect on kidney function in rats

Hamada Imtara<sup>1</sup>, Noori Al-Waili<sup>2</sup>, Meryem Bakour<sup>1</sup>, Wail Al-Waili<sup>2</sup> and Badiaa Lyoussi<sup>1</sup>

1. Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environmental Health, Faculty of Sciences, Dhar El Mehraz, BP 1796 Atlas, University Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fez 30 000, Morocco; 2. Department of Nephrology and Hypertension, NY Medical Care for Nephrology, New York, USA.

**Corresponding author:** Noori Al-Waili, e-mail: noori786@yahoo.com

**Co-authors:** HI: hamada.tarayrah@gmail.com, NA: noori786@yahoo.com, MB: mersvi08@hotmail.fr,

WA: drnoori6@yahoo.com, BL: lyoussi@gmail.com

**Received:** 07-06-2018, **Accepted:** 21-09-2018, **Published online:** \*\*\*

**doi:** 10.14202/vetworld.2018.1491-1499 **How to cite this article:** Imtara H, Al-Waili N, Bakour M, Al-Waili W, Lyoussi B (2018) Evaluation of antioxidant, diuretic, and wound healing effect of Tulkarm honey and its effect on kidney function in rats, *Veterinary World*, 11(10): 1491-1499.

### Abstract

**Aim:** The composition and activity of honey depend on its floral origin. Honey collected from Tulkarm was evaluated for physicochemical property and antioxidant content as well as a diuretic and wound healing activity. Its effect on kidney function was evaluated and compared with furosemide.

**Materials and Methods:** Honey was collected in Tulkarm, Palestine, and its phenol, flavones, and flavonol content were assessed. The antioxidant activity was determined with the use of colorimetric assays, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ferric reducing antioxidant power, and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Two sets of experiments were conducted. First experiment: 18 rats were used for the evaluation of diuretic activity of honey. The rats received either honey or furosemide. Renal function test, uric acid, and serum and urine electrolytes assay were performed. Second experiment: 18 male mice were used to evaluate the wound healing property of honey. Wounds were created on mice skin and treated daily with honey or Madecassol. Measurements of wounds were performed over a period of 12 days.

**Results:** The physical and chemical parameters of Tulkarm honey are within the limits of the European legislation and fulfilling the criteria described in the standard codex for honey. It contains antioxidant compounds and shows antioxidant activity. Oral honey increased creatinine clearance and urine volume, sodium, and chloride without causing hypokalemia or affecting blood urea, uric acid, or serum creatinine level. The diuretic activity of furosemide was associated with hypokalemia. Topical honey application enhanced wound closure when compared with the Madecassol application.

**Conclusion:** The study is the first to report that honey collected from Tulkarm has a considerable diuretic effect without affecting serum electrolytes or kidney function test and exhibits strong antioxidant activity and wound healing property.

**Keywords:** furosemide, honey, kidney, Madecassol, wounds.

### Introduction

Data have shown that honey has antibacterial, antiviral, antiparasitic, antimutagenic, anti-inflammatory, anticancer, and antioxidant activities, and it has potential in the improvement of wounds, ulcers, diabetes, hypertension, and cardiovascular disease [1-10]. Honey has been mentioned in Holy books, the Talmud, both the old and new testaments of the Bible, and the Holy Quran as a healer of diseases. In the Surat Al-Nahel (The Bee) it says: *And your LORD taught the bee to build its cells in mountains, on tree and in men's habitations, then to eat of all the fruits of the earth and find with skill the spacious paths of its LORD, their issues from within their bellies, a drink of varying colors, wherein is*

*healing for men, verily in this is a sign for those who give thought.*

Studies have reported the beneficial effect of honey in kidney function and kidney pathology, particularly in diabetes. It has been found that in normal individual's oral honey collected in the United Arab Emirates increases urinary nitrite excretion, free water clearance, filtered sodium, and creatinine clearance. Furthermore, honey decreases urinary excretion of prostaglandins (PG) F2 alpha, thromboxane B2, and PG E2. On the contrary, artificial honey reduces urinary nitrite and raises urinary PG concentration [7]. Furthermore, carob honey collected in Morocco increases urine output and creatinine clearance during the acute or chronic mode of administration [8]. Interestingly, honey ingestion did not cause hypokalemia in spite of increased urine potassium and urine volume. In kidney diseases, Moroccan carob honey has a protective effect against lead-induced toxicity in rats; it ameliorated the elevation of serum creatinine and blood urea nitrogen induced by lead [9]. In addition, it was demonstrated that honey collected in the United Arab Emirates can protect liver and kidney

Copyright: Imtara, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

during acute blood loss, food restriction, and after carbon tetrachloride intoxication [10-14]. Other studies found that honey from different regions showed a protective effect in cisplatin, carbon tetrachloride, and cyclophosphamide-induced kidney toxicity [15-17]. Honey treatment improved the kidney function, increased antioxidant enzymes, and decreased lipid peroxide levels and improved the morphology of the kidney cells of the melamine-fed rats [18]. Pre-treatment with Sidr honey and silymarin before the administration of CCl<sub>4</sub> significantly prevented the increase of the serum levels of liver enzyme and reduced oxidative stress. Sidr honey has a significant lipid-lowering effect and it protected liver and kidney lesions [17]. In diabetic rats, administration of honey reduced mesangial matrix expansion and thickening of glomerular basement membrane [19].

Honey bees (*Apis mellifera*) collected honey from different plants, and the composition of honey depends on the type of plant, climate, and environmental conditions. Regarding the complementary medicine use in certain areas of Palestine, it was reported that 72.8% of participants in the northern part of Palestine have used at least one type of complementary medicine. It was concluded that alternative medicine utilization in Palestine is very common which includes honey [20]. However, few studies have been published so far regarding the quality and functional properties of honey collected in Palestine. One of these studies showed that ingestion of Palestinian honey induces spermatogenesis in rats by increasing epididymal sperm count, increases the relative weight of the epididymis and lactate dehydrogenase activity, and reduces sorbitol dehydrogenase activity [21]. Furthermore, the volatile compounds as markers in Palestinian honey have been studied [22,23].

The objectives of the present study included evaluation of the quality of honey through the determination of physical, chemical, and antioxidant property, the diuretic effect of honey compared to furosemide, the effect of honey on kidney function test, and the wound healing effect of honey compared to Madecassol. This is the first study to explore these variables in Tulkarm honey collected in Palestine. Tulkarem is a coastal city famous by citrus and avocado trees.

## Materials and Methods

### Ethical approval

The care and handling of rats and mice were in accordance with internationally recognized standards guidelines for the use of animals. The protocol was approved by the Institutional Committee on Animal Care following the French Technical Specifications for the Production, Care and Use of the Laboratory Animals, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculty of science, Dhar Mehrez, Fez, Morocco.

### Physicochemical analysis

Honey sample (Multifloral honey) was collected from the city of Tulkarm, Palestine. Analysis of sample

was carried out in triplicate for each test to determine the physicochemical properties (moisture content, total ash content, electrical conductivity, pH, free acidity, lactone acidity, proline, honey color, and melanoidin content). The measurements were achieved according to the International Honey Commission (IHC) [24]. The color was measured according to the method described earlier [25]. The degree of browning measured through the absorbance of samples between 420 and 450 nm is used to assess the extent to which the Maillard reaction occurs in foods, constituting one way to estimate the late-stage of the Maillard reaction products: The melanoidins [25].

### Analysis of antioxidant activity

The antioxidant activity of honey was determined by different methods such as total antioxidant capacity, the radical scavenging activity of the honey solution toward 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free radical and 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS<sup>•+</sup>), and ferric reducing antioxidant power [26-30]. All the assays were carried out in triplicate, and average values were considered. Several concentrations of samples were made, and the percentage inhibition and inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) (concentration of sample able to scavenge 50% of ABTS<sup>•+</sup> or DPPH radicals) were determined.

### Analysis of phenol, flavones, and flavonol

The total phenolic content was determined by the use of the Folin-Ciocalteu assay and total phenol content was expressed as mg gallic acid equivalents (GAEs)/100 g [26]. The total flavones and flavonol content were determined, and the results were expressed as mg quercetin equivalents (QEs)/100 g [31]. The antioxidant activities of honey samples were determined by the phosphomolybdenum method, and they were expressed relative to ascorbic acid (mg AAE/100 g) [32].

### Experimental animals

Eighteen Wistar rats weighing between 200 and 240 g were used for the evaluation of diuretic activity and 18 male mice weighing between 28 and 35 g were used to observe the wound healing effect. The animals were obtained from the animal house breeding center, Faculty of Sciences, Dhar Al-Mahraz, Fez, and were housed under normal environmental conditions (25±1°C 55±5% humidity and 12 h/12 h cycle light/dark). The animals were allowed free access to tap water and standard laboratory food.

### Reference drug

Furosemide (Lasilix, Pharma 5, Morocco) was used as a reference drug. Madecassol cream (Bayer laboratory, France) was used as reference drug for wound healing. One gram of Madecassol, 1% cream, contains contains 10 mg Centella asiatica; (reconstituted titrated dry extract containing asiaticoside; madecassic and asiatic acids)

### Biochemical methods

Blood samples were collected in capillary tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid by

retro-orbital puncture under light diethyl ether anesthesia. After centrifugation at 3500 RPM for 10 min, the plasma was separated and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. The levels of the blood and urine sodium, chloride and potassium were measured with the use of a spectrophotometer. Kidney function test was performed by estimation of serum creatinine, uric acid, and blood urea nitrogen. Osmolar clearance was determined from plasma osmolality, urinary osmolality, and urine flow according to the following formula:  $\text{Osmolar clearance} = \frac{\text{urinary osmolality} \times \text{urine flow}}{\text{plasma osmolality}}$ . Free water clearance was determined from plasma osmolality, urinary osmolality, and urine flow according to the following formula:  $\text{Free water clearance} = \frac{\text{urine volume (ml/min)} \times (1 - \frac{\text{urine osmolality}}{\text{plasma osmolality}})}{1}$ .  $T_{\text{CH}_2\text{O}}$  (free water reabsorption) was assessed by  $C_{\text{H}_2\text{O}}$  according to the following formula;  $T_{\text{CH}_2\text{O}} = - (C_{\text{H}_2\text{O}})$ .

#### Assessment of diuretic activity

Each animal was placed in an individual metabolic cage for a period of 3 days to adapt to the new conditions before the experiment. The rats were randomly divided into three groups, six animals each: Group 1 received oral administration of distilled water at a dose of 10 ml/kg.b.wt and served as the control group, Group 2 was treated with an oral dose of 10 mg/kg.b.wt of furosemide, and Group 3 received oral administration of 100 mg/kg.b.wt of the honey. After administration of the interventions, urine samples were collected and measured at 1, 2, 4, 6, and 24 h after the first dose of each intervention. Then after, daily oral doses were administered to three groups of rats for 11 days, and for each rat, 24 h urine was collected daily and its volume was measured. Urinary sodium, chloride, and potassium concentrations were measured in the urine specimens on day 11. Serum sodium, potassium, chloride, uric acid, and creatinine levels, blood urea nitrogen, and urinary creatinine excretion were measured on day 11. Other variables, including plasma and urine osmolality and free water clearance, were also measured on day 11.

