



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de biologie

## **THESE**

En vue de l'obtention du Diplôme de  
**DOCTORAT EN BIOLOGIE**  
Spécialité : Sciences de la Nature et de la Vie

# **Propriétés anti-oxydantes de quelques variétés de miels Algériens**

Présentée par: Aissat Saad  
Soutenue publiquement le: 07/10/2015

Devant le jury composé de:

Président	Pr Meddah Boumediene, Université de Mascara
Directeur de thèse	Pr Benbarek Hama, Université de Mascara
Examineurs	Pr Tirtouil Aicha, Université de Mascara
	Dr Ghazi Kheira, MCA, Université de Tiaret
	Dr Khiati Baghdad, MCA, Université de Tiaret
	Dr Hamoudi Abdelhamid, MCA, Université de Tiaret

*Je dédie ce travail*

*à mon défunt père,*

*à mes défunts frères*

*ainsi qu'à ma mère*

*Je le dédie également à ma femme,*

*mon solide compagnon dans la vie.*

*à vous également mes enfants*

# Remerciements

*Je tiens à exprimer ma gratitude Au Professeur MEDDAH BOUMEDIENNE, pour avoir accepté de présider le jury et au Professeur TIRTOUIL AICHA, ainsi qu'aux Dr GHAZI KHEIRA, Dr HAMOUDI ABDELHAMID et Dr KHIATI BAGHDAD, pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Grand merci au ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien pour avoir couvert mes frais de stage.*

*Merci Professeur BENBAREK HAMA de l'Université de Mascara, mon directeur de thèse, pour votre gentillesse, vos conseils, votre disponibilité et votre modestie. Je vous remercie également de m'avoir ouvert des horizons nouveaux et changé ma manière de raisonner.*

*Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire du CORD (Centre de l'oxygène Recherche et Développement), Institut de Chimie, Université de Liège, Belgique.*

*Donc, Je tiens à remercier également*

*Le Professeur DIDIER SERTEYN, Directeur du CORD, pour m'avoir reçu dans son laboratoire.*

*Le Docteur THIERRY FRANCK, son sourire et surtout ses bandes dessinées, c'est peut être peu de choses mais je t'en suis éternellement reconnaissant.*

*Le Docteur Agrégé, ANGE MOUITHYS MICKALAD qui n'a d'ailleurs pas volé son prénom.*

*Madame GINETTE DEBY-DUPONT et ses précieux conseils.*

*Ainsi que tout le personnel du CORD, sans oublier ARIANE NIESTEN et JENNIFER ROMAINVILLE.*

*Merci à toi AHMED MOUSSA, frère et ami et mon soutien dans les moments difficiles, ainsi qu'à toi MESLEM ABDELMALEK et BENHANIFIA MOKHTAR.*

*Merci BOURNINE LAMINE pour m'avoir hébergé durant mes séjours à Liège*

# SOMMAIRE

---

RESUME.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES FIGURES .....	IV
INTRODUCTION GENERALE.....	V

## Synthèse bibliographique

---

1. Introduction.....	1
2. Nature chimique et réactivité de l'oxygène.....	2
3. Flambée respiratoires et protection contre les espèces oxygénées réactives.....	3
3.1. Historique.....	3
3.2. Production des EROs par les cellules phagocytaires.....	4
3.3. Flambée respiratoire.....	5
4. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène dans le milieu vivant.....	9
4.1. L'anion superoxyde.....	9
4.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	10
4.3. Le radical hydroxyle.....	11
4.4. L'acide hypochloreux (HOCl).....	11
5. Le système myéloperoxydase / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / Cl <sup>-</sup> .....	12
5.1. Activités de la myéloperoxydase.....	13
5.2. Le composé I.....	13
5.3. Les composés II et III.....	16
6. Les défenses anti-oxydantes.....	18
6.1. Les mécanismes de défense enzymatiques.....	19
6.1.1. Les superoxydes dismutases.....	19
6.1.2. Glutathion peroxydase et glutathion réductase.....	19
6.1.3. Catalases.....	20
6.2. Les mécanismes de défense non enzymatiques.....	21
6.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols.....	21