#### Effect of honey on wound healing

The mice were anesthetized through intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (0.05 mg/g weight), and their dorsal hair was shaved off. A circular full-thickness skin wound (7.4 mm in diameter), which included the panniculus carnosus muscle, was performed on the skin of each mouse. The animals were divided into three groups six mice each: Group 1 (Control) no treatment; Group 2 (Madecassol group) received a daily application of Madecassol ointment applied directly to the skin; and Group 3 (the honey group) received a daily application of honey applied directly to the wounds. The wound healing was observed on days 1, 3, 7, and 12. The edges of the wounds were traced on polypropylene sheets, and photographs of the wounds were taken every day. The traces on the polypropylene sheets were then captured with a scanner and transferred to the computer using

the image processing software (Picture manager) to improve contrast. The area of each wound was calculated using the image analysis software Adobe Illustrator CS5 NA. The wound was treated daily by applying Madecassol. In honey group, the wound was treated daily by applying 0.1 ml of the honey (5 g of honey+1 ml of distilled water).

#### Statistical analysis

The results were expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analysis of the data was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test (ANOVA followed by Tukey's test) (GraphPad Prism, version 6). Significant differences were indicated by  $p < 0.05$ .

#### Results

##### The physicochemical parameters and antioxidant content

The physicochemical parameters of honey studied revealed that the pH is  $4.70 \pm 0.01$ , free acidity is  $42.17 \pm 2.08$  mEq/kg, lactone acidity is  $7.73 \pm 1.17$  mEq/kg, total acidity is  $49.89 \pm 1.24$  mEq/kg, the percentage of moisture is  $17.73 \pm 0.115\%$ , electric conductivity is  $1153.33 \pm 4.51$   $\mu\text{S/cm}$ , ash is 0.508%, color is  $0.18 \pm 0.03$ , melanoidin is  $0.44 \pm 0.02$ , and proline is  $448.81 \pm 5.06$  mg/kg. The classification of the honey depends on the value of Pfund scale ( $78.77 \pm 5.31$  mm) indicating that the honey is light amber.

The data showed that the level of polyphenol is  $78.79 \pm 1.43$  mg AGE/kg, flavones and flavonols are  $4.47 \pm 0.23$  mg QE/kg, and total antioxidant capacity is  $70.76 \pm 1.89$  mg AAE/g. The antioxidant activities results showed that the  $\text{IC}_{50}$  is  $17.14 \pm 1.40$  mg/ml for DPPH assay,  $3.16 \pm 0.70$  mg/ml for ABTS<sup>+</sup> assay, and  $1.32 \pm 0.03$  mg/ml for ferric reducing antioxidant power.

##### Effect of honey on urine and plasma electrolytes and urine volume and osmolality

Treatment with a single dose of Tulkarm honey increased urine output, which became significantly higher than the water at 4 h after the administration (Table-1). The urine output was increased significantly

**Table-1:** Urine volume during 11 days with daily oral administration of the interventions.

Days	Urine volume (ml/24 h)		
	Water	Honey	Furosemide
1	5.67 $\pm$ 0.34	6.50 $\pm$ 0.29 <sup>+</sup>	7.00 $\pm$ 0.58 <sup>+</sup>
2	6.00 $\pm$ 0.58	8.40 $\pm$ 0.06 <sup>++</sup>	8.17 $\pm$ 0.09 <sup>+</sup>
3	5.74 $\pm$ 0.21	7.53 $\pm$ 1.07 <sup>++</sup>	8.22 $\pm$ 0.62 <sup>++</sup>
4	6.78 $\pm$ 1.49	8.23 $\pm$ 0.79 <sup>++</sup>	9.22 $\pm$ 0.40 <sup>++</sup>
5	6.89 $\pm$ 1.49	10.40 $\pm$ 0.70 <sup>++</sup>	12.00 $\pm$ 0.58 <sup>++</sup>
6	7.20 $\pm$ 1.11	10.53 $\pm$ 0.24 <sup>++</sup>	12.33 $\pm$ 0.89 <sup>++</sup>
7	7.17 $\pm$ 1.60	11.90 $\pm$ 0.26 <sup>++</sup>	13.80 $\pm$ 0.42 <sup>++</sup>
8	6.88 $\pm$ 0.73	11.96 $\pm$ 0.55 <sup>++</sup>	15.67 $\pm$ 0.33 <sup>++</sup>
9	6.56 $\pm$ 1.09	12.50 $\pm$ 0.28 <sup>++</sup>	17.43 $\pm$ 0.29 <sup>++</sup>
10	6.78 $\pm$ 0.90	13.67 $\pm$ 0.34 <sup>++</sup>	18.83 $\pm$ 0.17 <sup>++</sup>
11	6.67 $\pm$ 1.20	15.00 $\pm$ 0.58 <sup>++</sup>	18.67 $\pm$ 0.60 <sup>++</sup>

<sup>+</sup> $p < 0.05$  in comparison to water at the same time interval.

<sup>++</sup> $p < 0.05$  in comparison to honey at the same time

interval. <sup>+</sup> $p < 0.05$  in comparison to day 1 in each group



by honey administration throughout the study period as compared to the water. Furosemide caused early and higher diuresis than honey. Furosemide caused a significant increase in the urine output in all the intervals, and it was more potent than honey.

A significant increase in the urinary volume was observed in all time intervals after the administration of honey or furosemide (Table-2). Furosemide was more potent than honey on days 7-11.

Honey caused a significant increase in the urine concentration of sodium and chloride, while the concentration of potassium did not change significantly (Figure-1). Furosemide caused a significant increase in the urine concentration of sodium, potassium, and chloride. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio for furosemide and honey was 0.90 and 0.95, respectively, as compared to 0.69 for the control. Furosemide caused significantly higher sodium and potassium urinary excretion than honey.

Honey did not cause significant changes in the plasma electrolytes, creatinine, uric acid, and blood urea nitrogen level. However, it caused a significant increase in the creatinine clearance during all the time intervals (Table-3 and Figure-2). Furosemide caused a significant decrease in the plasma potassium and chloride level in comparison with the water group. It also increased creatinine clearance in all time intervals, and in comparison to honey, it was less potent on day 11.

Honey did not cause a significant change in the plasma osmolarity. However, it caused significant increase in the urine osmolarity, osmolar clearance, and free water clearance compared to the control (Table-4). Furosemide increased free water clearance and osmolar clearance and decreased urine osmolarity.

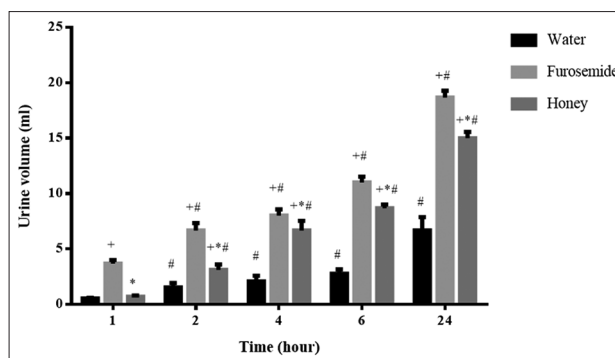
**Effect of honey on wound healing**

There was no significant difference in the diameter of the wounds treated with honey on day 1 and 3 as compared to the control (Figure-3). However, on days 7-12, the wounds treated with honey or Madecassol showed significantly smaller size than wounds treated with the control (p<0.05). On day 12, the size of

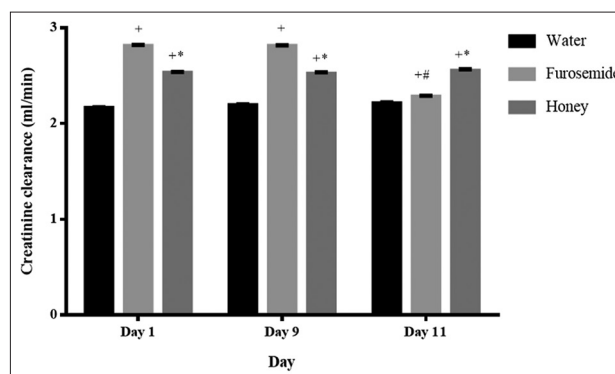
wounds treated with honey was less than sized of wounds treated with Madecassol, but the difference was statistically insignificant. Figure-4 demonstrated the macroscopical changes occurred during the treatment with interventions.

**Discussion**

The physicochemical analysis of the honey revealed that the pH value and the free acidity value



**Figure-1:** Urine volume (ml) after a single oral dose of each intervention. \*p<0.05 in comparison to water in each time interval. \*p<0.05 in comparison to furosemide in each time interval. #p<0.05 in comparison to urine volume at 1<sup>st</sup> h with the use of the same intervention.



**Figure-2:** Effect of daily oral administration of honey or furosemide on creatinine clearance. \*p<0.05 in comparison to water at the same time interval. \*p<0.05 in comparison to furosemide at the same time interval. #p<0.05 in comparison to day 1 in each group.

**Table-2:** Effect of oral administration of honey and furosemide on urine volume and electrolyte excretion on day 11.

Interventions	Urine volume (ml/24 h)	Urine electrolytes			Saluretic index			Diuretic index	Lipschitz value	Ratio Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>			
Water	6.6±1.20	169±0.5	243±0.64	242±0.57	1	1	1	1	-	0.69
Furosemide	15.00±0.58 <sup>+</sup>	278±3.7 <sup>+</sup>	308±3.0 <sup>+</sup>	281±1.1 <sup>+</sup>	1.65	1.26	1.16	2.8	-	0.90
Honey	18.6±0.6 <sup>+</sup>	233±3.7 <sup>+</sup> *	245±3.2 <sup>*</sup>	298±1.5 <sup>+</sup> *	1.38	1.00	1.23	2.25	0.80	0.95

<sup>+</sup>p<0.05 in comparison to water. \*p<0.05 in comparison to furosemide

**Table-3:** Effect of honey and furosemide on plasma electrolytes and kidney function test on day 11.

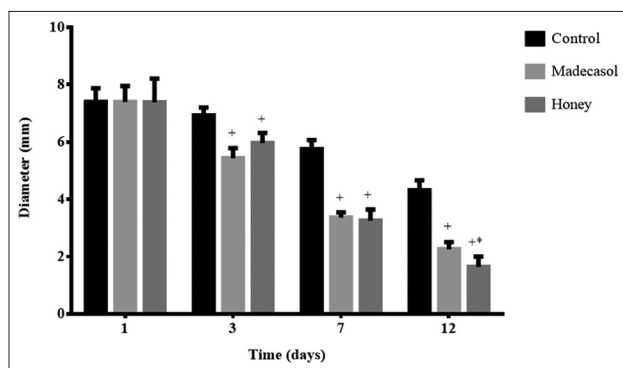
Interventions	Creatinine (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Na <sup>+</sup> mmol/l	K <sup>+</sup> mmol/l	Cl <sup>-</sup> mmol/l
Water	0.4±0.05	11.2±0.08	18±3	163±1.2	4.5±0.01	100±1
Furosemide	0.38±0.02	11.5±1.3	15±1	160±2.3	3.8±0.07 <sup>+</sup>	85±7.7 <sup>+</sup>
Honey	0.41±0.04	12±1.5	15±1	161±14	4.4±0.12	90±5.1 <sup>+</sup>

<sup>+</sup>p<0.05 in comparison to water. \*p<0.05 in comparison to furosemide

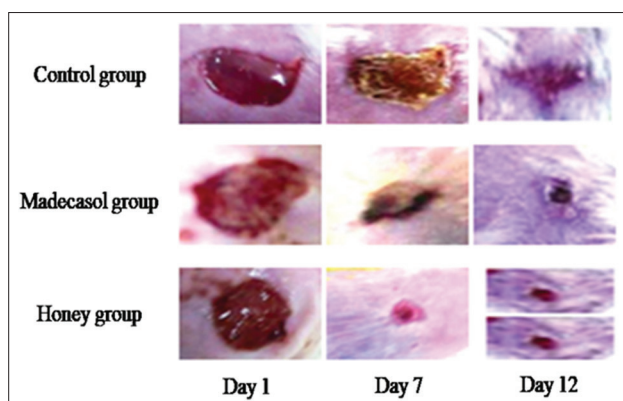
**Table-4:** Effect of daily administration of honey and furosemide on plasma osmolarity; urine osmolarity; osmolar clearance and clearance of free water on day 11.

Variables	Water	Honey	Furosemide
Urinary flow ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	4.6 $\pm$ 2.00	10.4 $\pm$ 2.80 <sup>+</sup>	12.9 $\pm$ 3.10 <sup>++</sup>
U <sub>osm</sub> (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	825.8 $\pm$ 12.1	957.2 $\pm$ 3.89 <sup>+</sup>	1172 $\pm$ 13.34 <sup>++</sup>
P <sub>osm</sub> (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	324.6 $\pm$ 7.5	322.6 $\pm$ 6.9	321.3 $\pm$ 8.8
C <sub>osm</sub> ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	11.7 $\pm$ 2.67	30.9 $\pm$ 3.50 <sup>+</sup>	47.27 $\pm$ 2.20 <sup>++</sup>
C <sub>H<sub>2</sub>O</sub> ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	-10.2 $\pm$ 1.30	-29.5 $\pm$ 2.34 <sup>+</sup>	-49.4 $\pm$ 4.29 <sup>++</sup>
T <sub>ch<sub>2</sub>O</sub> ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	10.2 $\pm$ 2.20	29.5 $\pm$ 3.90 <sup>+</sup>	49.4 $\pm$ 2.80 <sup>++</sup>

<sup>+</sup>p<0.05 in comparison to water. <sup>++</sup>p<0.05 in comparison to honey



**Figure-3:** Diameter (mm) of the wounds observed at each time interval following treatment by honey or Madecassol and compared with the control (no treatment). <sup>+</sup>p<0.05 in comparison to the control. <sup>++</sup>p<0.05 in comparison to Madecassol.



**Figure-4:** Macroscopic changes during wound healing with the use of various interventions.

were within the limits of European legislation and indicated the absence of undesirable fermentation [33,34]. The pH is acidic, and it is similar to honey pH found in other studies [35-38]. The determined acidity of honey is due to the presence of organic acids and inorganic ions.

The value of free acidity and lactone acidity is within the range of values of Moroccan honey samples that showed the values of free acidity, lactone acidity, and total acidity ranged from 11.0 to 42.5, 4.0 to 16.50, and 17.50 to 59.0, respectively [38]. The total acidity is the sum of free acidity and lactic acidity. It was similar to the multifloral Portuguese honey acidity and relatively higher than multifloral honey acidity from Morocco carob honey (49.89 $\pm$ 1.24 vs. 33.18 mEq/kg) [25,27].

Moisture percentage of the Tulkarm honey is below the average limit of  $\leq 20\%$  for blossom honey [35]. The moisture value of Palestinian honey is in accordance with values recommended by the IHC, in 2009, and the Codex Standard for Honey 2001 and was similarly compared with the values obtained for carob honey from Italy and Portugal and Morocco [27,36,38].

The percentage of ash in the honey was within the limits of Codex Alimentarius. The percentage of ash value depends on the mineral contents. Honey collected in Italy and Turkey showed almost similar ash content [36,39]. The ash content in various honey samples collected in Morocco ranged between 0.13% and 0.69%, and the largest value was detected in carob honey from Taounate Region (0.69 $\pm$ 0.01%) [38].

The electrical conductivity is a useful parameter to determine the botanical origin of honey and the difference between nectar and honeydew [33]. The electrical conductivity depends on the mineral content of the honey. The value found in the honey sample was higher than the maximum limits defined by the Codex Alimentarius Commission [40]. It was found that the electrical conductivity of honey samples from Morocco varied in the range of 0.36 mS/cm-1.35 mS/cm [38]. High values were found in carob honey from Taounate Region (1.35 $\pm$ 0.03 mS/cm).

Phenolics compounds are important bioactive molecules found in honey. The total phenol and flavonoid (flavones and flavonols) contents of eight different Moroccan honey samples varied from 755.2 to 2452.2 mg GAE/kg and 22.6 to 47.9 mg QE/kg, respectively [38]. Therefore, the flavones and flavonols found in Tulkarm honey were higher than the range of eight Moroccan honeys while polyphenols were within the range of the Moroccan honeys. Furthermore, the phenolic content of Tulkarm honey samples was higher than that reported in honey from Yemen (751.3-2462.1 mg/kg), Brazil (611.6-1113.7 mg GAE/kg), India (490-980 mg GAE/kg), Serbia (274.4-614.2 mg GAE/kg), and Algeria (158.4-616.3 mg/kg) [41-44].

The IC<sub>50</sub> value of ABTS<sup>•+</sup> was 3.16 $\pm$ 0.70 mg/ml; this value is within four multifloral Moroccan honeys and less than two Portugal multifloral honeys [25,27]. The IC<sub>50</sub> value of DPPH was 17.14 $\pm$ 1.40 mg/ml which is higher than Polish multifloral honeys and less than Slovenian honey [30,45].

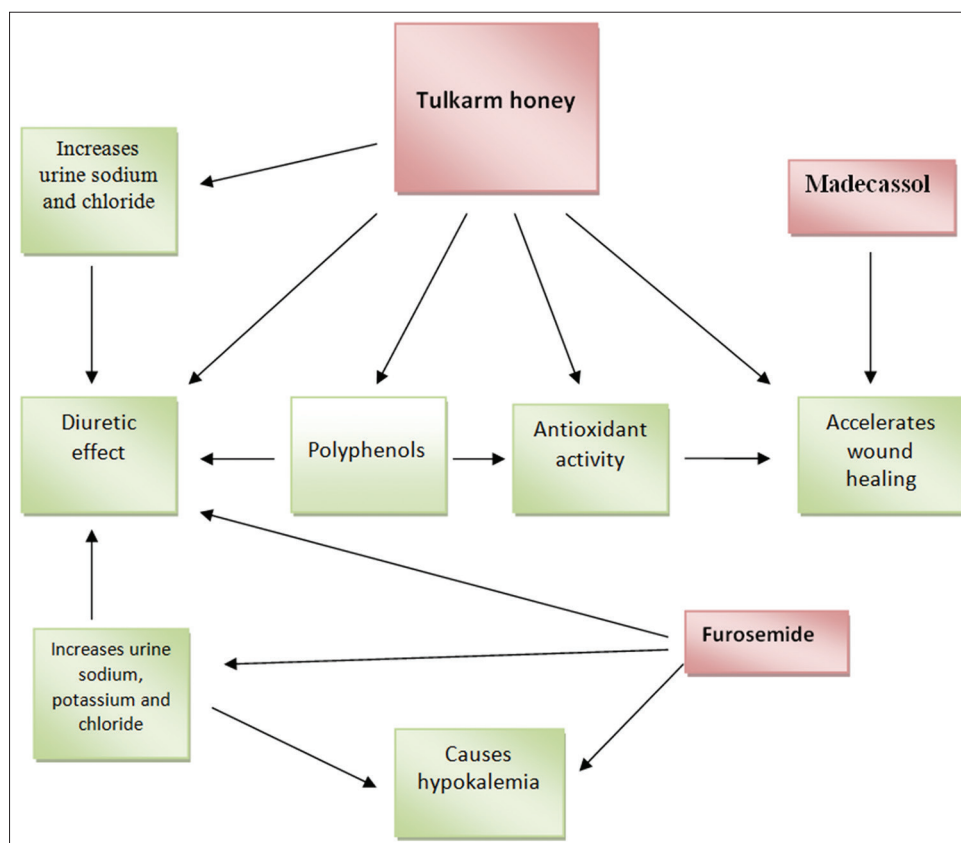
It was found that the total antioxidant power of carob honey varied from 35.03 mg AAE/g to 60.94 mg AAE/g, which is less than that of Tulkarm honey [38]. The concentration of Tulkarm honey required to inhibit 50% of DPPH was higher than the concentration of carob honey (12.54 mg/ml and 23.10 mg/ml), Serbian honey (11.16-48.48 mg/ml), and Turkish honey (12.56-152.40 mg/ml) [38,41,46]. The reducing power of Tulkarm honey was lower than reducing the power of carob honey (1.87 mg/ml-4.40 mg/ml) [38].

Furosemide increases urinary output and urinary excretion of sodium, potassium, and chloride by inhibiting  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  symporter (cotransporter system) in the thick ascending limb of the Loop of Henley [47]. The study reveals that honey demonstrates a significant diuretic activity. Honey causes a significant increase in urine concentration of sodium and chloride, while the concentration of potassium did not change significantly. However, furosemide causes a significant increase in the urine concentration of sodium, potassium, and chloride as well as hypokalemia. Therefore, the action of honey is almost similar to thiazide diuretics, which increase the excretion of sodium and chloride by inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  symporter (cotransporter system) in the distal convoluted tubule [47]. Interestingly, contrary to thiazide and furosemide, honey did not cause hypokalemia that is a common side effect of loop or thiazide diuretics. This might be due to high levels of potassium presents in honey [5,38]. It was found

that honey increases urine excretion of nitric oxide, and consequently, it was proposed that the diuretic effect of honey, partly, is due to increased urinary nitric oxide concentration [7]. Honey collected from Palestine shares the same diuretic activity with honey samples collected from Morocco and United Arab Emirates [7,8].

Several studies showed that flavonoids have been linked to the diuretic effects [48,49]. This might explain, in part, the diuretic activity of honey. The glucose and fructose in honey might cause diuresis. However, we found that artificial honey causes insignificant changes in the urine volume in healthy individuals [7].

Regarding the wound healing potential of the Palestinian honey, the macroscopic examination of the wound reveals a significant decrease in the diameter of the wounds treated by honey as compared with wounds treated with Madecassol. The healing property of honey is mainly due to its anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activity [50,51]. Furthermore, its acidity and hyperosmolarity, as well as the bioactive molecule such as flavonoids, hydrogen peroxide, glucose oxidase, gluconic acid, and MGO, play a major role in its activity [50,52,53]. The wound healing activity could also be due to inhibition of PG, stimulation of nitric oxide and modulating the release of anti-inflammatory cytokines and growth factors by monocytes [54,55]. Madecassol was used to compare its effect with honey. It is



**Figure-5:** The effect of Tulkarm honey on wound healing and diuresis.

commonly used products for burn, skin wrinkles, and wound management [56,57]. Their most beneficial effect appears to be the stimulation of maturation of scar by the production of Type I collagen and resulting decrease in the inflammatory reaction and myofibroblast production.