6.2.2. La vitamine C.....	22
6.2.3. La vitamine E.....	22
6.2.4. Les caroténoïdes.....	23
6.2.5. Les polyphénols.....	23
6.2.6. Les oligoéléments.....	24
7. Quelques pathologies liées au stress oxydant chez l'homme.....	25
7.1. Maladie d'Alzheimer.....	26
7.2. Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA).....	27
7.3. Le diabète.....	28
7.4. Cancer.....	30
7.5. Athérosclérose.....	31
8. Le stress oxydatif chez les animaux de rente.....	33
9. Stratégies thérapeutiques.....	39
10. Le miel.....	41
10.1. Composition.....	42
10.2. Quelques propriétés thérapeutiques du miel.....	44
10.2.1. Diabète.....	44
10.2.2. Maladies cardiovasculaires.....	45
10.2.3. Affections oculaires.....	47
10.2.4. Effets neurologiques.....	48
10.2.5. Effets anti-tumoral et anti-mutagénique.....	49
10.3. Le miel en usage vétérinaire.....	50
11. Mécanismes d'action et composés actifs.....	54
11.1. Activité antibactérienne.....	54
11.2. Le miel et les cytokines.....	57
11.3. Le miel et les espèces réactives de l'oxygène.....	62
11.4. Actions anti-inflammatoires du miel.....	64

# Partie Expérimentale

---

Matériels et méthodes.....	67
1. Echantillons de miels.....	67
2. Réactifs.....	68
3. Taux des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu).....	68
3. Taux des flavonoïdes totaux.....	69
4. Etude par résonance paramagnétique électronique (EPR).....	69
4.1. Effet du miel sur le radical hydroxyle produit par la réaction de Fenton.....	70
4.2. Effet du miel sur la génération du radical thiyle.....	70
5. Isolement des neutrophiles équina.....	71
6. Détection de la chimiluminescence des EROs produites par les PMNs.....	73
7. Dosage ELISA de la MPO totale dégranulée par les PMNs activés.....	75
8. Dosage SIEFED.....	77
9. Etude statistique.....	78

## Résultats

---

1. Taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	79
2. Effet des différents types de miel sur le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton.....	80
3. Effet du miel sur la déplétion du glutathion.....	81
4. Inhibition de la production du radical superoxyde par les neutrophiles stimulés avec le PMA.....	84
5. Effet du miel sur libération de la myéloperoxydase par les neutrophiles activés au PMA (MPO-ELISA Assay).....	85
6. Effet du miel sur l'activité de la MPO (technique SIEFED).....	87

## **Discussion**

---

1. Etude par résonance paramagnétique électronique.....	89
1.1. Effet des différents types de miel sur le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton.....	89
1.2. Effet du miel sur la déplétion du GSH.....	97
2. Inhibition de la production du radical superoxyde par les neutrophiles stimulés avec le PMA.....	99
3. Effet du miel sur libération de la myéloperoxydase par les neutrophiles activés au PMA.....	101
4. Effet du miel sur l'activité de la MPO (technique SIEFED).....	104
<b>Conclusion pratique et perspectives.....</b>	<b>108</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : liste non exhaustive du contenu en protéines des granules et des vésicules De sécrétion des neutrophiles humains.....	8
<b>Tableau 2</b> : Principales activités de la MPO dans la production des EROs.....	14
<b>Tableau 3</b> . Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux.....	80

## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Anion superoxyde et ses dérivés.....	10
<b>Figure 2</b> : Schéma de la synthèse d'HOCl à partir de la forme native de la MPO (MPO <sup>3+</sup> ).....	15
<b>Figure 3</b> : Schéma de la formation des composés II et III.....	17
<b>Figure 4</b> : Espèces réactives de l'oxygène et dommages cellulaires.....	18
<b>Figure 5</b> : Sources métaboliques de production et d'élimination du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les réactions enzymatiques combinées de la GPX et la GR.....	20
<b>Figure 6</b> - Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques anti-oxydants t de leurs Cofacteurs métalliques.....	21
<b>Figure 7</b> : Implication du stress oxydant dans l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice.....	38
<b>Figure 8</b> : Action immune-modulatrice du miel sur les cellules immunitaires et les cellules cutanées impliquées dans la cicatrisation des plaies.....	66
<b>Figure 9</b> : Schématisation de la séparation des cellules sanguines en fonction de leur percoll densité.....	73
<b>Figure 10</b> : Mécanismes réactionnels de la chimiluminescence avec la lucigénine.....	75
<b>Figure 11</b> : Effet du miel sur le radical hydroxyle produit par la réaction de Fenton.....	83
<b>Figure 12</b> : Effet du miel sur le thiyle radicale produit par le système enzymatique (HRP/GSH/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	84
<b>Figure 13</b> : Effet des différentes concentrations des trois types de miels sur la chimiluminescence dépendante de la lucigénine.....	86
<b>Figure 14</b> : Effet du miel sur la quantité totale de la MPO libérée par les PMNs activés au PMA (MPO-ELISA Assay).....	87
<b>Figure 15</b> : Interaction du miel avec la MPO (technique SIEFED).....	89