### Conclusion

The findings showed, the physicochemical characterization, antioxidant and wound healing property, and diuretic effect of honey collected from Tulkarm, Palestine (Figure-5). Tulkarm honey contains phenols, flavonols, and flavones, and it exhibits considerable antioxidant activity. It also has a diuretic effect without affecting serum electrolytes or kidney function test. As compared to Madecassol, Tulkarm honey showed significant wound healing properties, which might be due to its antioxidant activity, acidity, nutritional content, or other factors such as anti-inflammatory and antimicrobial activity.

### Authors' Contributions

HI, MB, and BL involved in the design and conception of the experimental protocols and participated in the experimental work; NA and WA wrote the paper and prepared for publication, conducted the statistical analysis of the work, and did acquisition and interpretation of the data. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environmental Health, Faculty of Sciences, Dhar El Mehraz, for providing the facilities to carry out the research work, and to New York Medical Care for Nephrology, (N Al-Waili MD, PhD), NY, USA for paying the publication fee. The study was not supported by any fund or grant.

### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

- Iqbal, M., Anjum, A., Ali, M., Hussain, F., Ali, S., Muhammad, A., Irfan, M., Ahmad, A., Irfan, M. and Shabbir, A. (2015) Assessment of microbial load of unpasteurized fruit juices and *in vitro* antibacterial potential of honey against bacterial isolates. *Open Microbiol. J.*, 9(2): 26-32.
- Yaghoobi, R., Kazerouni, A. and Kazerouni, O. (2013) Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-viral agent: A review. *Jundishapur. J. Nat. Pharm. Prod.*, 8(2): 100-104.
- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D. and Miguel, M. (2013) Physicochemical characterization and antioxidant activity of 31 Moroccan honeys. *J. Food Biochem.*, 13(1): 1-32.
- Al-Waili, N.S., Al-Waili, F.S., Akmal, M., Ali, A., Salom, K.Y. and Al Ghamdi, A.A. (2014) Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. *Arch. Med. Sci.*, 12(3): 246-250.
- AL-Waili, N., Al Ghamdi, A., Ansari, M.J., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A. and Salom, K. (2013) Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Arch. Med. Res.*, 44(4): 307-316.
- Al-Waili, N.S. (2004) Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in healthy, diabetic, and hyperlipidemic subjects: Comparison with dextrose and sucrose. *J. Med. Food*, 7(1): 100-107.
- Al-Waili, N. (2005) Effects of honey on the urinary total nitrite and prostaglandins concentration. *Int. Urol. Nephrol.*, 37(1): 107-111.
- El-Haskoury, R., Zizi, S., Touzani, S., Al-Waili, N., Al-Ghamdi, A. and Lyoussi, L. (2015) Diuretic activity of carob honey (*Ceratonia siliqua* L); Comparison with furosemide. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 12(2): 128-133.
- Fihri, A., Al-Waili, N.S., El-Haskoury, R., Bakour, M., Amarti, A., Ansari, M.J. and Lyoussi, B. (2016) Protective effect of morocco carob honey against lead-induced anemia and hepato-renal toxicity. *Cell. Physiol. Biochem.*, 39(1): 115-122.
- Al-Waili, N.S., Saloom, K.Y., Akmal, M., Al-Waili, F., Al-Waili, T.N., Al-Waili, A.N. and Ali, A. (2006) Honey ameliorates influence of hemorrhage and food restriction on renal and hepatic functions, and hematological and biochemical variables. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 57(4): 353-362.
- Al-Waili, N.S., Saloom, K.Y., Al-Waili, T.N., Al-Waili, A.N., Akmal, M., Al-Waili, F.S. and Al-Waili, H.N. (2006) Influence of various diet regimens on deterioration of hepatic function and hematological parameters following carbon tetrachloride: A potential protective role of natural honey. *Nat. Prod. Res.*, 20(12): 1258-1264.
- Al-Waili, N.S. (2003) Intravenous and intrapulmonary administration of honey solution to healthy sheep: Effects on blood sugar, renal and liver function tests, bone marrow function, lipid profile, and carbon tetrachloride-induced liver injury. *J. Med. Food*, 6(2): 231-247.
- Al-Waili, N.S., Saloom, K.Y., Akmal, M., Al-Waili, F., Al-Waili, T.N., Al-Waili, A.N. and Ali, A. (2006) Honey ameliorates influence of hemorrhage and food restriction on renal and hepatic functions, and hematological and biochemical variables. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 57(5-6): 353-362.
- El Denshary, E.S., Al-Gahazali, M.A., Mannaa, F.A., Salem, H.A., Hassan, N.S. and Abdel-Wahhab, M.A. (2012) Dietary honey and ginseng protect against carbon tetrachloride-induced hepatonephrotoxicity in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 64(7): 753-760.
- Hamad, R., Jayakumar, C., Ranganathan, P., Mohamed, R., El-Hamamy, M.M., Dessouki, A.A., Ibrahim, A. and Ramesh, G. (2015) Honey feeding protects kidney against cisplatin nephrotoxicity through suppression of inflammation. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 42(8): 843-848.
- Zoheir, K.M., Harisa, G.I., Abo-Salem, O.M. and Ahmad, S.F. (2015) Honeybee is a potential antioxidant against cyclophosphamide-induced genotoxicity in albino male mice. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28(3): 973-981.
- Al-Yahya, M., Mothana, R., Al-Said, M., Al-Dosari, M., Al-Musayeb, N., Al-Sohaibani, M., Parvez, M.K. and Rafatullah, S. (2013) Attenuation of ccl4-induced oxidative stress and hepatonephrotoxicity by Saudi Sidr honey in RATS. *Evid. Based Complement Altern. Med.*, 2013: 569037.
- Al-Seenii, M.N., El Rabey, H.A. and Al-Solamy, S.M. (2015) The protective role of bee honey against the toxic effect of melamine in the male rat kidney. *Toxicol. Ind. Health*, 31(6): 485-493.
- Erejuwa, O.O., Gurtu, S., Sulaiman, S.A., Ab Wahab, M.S., Sirajudeen, K.N. and Salleh, M.S. (2010) Hypoglycemic

- and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 80(1): 74-82.
20. Sawalha, A.F. (2007) Complementary and alternative medicine (CAM) in Palestine: Use and safety implications. *J. Altern. Complement Med.*, 13(2): 263-269.
  21. Abdul-Ghani, A.S., Dabdoub, N., Muhammad, R., Abdul-Ghani, R. and Qazzaz, M. (2008) Effect of Palestinian honey on spermatogenesis in rats. *J. Med. Food*, 11(4): 799-802.
  22. Odeha, I., Abu-Lafia, S., Dewika, H., Al-Najjara, I., Imamb, A., Dembitskyc, V. and Hanušc, L.A. (2007) Variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgate*. *Food Chem.*, 101(11): 1393-1397.
  23. Odeh, I., Abu-Lafi, S. and Al-Najjar, I. (2013) Determination of potential volatiles markers from citrus, eucalyptus, cotton and wildflower Palestinian honeys using SPME followed by GCMS analysis. *Int. Food Res. J.*, 20(11): 1243-1247.
  24. Bogdanov, S. (2002) Harmonized Methods of the International Honey Commission. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld.: <http://www.ihc-platform.net/ihc-methods2009.pdf>.
  25. Borrell, R., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M. and Fogliano, V. (2002) Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.*, 50(12): 6527-6533.
  26. Gorjanovic, S., Alvarez-Suarez, J., Novakovic, M., Pastor, F., Pezo, L., Battino, M. and Suznjevic D. (2013) Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *J. Food Comp. Anal.*, 30(1): 13-18.
  27. Aazza, S., Lyoussi, B., Antune, D. and Miguel, M. (2013) Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial Portuguese honeys. *J. Food Sci.*, 78(12): 1159-1165.
  28. Miguel, M., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D. and Lyoussi, B. (2014) Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.*, 23(1): 313-322.
  29. Sarmento, S., Pereira, D.S., Adriana, E., Sarmento, D., Sarmento, D. and Santos, D. (2013) Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. *J. Food Comp. Anal.*, 29(1): 10-18.
  30. Padmanabhan, P. and Jangle, S.N. (2012) Evaluation of DPPH radical scavenging activity and reducing power of four selected medicinal plants and their combinations. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, 4(2): 143-146.
  31. Marghitas, A., Stanciu, G., Dezmiorean, S., Bobis, B., Olimpia, P., Stefan, B. and Graca, C. (2009) *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem.*, 115(9): 878-883.
  32. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formulation of a phosphomolybdenum complex: Specific application of Vitamin E. *Anal. Biochem.*, 269(3): 337-341.
  33. Bogdanov, S., Ruoff, K. and Oddo, L.P. (2004) Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35(1): S4-S17.
  34. EU Council. (2002) Council directive 2001/11 O/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Off. J. Eur. Commun.*, L 10(1): 47-52.
  35. Aazza, S., Lyoussi, B., Antune, D. and Miguel, M. (2014) Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 65(4): 449-457.
  36. Ferrauto, G. and Pavone, P. (2013) Palynological, physicochemical and organoleptic characteristics of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) honey from Sicily. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 48(12): 1596-1602.
  37. Gomes, S., Dias, L., Moreira, L., Rodrigues, P. and Estevinho, L. (2010) Physicochemical, microbiological, and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food Chem. Toxicol.*, 48(4): 544-548.
  38. El-Haskoury, R., Kriaa, W., Lyoussi, B. and Makni, M. (2018) *Ceratonia siliqua* honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. *J. Food Drug Anal.*, 26(1): 67-73.
  39. Yücel, Y. and Sultanog, P. (2013) Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Biosci.*, 1(1): 16-25.
  40. Codex Alimentarius Commission. (2001) Revised codex standard for honey, codex STAN 12-1981, Rev. 1 1987, Rev. 2 2001. *Codex Stand.*, 12(1): 1-7.
  41. Cetkovic, G., Saponjac, V., Stajcic, S., Vulic, J., Djilas, S., Stajner, D. and Popović, B. (2014) Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and sensory characteristics of Serbian honey-based product. *Ind. Crop. Prod.*, 62(1): 1-7.
  42. Saxena, S., Gautam, S. and Sharma, A. (2010) Physical, biochemical, and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem.*, 118(3): 391-397.
  43. Mouhoubi-Tafinine, Z., Ouchemoukh, S. and Tamendjari, A. (2016) Antioxidant activity of some Algerian honey and propolis. *Ind. Crop. Prod.*, 88(1): 85-90.
  44. Al-Mamary, M., Al-Meer, A. and Al-Habori, M. (2002) Antioxidant activities and total phenolics of different types of honeys. *Nutr. Res.*, 22(12): 1041-1047.
  45. El-Guendouz, S., Al-Waili, N., Aazza, S., Elamine, Y., Zizi, S., Al-Waili, T. and Lyoussi, B. (2017) Antioxidant and diuretic activity of co-administration of *Capparis spinosa* honey and propolis in comparison to furosemide. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 10(11): 974-980.
  46. Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E.A., Silici, S. and Kolayli, S. (2015) An investigation of Turkish honeys: Their physicochemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chem.*, 180(2): 133-141.
  47. Jackson, E. (1996) Drugs affecting renal and cardiovascular function. In: Hardman, J.C., Gilman, A.G. and Limbird, L.E. (Eds.). Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 9<sup>th</sup> ed. Pergamon Press, New York. p685-713.
  48. Jouad, H., Lacaille-Dubois, M., Lyoussi, B. and Eddouks, M. (2001) Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, 76(2): 159-163.
  49. Wu, J. and Muir, A. (2008) Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soybean angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J. Agric. Food Chem.*, 56(12): 9899-9904.
  50. Hadagali, M. and Chua, L. (2014) The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. *Eur. Food Res. Technol.*, 23(9): 1003-1014.
  51. Vallianou, N., Gounari, P., Skourtis, A., Panagos, J. and Kazazis, C. (2014) Honey and its anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant properties. *Gen. Med. (Los Angel)*, 291(2): 1-5.
  52. Bashkaran, K., Zunaina, E., Bakiah, S., Sulaiman, S., Sirajudeen, K. and Naik, V. (2011) Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: Experimental animal study. *BMC Complement Altern. Med.*, 11(1): 1-11.
  53. Atrott, J. and Henle, T. (2009) Methylglyoxal in Manuka honey - Correlation with antibacterial properties. *Czech. J. Food Sci.*, 27: S163-S165.
  54. Tonks, A.J., Cooper, R.A., Jones, K.P., Blair, S., Parton, J. and Tonks, A. (2003) Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 21(3): 242-247.
  55. Al-Waili, N. and Boni, N. (2003) Natural honey lowers

- plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J. Med. Food*, 6(2): 129-133.
56. Shetty, B.S., Udupa, S.L. and Udupa, A.L. (2008) Biochemical analysis of granulation tissue in steroid and *Centella asiatica* (Linn) treated rats. *Pharm. Online*, 2(6): 624-632.
57. Lee, J., Jung, E., Lee, H., Seo, Y., Koh, J. and Park, D. (2008) Evaluation of the effects of a preparation containing asiaticoside on periocular wrinkles of human volunteers. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 30(3): 167-173.

\*\*\*\*\*

**Chemical composition and antioxidant content of *Thymus vulgaris* honey and *Origanum vulgare* essential oil; their effect on CCL<sub>4</sub> - induced toxicity**

Hamada Imtara (1), Noori Al-Waili (2), Abderrazak Aboulghazi (1), Abdelfattah Abdellaoui (1), Thia Al-Waili (2), Badiaa Lyoussi (1)

1. Laboratory of Physiology, Pharmacology and Environmental Health, Faculty of Sciences  
Dhar El Mehraz, BP 1796 Atlas, University Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fez 30 000,  
Morocco.
2. New York Medical Care for Nephrology, New York, USA

Correspondence

Noori AL-Waili MD, PhD  
New York Medical Care for Nephrology  
Richmond Hill, New York 11418  
Phone; 001-347-666-1144  
Fax; 001-718-850-9405

## Abstract

The study was conducted to investigate the chemical composition, antioxidant content and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* honey (TVH) and *Origanum vulgare* essential oil (OVEO) and their effect on carbon tetrachloride (CCL<sub>4</sub>)-induced toxicity. Physico-chemical characterization and chemical analysis of TVH and OVEO were conducted with the use of GC/MS and HPLC. The antioxidant activity of TVH and OVEO was done with the use of DPPH radical scavenging activity. To investigate the effect of TVH, OVEO and mixture of TVH and OVEO (HEM) on CCl<sub>4</sub>-induced toxicity, nine groups of rats were used. Intraperitoneal injection of CCL<sub>4</sub> (1 ml/100g) was used to induce toxicity. TVH and OVEO were used in doses of 1 mg/kg.b.wt, and 50 mg/kg.b.wt respectively, and HEM that contains TVH (1 mg/kg.b.wt) and OVEO (50 mg/kg.b.wt) was used in CCL<sub>4</sub>-treated and untreated rats. TVH has a high content of phenols, flavonoids, and favonol. HPLC analysis showed that TVH contain, for the first time, epicatechin gallate, and at a high concentration. OVEO contains a high percentage of carvacrol and thymol. With the use of DPPH, OVEO was more potent than TVH. CCL<sub>4</sub> caused significant liver and kidney damage and lipid disorders, which were ameliorated by HVT, OVEO and HEM. HVT was more potent than OVEO ( $p < 0.05$ ), and HEM was more potent than HVT and OVEO ( $p < 0.05$ ). It was concluded that high content of epicatechin gallate was identified for the first time in TVH, and OVEO contains a high percentage of thymol and carvacrol. Epicatechin gallate might be useful as a marker for TVH. Mixing OVEO and TVH significantly potentiated their protection against CCL<sub>4</sub> induced liver and kidney toxicity.

**Keyword:** Thymus honey, Antioxidants, CCL<sub>4</sub>, Toxicity, *Origanum vulgare*, essential oil



## **1.Introduction**

TVH is unifloral honey, which has antimicrobial activity and wound healing property, and it is effective in the management of radiation-induced mucositis and xerostomia in head and neck cancer patients [1-3]. *Origanum vulgare* is one of the species of *Origanum*. Recent review showed that *Origanum vulgare* has anti-cancer, anti-inflammatory, antiproliferative, antibacterial and hepatoprotective effect [4].

CCl<sub>4</sub> is a volatile organic alkyl halogen, which is very toxic to liver and kidney and used experimentally to induce liver and kidney damage. Others and we have found that honey has a protective effect against CCl<sub>4</sub>-induced liver and kidney toxicity [5-7]. Furthermore, honey has a protection against lead-induced kidney and liver toxicity [8,9]. The hepato-protective activity of *Origanum vulgare* leaves extract against CCl<sub>4</sub>- induced hepatotoxicity in rats has been reported [10]. However, there is no study investigated the effect of TVH or OVEO on CCl<sub>4</sub>-induced liver and kidney toxicity. Therefore, the protective effect of TVH, OVOE and their combination (HEM) against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats was investigated.

Honey has been mentioned in Holy books, the Talmud, the Bible, and the Quran as a healer of human diseases. In the Surat Al-Nahel (the Bee chapter) it says (translating the meaning):*[and thy LORD taught the bee to build its cells in mountains, on tree and in men's habitations, then to eat of all the fruits of the earth and find with skill the spacious paths of its LORD, there issues from within their bodies a drink of varying colors, wherein is healing for men, verily in this is a sign for those who give thought]*. It was well known that the chemical composition of various honey samples is different [11,12] Therefore, this study was designed to identify the chemical components and antioxidant activity of TVH collected in Morocco as well as OVEO. The study showed for the first time the presence of epicatechin gallate in TVH collected in Fez, boulemane, Morocco, and the ability of TVH, OVEO and HEM to protect against CCl<sub>4</sub> induced liver and kidney damage.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Honey samples**

Honey of *Thymus vulgaris* (Zaitra; Arabic name) was purchased from beekeepers , Fez, boulemane, Morocco. The honey sample was collected in year 2015 and stored at room temperature (22–24 °C) until analysis.

## **2.2. Essential oil Extraction**

Aerial part of *Origanum vulgare L* plant was bought from herbalist, Imouzzar, boulemane, Morocco. The extraction of the essential oil was carried out by hydro-distillation in a clewenger-type apparatus and was stored at 4 ° C in the presence of anhydrous sodium sulphate.

## **2.3. Physicochemical and antioxidant content of honey**

Free acidity, pH, ash, electrical conductivity and moisture were measured in the TVH samples. The measurements were carried out according to the International Honey Commission IHC [13]. The color and melanoidins content were determined according to the method described by Naab et al. [14]. The mineral content was measured according to the method described by Terrab et al. [15]. The total phenol content was determined according to the method described by Singleton and Rossi [16]. The result of phenol content was expressed as the mg gallic acid/100g of honey. The total flavonoid content was determined according to the method described by Samatha et al. [17]. The result of flavonoid content was expressed as mg quercetin /100g of honey (mg Eq Q /100 g). Total flavonol content was determined according to the method described by Sugathakumar et al [18]. The flavonol content was expressed as mg quercetin equivalent per 100 g of the honey mass (mg Eq Q /100 g). The total antioxidant capacity was estimated by the phosphomolybdenum method according to the procedure described by Pilar P et al. [19]. Total antioxidant capacity content was expressed as mg of ascorbic acid equivalent per 100 g of the honey mass (mg AA/100g).

## **2.4. Antioxidant activity of TVH and OVEO**

The antioxidant activity of TVH and OVEO was determined with the use of 1,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity according to the method by Brand-Williams W et al. [20] . Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a standard. Based on each sample, IC50 was determined (concentration of samples able to scavenge 50% of DPPH free radicals).

## **2.5. Identification of phenolic compounds of TVH by HPLC.**

Honey sample was subjected to base hydrolysis and extracted with ethyl acetate (liquid-liquid extraction) as described by Aljadi and Yousoff [21]. Pure compounds that used as standards included caffeic acid, gallic acid, epicatechin gallate, coumaric acid, rosmoric acid, ferulic acid, syringic acid, tannic acid and pyrogallol. Phenolic compounds of honey were identified by comparing their retention times with those of pure standards. The results obtained in mg/100g of honey.

## **2.6. Gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) analysis of OVEO**

The OVOE sample was diluted in hexane with a dilution of 10:100. The analysis of volatile constituents was completed using GC/MS method (GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 210729), equipped with an HP-5MS column nonpolar fused silica (60 m × 0.32 mm, 0.25 mm thickness). The identification of the components has been made by determination of their indices of retention Kovate index (Ki) compared to a Kovate index of a series of n-alkanes (C8-C20) and by comparing their mass spectra recorded with those stored in the database of the spectrometer (NIST MS Library v. 2.0), and the literature [22].

## **2.7. Effect of TVH, OVEO and their mixture in CCL<sub>4</sub>-induced toxicity**

### **2.7.1. Animals**

Forty-five adult male Wister rats ( $221 \pm 22$  g) were used. The animals were kept in a diffusely lit and temperature-controlled room with a diurnal 12 h light cycle, where the temperature ( $25 \pm 1$  °C) and relative humidity ( $55 \pm 5\%$ ) were kept constant. All the experimental proceedings achieved in laboratory animals in this study were in agreement with the internationally accepted standard guidelines for use of animals. The protocol was approved by the institutional committee on animal care following the French Technical Specifications for the Production, Care and Use of the Laboratory Animals, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fez, Morocco.

### **2.7.2. Preparation of honey-essential oil mixture**

OVEO was dissolved in tween 80 and TVH was dissolved in water and mixed together. One ml of HEM containing TVH (1g/kg.b.wt) and OVEO (50 mg/kg.b.wt) was used and delivered to the animals by gavage.

### **2.7.3. Study Design**

The experimental animals received intraperitoneal injections of CCL<sub>4</sub> (1 ml/100g.b.wt) dissolved in olive oil, 10% solution, twice per week for 2 weeks. The administration of TVH, OVEO and HEM was started on the first day of CCL<sub>4</sub> administration and was continued for 2 weeks.

The animals were randomly divided into nine groups, five animals each, as follows:

Group I (water): the animals received drinking water 1 ml/kg.b.wt every day by gavage

Group II (Tween 80): the animals received Tween 80 (2%) by gavage (1ml/kg.b.wt) every day.

Group III (TVH): the animals received TVH by gavage (1g/kg.b.wt) every day.

Group IV (OVEO): the animals received OVEO by gavage (50 mg/ kg.b.wt) every day.

Group V (HEM): the animals received HEM 1 ml/kg.b.wt by gavage every day.

Group VI (CCl<sub>4</sub>): the animals received CCl<sub>4</sub>.

Group VII (CCl<sub>4</sub>+ TVH): the animals received CCl<sub>4</sub> and treated with TVH by gavage at a dose of 1g/kg.b.wt every day.

Group VIII (CCl<sub>4</sub> + OVEO): the animals received CCl<sub>4</sub> and treated with OVEO by gavage at a dose of 50 mg /kg.b.wt every day.

Group IX (CCl<sub>4</sub> + HEM): the animals received CCl<sub>4</sub> and treated with HEM by gavage every day.

At the end of the treatment period (2 weeks), the animals were sacrificed. Blood samples were collected in centrifuge tubes without anticoagulants and allowed to clot. The clotted blood was centrifuged at 4000 x g for 20 min. Serum was separated for biochemical analyses.

## **2.8. Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  SD. statistical analysis was carried out by ANOVA with the use of GraphPad prism 6 programs.  $P < 0.05$  was statistically significant.

## **3. Results**

### **3.1. Physicochemical properties of HTV and OVEO**

The physicochemical parameters of honey showed that the pH was  $3.90 \pm 0.01$ , free acidity was  $37.93 \pm 2.25$  mEq/kg, moisture was  $16.4 \pm 0.01\%$ , electric conductivity was  $449 \pm 1731$   $\mu$ S/cm, ash was  $0.24 \pm 0.01$  %, and melanoidin was  $1.10 \pm 0.02$ . The Pfund scale value was  $0.33 \pm 0.01$ , which indicated that the color was dark amber.

Mineral content analysis of honey showed that the concentration of potassium was  $829.55 \pm 0.51$  mg/kg, sodium was  $256.32 \pm 0.15$  mg/kg, magnesium was  $61.47 \pm 0.21$  mg/kg, and calcium was

166.22± 0.09 mg/kg. OVEO analysis showed that the pH was 5.02; density was 0.9484 g/ml and refractive index was 1.5153.

### **3.2. Phenol, flavonoid and flavonol content of TVH**

The value of phenol content was 74.05 ± 1.21 mg AGE/100g, flavonoids content was 59.34± 1.08 mg Eq Q/100g, and favonol was 15.08 ± 0.04 mg Eq Q/100g.

The honey was analyzed via HPLC under the same chromatographic conditions (**Fig. 1**). The analysis showed that the concentration of caffeic acid was 0.033 ± 0.00 mg/100 g, ferulic acid was 0.68 ± 0.021 mg/100g, galic acid was 2.86 ± 0.046 mg/100g, epicatechin gallate was 6.91 ± 0.05 mg/100g and pyrogallol was 3.5±0.09 mg/100g. The analysis of honey did not show syringic acid, tannic acid, coumaric acid, or rosmoric acid

### **3.3. Antioxidant activity of TVH and OVEO**

The total antioxidant capacity of TVH was 163.51 ± 8.55 mg Eq AA/g. The IC<sub>50</sub> value of BHT was 0.009 ± 0.0001 mg/ml in the DPPH assay. However, the IC<sub>50</sub> value of OVEO was 0.30 ± 0.02 mg/ml and of TVH was 10.85 ± 0.02, which means that the DPPH scavenging activity of OVEO was higher than that of TVH ( $p < 0.05$ ).

### **3.4. Gas chromatography–mass spectrometry analysis OVEO.**

The **table 1** showed the results of the gas chromatography/mass spectrometry analysis of OVEO. The analysis showed the presence of 26 compounds and 92.45 % of essential oil has been identified. The major constituents of the oil were carvacrol (48.38%), thymol (26.55%),  $\gamma$ -Terpinene (7.9%), and 1,8-Cineol (4.86%).

### **3.5. The effect of TVH, OVEO and HEM on CCL<sub>4</sub>-induced toxicity.**

TVH decreased significantly AST and ALT ( $p < 0.05$ ) (Table 2). HEM caused a significant lowering of AST, ALT, AP, and significantly increased total protein as compared to the control group ( $p < 0.05$ ). Regarding the renal function and electrolytes, TVH, OVEO and HEM did not cause significant changes in blood urea, creatinine, sodium, potassium and calcium. Lipid assay showed that HEM lowered TC, LDL and VLDL and elevated HDL as compared to the control, the changes in TC level was significant ( $p < 0.05$ ).

In CCL<sub>4</sub>-treated rats, CCl<sub>4</sub> caused a significant elevation of AST, ALT, AP, and total and direct bilirubin, and caused a significant lowering of total protein ( $p < 0.05$ ) (**Table 3**). TVH, OVOE and HEM significantly ameliorated these changes. TVH was more potent than OVEO and HEM was more potent than TVH and OVEO individually ( $p < 0.05$ ). CCL<sub>4</sub> significantly elevated blood urea, creatinine, sodium, potassium and calcium, while TVH, OVOE and HEM significantly decreased all these parameters. TVH was more potent than OVOE and HEM was more potent than TVH and OVOE ( $p < 0.05$ ). Lipid assays revealed that CCL<sub>4</sub> significantly increases all the lipid parameters and decreased significantly HDL. However, TVH, OVOE and HEM significantly lowered the elevated lipid parameters as well as elevated the lowered HDL. TVH was more potent than OVOE and HEM was more potent than TVH and OVOE ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The data presented here demonstrated for the first time the presence of epicatechin gallate in TVH, and the protective effect of TVH, OVEO and their combination against CCl<sub>4</sub> induced liver and kidney damage. TVH was more potent than OVOE to protect against CCL<sub>4</sub> toxicity and HEM was more potent than TVH and OVOE individually.

The pH of TVH was less than pH of *Ceratonia siliqua* honey samples (range from 4.17 to 5.05) collected from Morocco [23]. Also, it was less than pH of TVH collected from other different areas in Morocco; Rachidia  $4.51 \pm 0.02$ , Saouira  $4.04 \pm 0.03$ , and Zaraphyt  $4.36 \pm 0.02$  [24]. This means that TVH collected from Fez, boulemane, was more acidic. pH of honey could be affected by the method of extraction and time of storage.

The ash content and electrical conductivity correlated with the mineral content of honey [25]. The ash content was in accordance with the standards of ash content in honey used in the EU (ash percentage of honey  $< 0.6\%$ ). Furthermore, the ash content of TVH lies in the range of Iranian honey samples (0.041-0.562%) and Indian honey samples (0.03-0.43%) [26, 27].

It was found that potassium was the most abundant element in the thyme honey. The range of potassium concentration in TVH is almost within the range obtained in other types of honey collected from different countries [24, 28]. Another study showed that potassium made up 73% of 18 different minerals in 10 mono-floral honeys [29]. Furthermore, a positive relationship between mean conductivity and a total mineral content, and pH and total mineral content was

observed [30]. The mineral content is used as a parameter in determining the botanical and geographical origins of honey [10, 11].

It was found that phenol content of 17 commercial honey samples from Morocco varied from 16.38 mg GAE/100g in citrus honey to 92.37 mg GAE/100 in thyme honey from Rachidia [24]. Therefore, the phenol content in TVH was less than that in thyme honey collected from Rachidia, Morocco. Iranian honeys showed higher total phenol content than TVH [26]. The phenolic content of TVH lies within the range of Jordanian honey and Greek honey samples, and it is almost similar to Manuka honey [31,32].

With the use of HPLC, five phenolic compounds were identified in TVH extract: ferulic acid, gallic acid, caffeic acid, epicatechin gallate and pyrogallol. The major constituent in the sample was epicatechin gallate. Ferulic acid, gallic acid, and caffeic acid have been reported in Malaysian honey [21]. Twenty-eight samples of thyme honey collected from Greek were analyzed and total of 62 compounds were isolated. Thyme honeys contains various compounds [33]. However no epicatechin gallate was detected.

Epicatechin gallate is useful in the treatment of wounds and it exhibits a strong anti-inflammatory and analgesic effect by lowering levels of plasma PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 [34-36]. Therefore, the presence of epicatechin gallate in the TVH makes it a potential agent to be used in wound and inflammation. Furthermore, as epicatechin gallate might be a useful marker for TVH from Morocco.

It was found that flavonoid content was 0.42 mg QE/100g in citrus honey and 13.962 mg QE/100g in black cumin honey [24]. Therefore, the flavonoid content of TVH was higher than that found in citrus honey as well as black cumin honey.

The IC<sub>50</sub> values of 21 different types of honey, which were derived from the Olympus mountain area, Greek, ranged from 7.5 to 109.0 mg/ml while Manuka honey exhibited a weak antioxidant activity (IC<sub>50</sub>: 68.0 mg/ml) in DPPH assay [31]. Therefore, TVH was more potent than Manuka honey as an antioxidant and more than most of the Greek honeys.

The GC / MS analysis of OVOE revealed two major compounds: carvacrol and thymol, which is in agreement with another study [37]. Furthermore, the compounds demonstrated in the OVOE were similar to *Origanum vulgare* from Morocco and other countries, which showed that the major compound was carvacrol [22,38]. The percentage of carvacrol and thymol in OVOE sample are twice as high as those identified in OVOE from other areas of Morocco [22]. The difference might be related to the method of isolation, geographic origin, and season of harvesting [39].

The administration of TVH, OVEO or their combination to the animals with CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity decreased significantly liver enzymes compared to the CCl<sub>4</sub> treated group. Interestingly, HEM showed a more profound hepatoprotective effect than TVH or OVEO. The potentiation of HEM effect might be due to synergistic activity of natural ingredients that exist in TVH and OVEO. It was found that *Origanum vulgare* leaf extract has a significant protection against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in dose-dependent manner [40]. Furthermore, others and we found that honey could protect liver and kidney after CCl<sub>4</sub> intoxication by normalization of liver enzymes and kidney function [5-7].

TVH, OVEO and HEM significantly ameliorated CCl<sub>4</sub>-induced dyslipidemia. This is in agreement with effect of sidr honey on lipid profile in CCl<sub>4</sub> toxicity [5]. In CCl<sub>4</sub>-untreated rats, TVH or OVEO have no significant effect on lipid profile, however, their combination caused significant lowering of TC, LDL and VLDL and significant elevation of HDL. This is most likely due to an additive or synergistic effect of active ingredients in TVH and OVEO. This makes their combination a good candidate for prophylaxis of dyslipidemia and cardiovascular diseases.

The mechanism of CCl<sub>4</sub> induced renal toxicity is almost the same as that of the liver. Furthermore, CCl<sub>4</sub> has a strong affinity to the kidney cortex because it contains high level of cytochrome P-450 [41]. The administration of TVH, OVEO and their mixture significantly protect against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity; the effect was more pronounced with the use of HEM. Recently, we have found that CCl<sub>4</sub> causes a significant elevation of oxidative stress markers in the blood and kidney tissues, which were markedly alleviated by the administration of Carob honey (Unpublished).



TVH has high content of epicatechin galate and ferulic acid while OVOE contains carvacrol and thymol. Epicatechin gallate has anti-inflammatory, analgesic and wound healing properties [34, 35]. Ferulic acid effectively reduced lipid disorders in the plasma, liver, and kidney of CCL<sub>4</sub>-treated rats [42]. Carvacrol is a phenolic monoterpenoid found in essential oils of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and other plants. Recent review showed that carvacrol has antioxidants, antimicrobial and anti-inflammatory activity [43]. The Mechanism of action of TVH, OVEO is most likely due to antioxidant capacity and anti-inflammatory activity, which are dependent on their chemical active ingredients, particularly thymol, carvacrol, epicatechin galatte and ferulic acid.

### **Conflict of interest**

The authors of the present work declare no conflicts of interest

### **Acknowledgments:**

This work was supported by a grant from University Sidi Mohamed Ben Abdallah for Laboratory Physiology-Pharmacology & Environmental health (USMBA/L08FSDM).

### **References**

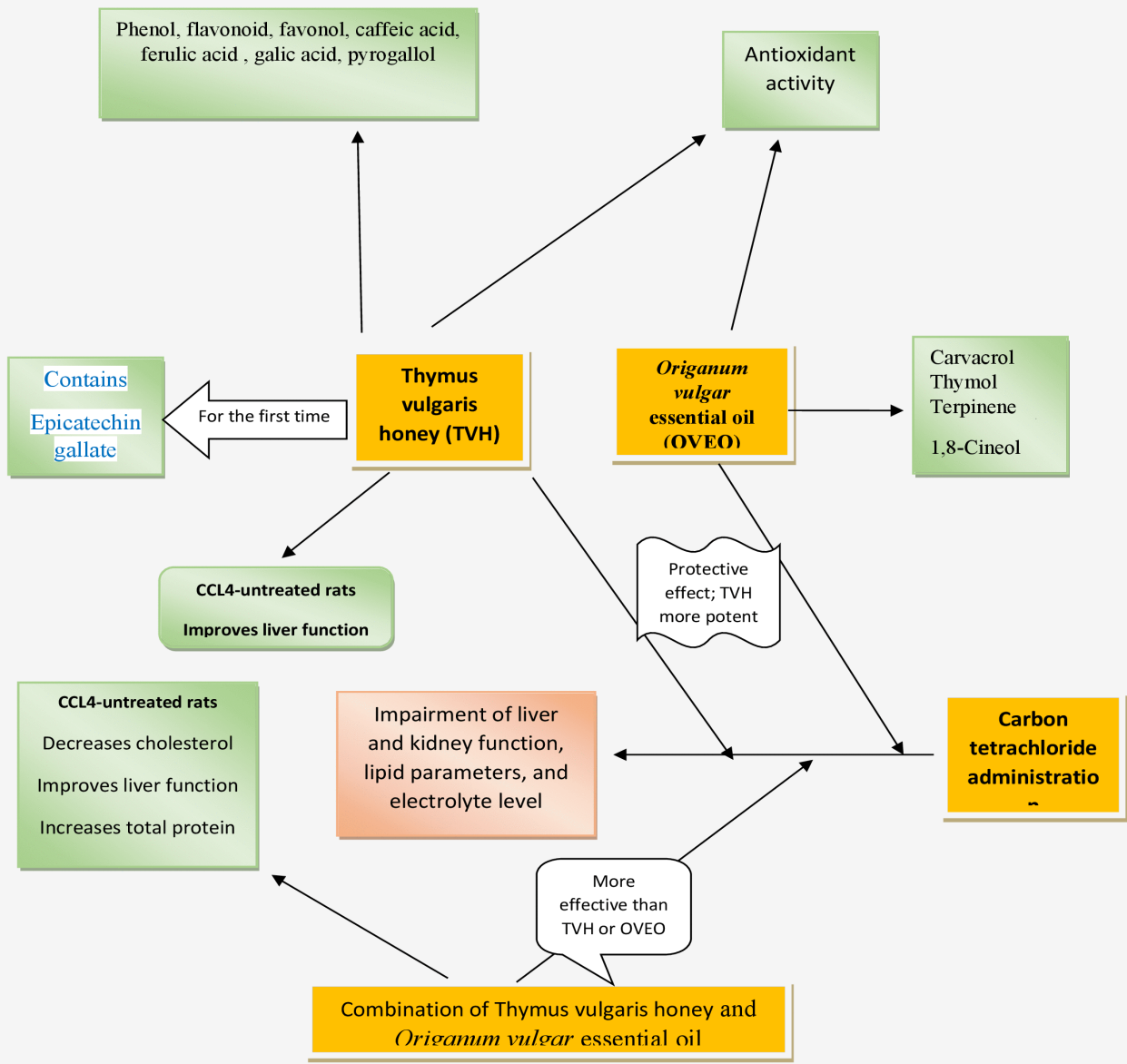
- [1] M., Charalambous , V., Raftopoulos , L., Paikousis , et al. The effect of the use of thyme honey in minimizing radiation - induced oral mucositis in head and neck cancer patients: A randomized controlled trial. *Eur J Oncol Nurs.* 2018 Jun;34:89-97.
- [2] N., Takzaree , G., Hassanzadeh , M., et al. Evaluation of the effects of local application of thyme honey in open cutaneous wound healing. *Iran J Public Health.* 2017 Apr;46(4):545-551.
- [3] A., Charalambous , E., Lambrinou , N., Katodritis , et al. The effectiveness of thyme honey for the management of treatment-induced xerostomia in head and neck cancer patients: A feasibility randomized control trial. *Eur J Oncol Nurs.* 2017 Apr;27:1-8.

- [4] S., Miraj . Antioxidant , anticancer , antimicrobial potential of *Origanum vulgare*. *Der Pharmacia Lettre*, 2016, 8 (13):89-97.
- [5] M., Al-Yahya , R., Mothana , M., Al-Said , et al. Attenuation of CCL4-induced oxidative Stress and hepatonephrotoxicity by Saudi sidr Honey in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:569037. doi: 10.1155/2013/569037.
- [6] O., Saral, O., Yildiz, R., Aliyazicioğlu, E., Yuluğ, et al. Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turk J Med Sci* 2016 ;46(1):194-202.
- [7] N., Al-Waili, K., Saloom, T., Al-Waili, et al. Influence of various diet regimens on deterioration of hepatic function and hematological parameters following carbon tetrachloride: a potential protective role of natural honey. *Nat Prod Res*. 2006 Nov;20(13):1258-64.
- [8] R., El-Haskoury, S., Zizi, S., Touzani, et al. Diuretic activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) honey: comparison with furosemide. *Afr J Tradit Compl Altern Med* 2016; 12:128-133.
- [9] A., Fihri, N., Al-Waili, R., El-Haskoury, et al, Ansari M. Protective effect of Morocco carob honey against lead-induced anemia and hepato-renal toxicity. *Cell Physiol Biochem* 2016; 39:115-122.
- [10] M., Sikander, S., Malik, K., Parveen, et al. Hepatoprotective effect of *Origanum vulgare* in Wistar rats against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Protoplasma* (2013) 250:483–493.
- [11] M., Küçük, S., Kolayli, S., Karaoğlu S, et al . Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem* 2007;100:526–534.
- [12] N., AL-Waili, A., Al Ghamdi , M., Ansari , et al. Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Arch Med Res*. 2013 May;44(4):307-316.
- [13] S., Bogdanov . Harmonised methods of the international IHC. *Bee Prod. Sci* 2009; 5:1–62.
- [14] O., Naab, M., Tamame, M., Caccavari. Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina. *Spanish J. Agric. Res.*, 2008; 4:566–576, 2008.
- [15] A., Terrab, A., Recamales , D., Hernanz , et al. Characterization of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chem* 2004; 88:537–542.

- [16] L., Singleton. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, New York Wiley. p. 331, 1964.
- [17] T., Samatha, R., Shyamsundarachary, P., Srinivas, et al. Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of *Oroxylum indicum* L.Kurz. *Asian J. Pharm Clin Res* 2103; 5:177–179.
- [18] E., Sugathakumar, M., Santha, P., Hephzibah, et al. In vitro antioxidant, anti-lipid peroxidation activities and HPLC analysis of methanol extracts from bark and stem of *Mahonia leschenaultia* takeda, *Asian J Plant Sci Res* 2013; 3:116–126.
- [19] P., Prieto, M., Pineda, M., Aguilar. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Anal Biochem* 1999; 269:337–341.
- [20] W., Brand-Williams, C., Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,” *LWT - Food Sci Technol* 1995;28,:25–30.
- [21] A., Aljadi, K., Yusoff. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish J Med Sci* 2003; 33:229–236.
- [22] D., Benziane, M., Boukir, R., Taouil. Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of EOs of *O. vulgare* from Morocco. *American- Eurasian J Sci Res* 2010;5: 120-129.
- [23] R., El-Haskoury, W., Kriaa, B., Lyoussi, et al. *Ceratonia siliqua* honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. *J Food Drug Anal.* 2018 Jan;26(1):67-73.
- [24] S., Aazza, B., Lyoussi, D., Antunes, et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *Int J Food Sci Nutr.* 2014 Jun;65(4):449-57.
- [26] H., Moloudian, S. Abbasian, N., Nassiri-Koopaei, et al. Characterization and Classification of Iranian Honey Based on Physicochemical Properties and Antioxidant Activities, with Chemometrics Approach. *Iran J Pharm Res* 2018;17(2):708-725.

- [25] G., Saric , D., Matkovic , M., Hruskar ,et al . Characterisation and classification of croatian honey by physicochemical parameters. *Food Tech. Biotech* 2008;46:355–67.
- [27] L., Mehryar, M., Esmaili, A., Hassanzadeh. Evaluation of some physicochemical and rheological properties of Iranian honeys and the effect of temperature on its viscosity. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 2013;6:807–19.
- [28] S., Saxena, S., Gautam, A., Sharma. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem* 2010;118:391–7.
- [29] G., Saric, D., Matkovic, M., et al.. Characterisation and classification of croatian honey by physicochemical parameters. *Food Tech Biotech* 2008;46:355–67.
- [30] J., Devillers , M., Morlot , M., Pham-Delegue ,et al. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chem* 2004;86:305–12.
- [31] D., Stagos , N., Soulitsiotis , C., Tsadila , et al, Mossialos D. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int J Mol Med* 2018 Aug;42(2):726-734.
- [32] M., Taha. R., Al-Omouh , S. Alhamad, et al . Total Phenol, Antioxidant Activity, Flavonoids, Anthocyanins and Color of Honey as Affected by Floral Origin Found in the Arid and Semiarid Mediterranean Areas. *J food processing reservat* 2014; 38:1119-1128.
- [33] E., Alissandrakis , P., Tarantilis , P., Harizanis , et al. Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. *J Agric Food Chem.* 2007 ;55(20):8152-8157. .
- [34] J., McKelvey , Appleton I. Epicatechin gallate improves healing and reduces scar formation of incisional wounds in type 2 diabetes mellitus rat model. *Wounds* 2012;24(3):55-57.
- [35] M., Kapoor, R., Howard, I., Hall, et al. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Am J Pathol* 2004 Jul;165(1):299-307.
- [36] E., Al-Sayed , M., Abdel-Daim .Analgesic and anti-inflammatory activities of epicatechin gallate from *Bauhinia hookeri*. *Drug Dev Res* 2018 Jun;79(4):157-164.

- [37] H., Tian, D., Lai. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. *Zhongyaocai* 2006;29(9):920–92.
- [38] L., Vale-Silva, M., Silva, D. Oliveira. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *J Med Microbiol* 2012; 61: 252–260.
- [39] B., Teixeira, A., Marques, C., Ramos. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crops Prod* 2013; 43:587–595.
- [40] M., Sikander, S., Malik, K., Parveen, et al. Hepatoprotective effect of *Origanum vulgare* in Wistar rats against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Protoplasma*. 2013;250(2):483-93.
- [41] F., Jaramillo-juárez, M., Rodriguez-Vázquez, A., Rincón-Sánchez, et al. Acute renal failure induced by carbon tetrachloride in rats with hepatic cirrhosis. *Ann Hepatol* 2008;7(4):331–338.
- [42] R., Marimuthu S, Adluri, R., Rajagopalan, V., Menon. Protective role of ferulic acid on carbon tetrachloride-induced hyperlipidemia and histological alterations in experimental rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2013;24(1):59-66.
- [43] M., Sharifi-Rad, E., Varoni, M., Iriti, et al.. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018 May 9. doi: 10.1002/ptr.6103



Graphic abstract

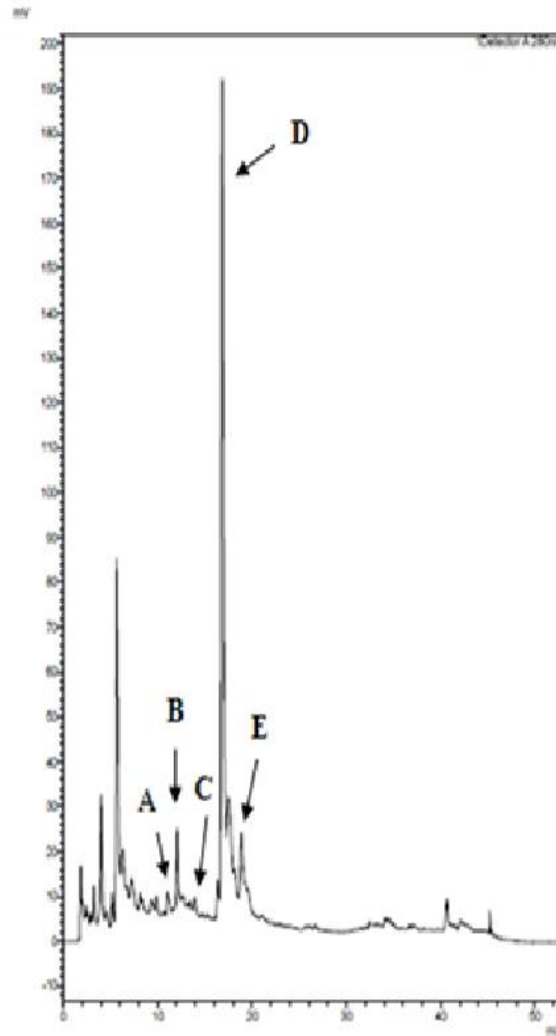


Figure 1: HPLC chromatogram of *Thymus vulgaris* honey phenolics, detection at 280 nm; A: caffeic acid; B: ferulic acid; C: galic acid; D: Epicatechin gallate; E: pyrogallol.

Table 1; Chemical composition of *Origanum vulgare* essential oil from Morocco.

Table 3; Effect of TVH, OVEO and HEM on liver, kidney function and lipid profile in CCl4-treated rat

Table 2; Effect of TVH, OVEO and HEM on liver, kidney function and lipid profile in CCl4-untreated rats



Table 1:

<b>Compounds</b>	<b>% Area</b>	<b>Kovat index</b>
$\alpha$ -Pinene	0.1	948
2-Carene	0.15	1002
$\alpha$ -Phellandrene	0.03	1007
3-Carene	0.3	1009
1,4-Cineol	0.06	1012
$\alpha$ -Terpinene	0.81	1018
1,8-Cineol	4.86	1038
Cis-Ocimene	0.03	1072
$\gamma$ -Terpinene	7.9	1084
Terpinolene	0.06	1096
Isoborneol	0.59	1158
$\beta$ -terpinol	0.07	1162
Borneol	0.23	1172
4-terpinol	0.15	1235
Cis-carveol	0.07	1289
Thymol methyl ethe	0.29	1325
Pulegone	0.05	1335
Thymol	26.55	1375
Carvacrol	48.38	1394
Caryophyllene	1.03	1426
$\alpha$ -Himachalene	0.15	1475
Longifolene-(V4)	0.06	1495
$\alpha$ -Cadinene	0.05	1538
$\gamma$ -Muurolene	0.11	1542
$\gamma$ -Cadinene	0.28	1571
Caryophyllene oxide	0.09	1628
<b>Total</b>	<b>92.45</b>	

Table 2;

Variables	Treatment groups					F/P value
	Control	Tween 80	TVH	OVEO	HEM	
AST (U/L)	131 ± 2.6	140 ± 7.7*	120 ± 3.4*#	123 ± 3#	100 ± 3*## β	57.81/0.000
ALT (U/L)	124 ± 2.9	133 ± 4.7	112 ± 9*#	126 ± 1.5#+	109 ± 4.63*# β	18.66/0.00
AlkP (U/L)	137 ± 4.5	147 ± 3.4*	139 ± 3.4#	141 ± 2.8	122 ± 2* ## β	39.03/0.00
Total protein (g/dl)	6.5 ± 0.07	6.4 ± 0.22	6.6 ± 0.15	6.3 ± 0.15+	6.8 ± 0.11*# β	8.37/0.0004
Total Bilirubin (mg/dl)	0.15 ± 0.07	0.20 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.05	0.11 ± 0.02#	3.21/0.034
Direct Bilirubin (mg/l)	0.1 ± 0.02	0.13 ± 0.06	0.09 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.03	1.34/0.28
Cholesterol (mg/dl)	71 ± 10	80 ± 6	71 ± 8	84 ± 2	52 ± 7*##+ β	15.04/0.00
Triglycerides (mg/dl)	39 ± 6	43 ± 5	37 ± 11	47 ± 25	26 ± 9 β	3.217/0.034
HDL (mg/dl)	22 ± 2	20 ± 2	22 ± 3	22 ± 4	24 ± 1	1.47/ 0.248
LDL (mg/dl)	41 ± 9	52 ± 12	42 ± 8	53 ± 16	23 ± 8# β	5.98/0.002
VLDL (mg/dl)	8 ± 1	9 ± 1	7 ± 2	9 ± 5	5 ± 2	2.00/0.133
Creatinine (mg/dl)	0.34 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.34 ± 0.02	2.30/0.93
Urea (mg/dl)	24 ± 2	26 ± 2	23 ± 1	24 ± 3	20 ± 1*# β	6.315/0.019
Sodium (mmol/l)	127 ± 2.6	128 ± 3.6	129 ± 1.5	136 ± 4.9*#	129 ± 5.8	3.987/0.014
Potassium (mmol/l)	4.3 ± 1.15	4.4 ± 1.38	4.6 ± 0.76	4.9 ± 0.35	4 ± 0.6	0.713/0.59
Calcium (mg/dl)	7.3 ± 0.49	7.4 ± 0.26	7.7 ± 0.3	7.3 ± 0.32	7.2 ± 0.28	1.522/0.233

\*P<0.05 in comparison to group 1

# p<0.05 in comparison to group 2

+ p<0.05 in comparison to group 3

β p<0.05 in comparison to group 4

Table 3;

Variables	Treatment groups					F/P value
	Control	CCl4	TVH	OVEO	HEM	
AST (U/L)	131 ± 3	246 ± 8*	<b>214 ± 9.95*#</b>	228 ± 7.5*##+	156 ± 3*##+ β	248.785 /0.000
ALT (U/L)	124 ± 3	192 ± 2.1*	145 ± 7*#	166 ± 5.7*##+	121 ± 7.6*##+ β	191.82/0.00
AlkP (U/L)	137 ± 4.5	314 ± 3.05*	252 ± 5.29*#	288 ± 6*##+	166 ± 3*##+ β	1488.6/0.00
Total protein (g/dl)	6.5 ± 0.07	4.9 ± 1.55*	6 ± 1.03*#	4.9 ± 2.0*##+	6.3 ± 1.5*##+ β	1.557/0.22
Total Bilirubin (mg/dl)	0.15 ± 0.07	0.96 ± 0.05*	0.36 ± 0.03*#	0.49 ± 0.04*##+	0.28 ± 0.08*# β	149.0/0.00
Direct Bilirubin (mg/l)	0.1 ± 0.02	0.51 ± 0.04*	0.3 ± 0.03*#	0.38 ± 0.05*##+	0.21 ± 0.05*##+ β	78.0/0.00
Cholesterol (mg/dl)	71 ± 10	107 ± 3*	73 ± 2*#	85 ± 3*##+	61 ± 6*##+ β	49.177/0.00
Triglycerides (mg/dl)	39 ± 6	62 ± 11*	49 ± 2#	55 ± 2*	38 ± 3# β	15.27/0.00
HDL (mg/dl)	22 ± 2	16 ± 1*	22 ± 2#	19 ± 1*##+	22 ± 1# β	16.36/0.00
LDL (mg/dl)	41 ± 9	78 ± 4*	40 ± 9#	58 ± 8*##+	32 ± 5##+ β	31.66/0.00
VLDL (mg/dl)	8 ± 1	12 ± 2	10 ± 2	11 ± 5	8 ± 1	2.285/0.09
Creatinine (mg/dl)	0.34 ± 0.04	0.61 ± 0.05*	0.47 ± 0.06*#	0.50 ± 0.05*#	0.46 ± 0.02*#	20.4/0.00
Urea (mg/dl)	24 ± 2	42 ± 1*	33 ± 2*#	34 ± 1*#	30 ± 1*##+ β	97.27/0.00
Sodium (mmol/l)	127 ± 2.6	162 ± 1.15*	140 ± 0.71*#	146 ± 3.54*##+	134 ± 2.6 ##+ β	123.0/0.00
Potassium (mmol/l)	4.3 ± 1.15	8.5 ± 1.54*	6.5 ± 0.7	6.9 ± 1.7*	4.6 ± 0.65# β	9.93/0.0001
Calcium (mg/dl)	7.3 ± 0.49	10.2 ± 0.35*	8.9 ± 0.06*#	8.6 ± 0.26*#	7.9 ± 0.36##+	34.83/0.00

\*P&lt;0.05 in comparison to group 1

# p&lt;0.05 in comparison to group 2

+ p&lt;0.05 in comparison to group 3

β p&lt;0.05 in comparison to group 4