## Liste des photos

---

<b>Photo1:</b> Ulcère de la cornée, avant (A) et après l'utilisation du miel de miellat.....	48
<b>Photo 2:</b> 21/04/13. Avant l'utilisation du miel d'euphorbe.....	52
<b>Photo 3:</b> 09/06/13. Après utilisation du miel d'euphorbe.....	52
<b>Photo 4:</b> 19 Mai, 2013, avant l'opération.....	52
<b>Photo 5:</b> 22 Mai, 2013, 4 jours après opération.....	52
<b>Photo 6:</b> 28 Mai, 2013, 10 jours après.....	52
<b>Photo 7 :</b> 30 Mai, 2013, 12 jours après.....	52

## Abbreviations

<b>AGPs</b>	Arabinogalactan proteins
<b>DMPO</b>	5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
<b>EAG</b>	Equivalent Acide Gallique
<b>EC</b>	Equivalent Catéchine
<b>EPO</b>	Eosinophile peroxydase
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GPX</b>	Glutathion peroxydase
<b>GS<sup>·</sup></b>	Radical thiyle
<b>GSSG</b>	Forme oxydée du glutathion
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HH</b>	Miel de miellat
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>HOCl</b>	Acide hypochloreux
<b>HMS</b>	Shunt des hexoses monophosphates
<b>IL</b>	Interleukine
<b>KCN</b>	<i>cyanure de potassium</i>
<b>LPO</b>	Lactoperoxydase
<b>MH</b>	Miel mixte
<b>MPO</b>	Myéloperoxydase
<b>MRJP1</b>	Major royal jelly protein 1
<b>NH</b>	Miel de nectar
<b><sup>·</sup>OH</b>	Radical hydroxyle
<b>O<sup>·-</sup></b>	Anion superoxyde
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
<b>PMNs</b>	Polymorphonucléaires
<b>PGHS</b>	Prostaglandine H synthase
<b>RPE</b>	Résonance Paramagnétique Electronique
<b>SARM</b>	S.aureus résistant à la méthicilline
<b>SIEFED</b>	Specific Immunological Extraction Followed by Enzymatic Detection
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>-SH</b>	Fonction sulfhydryle

<b>TFT</b>	Teneur en Flavonoïdes Totaux
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Tumor necrosie factor $\alpha$
<b>TPO</b>	Peroxydase thyroïdienne
<b>TPT</b>	Teneur en Polyphénols Totaux

# **INTRODUCTION GENERALE**

---

## **Introduction générale**

---

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes... (Favier,2003). Le miel a été utilisé pour ses propriétés nutritionnelles, thérapeutiques et de cicatrisation depuis l'antiquité. Avec la faillite de bon nombre d'agents thérapeutiques conventionnels modernes, Il a été récemment «redécouvert». Son potentiel antibactérien, même contre les bactéries multi-résistantes, a été prouvé. Il est bien connu pour ses capacités anti-inflammatoires et antioxydantes (Vallianou et al., 2014). En outre, le miel apparait comme un « cocktail » contenant bon nombre de composés intervenant dans les processus oxydatifs physiologiques tels que le peroxyde d'hydrogène, le glucose, les nitrites, les nitrates, les minéraux (en particulier le cuivre et le fer), la tyrosine, chlorure et bromure et même iodure ainsi que de l'azote ; ce qui peut conduire à la génération de dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote. Pour expliquer cet apparent paradoxe, il est évident que des mécanismes régulateurs présents dans le miel, sont mis en œuvre pour contrôler la formation et l'élimination de ces espèces réactives de l'oxygène. Le miel,comme source d'antioxydants, a été largement prouvée par différent auteurs (Gheldof et Engeseth, 2002; Aljadi et Kamaruddin, 2004 ; Beretta et al., 2005 ; Küçük et al., 2007 ; Ferreira et al., 2009). Cette capacité du miel est due à des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques incluant glucose oxydase, catalase, peroxydase, acide ascorbique, dérivées caroténoïdes, acides organiques, acides aminés et protéines, produits de la réaction de Maillard et plus de 150 composés polyphénoliques comprenant les flavonoïdes et acides phénoliques. Les miels sombres présentent une activité anti-oxydante plus élevée que les miels clairs (Frankel et al., 1998 ;Taormina et al., 2001; Aljadi et Kamaruddin,2004 ; Bertonceli et

al., 2007 ; Socha et al., 2009 ; Vela et al., 2007) et en général les miels de miellat montrent une possèdent une capacité anti-oxydante plus forte que ceux de nectar (Vela et al., 2007; Lachman et al., 2010) ; ce qui a d'ailleurs motivé notre choix des trois échantillons testés dans cette étude :Un miel de miellat (foncé), un miel mixte (miellat et nectar : coloration intermédiaire) est un miel de nectar (clair).

Parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) n'est pas très réactif mais constitue le précurseur d'autres espèces plus réactives. Le radical hydroxyle est le plus réactif des EROs et peut causer des dommages aux protéines, aux lipides et glucides ainsi qu'à l'ADN (Birben et al., 2012). Le système enzymatique le plus important dans les défenses anti-oxydantes de la cellule reste sans contredit les enzymes employant comme cofacteur le GSH. On estime que le GSH est responsable de l'élimination de 80% à 95% des EROs formés par une cellule (Balendiran et al, 2004).

Le neutrophile phagocyte les microorganismes qui sont séquestrés et détruits dans les vacuoles phagocytaires, les phagolysosomes, par l'action oxydante des EROs (dérivées de l'activité de la NADPH-oxydase, de la myéloperoxydase) et de l'action des enzymes protéolytiques granulocytaire. Au cours d'une activation normale, l'activité de la MPO s'exerce dans les vacuoles intracellulaires et seules des quantités limitées de MPO sont libérées dans le milieu extracellulaire. Mais lorsque la réaction inflammatoire devient incontrôlée, la dégranulation massive et la mort des neutrophiles relâchent la MPO et les enzymes protéolytiques dans le milieu extracellulaire ou au contact d'autres cellules avec un risque de destruction locale (Serteyn et al., 2003).

## II. Objectif de l'étude

L'objectif de notre présente étude est de tester l'effet des trois types de miels sur

- le  $\cdot\text{OH}$  généré par la réaction de Fenton
- sur la déplétion du GSH par le système horseradish peroxydase/ $\text{H}_2\text{O}_2$

et ce en utilisant la RPE

- Le  $\text{O}_2^{\cdot-}$  libéré par les PMNs équins activés par la méthode de chemiluminescence
- Sur la dégranulation des PMNs en prenant comme témoin de cette dégranulation la quantité de MPO libérée en utilisant dans ce dernier cas un test ELISA spécifique.
- Pour terminer, en utilisant une méthode originale appelée SIEFED (Specific Immun-Extraction Followed by Enzymatic Detection), permettant d'éviter tout effet artefactuel, nous avons testé nos échantillons de miel sur l'activité spécifique de la MPO équine.

# **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



### III. Synthèse bibliographique

---

#### 1. Introduction

L'oxygène (ou dioxygène, O<sub>2</sub>) est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la Terre il y a plus de 2500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aéro-tolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie (Gardès-Albert et al., 2003). L'oxygène a été découvert par Scheele en 1772, puis " redécouvert " par Priestley quelques années plus tard, et c'est Lavoisier qui l'identifia dans l'air et décrivit son rôle capital dans la combustion. L'oxygène est un élément familier, indispensable aux organismes aérobies. Le seul rôle qui lui ait longtemps été attribué était d'alimenter la respiration cellulaire mitochondriale, génératrice d'énergie par la voie des phosphorylations oxydatives. On sait maintenant que l'utilisation de l'oxygène par les organismes aérobies implique l'intervention d'enzymes spécialisées et que des " excès " ou des " erreurs " de métabolisation sont possibles, conduisant aux pathologies associées aux perturbations de l'équilibre oxydo-réducteur. Les connaissances accumulées sur la nature et la réactivité de l'oxygène incitent à prendre sa toxicité potentielle en considération lorsqu'il est utilisé en conditions différentes des conditions habituelles (21 %, pression atmosphérique normale) (Deby-Dupont et al., 2002). Les radicaux libres ont été découverts dans les systèmes biologiques il y a près de soixante ans (Commoner et al., 1954). C'est en 1956, qu'Harman évoque une hypothèse concernant le vieillissement cellulaire : il serait dû à l'accumulation des dommages cellulaires et moléculaires causés par les radicaux libres dus à l'oxygène. Ces radicaux libres, utiles à l'organisme à faibles doses, sont produits par divers mécanismes physiologiques. Lorsque la production devient excessive, les différents systèmes antioxydants se mettent en place mais peuvent être dépassés. Ce déséquilibre entre la production des EROs et les capacités cellulaires anti-oxydantes correspond au stress oxydant.

## 2. Nature chimique et réactivité de l'oxygène

L'oxygène réagit avec la matière vivante de deux manières, soit en acceptant des électrons (oxydations) soit en se fixant sur la matière organique (oxygénations). Le cas d'oxydation le plus simple est la captation par l'oxygène de deux atomes d'hydrogène avec leur électron pour former une molécule d'eau (H<sub>2</sub>O). Le cas le plus simple d'oxygénation est la formation de CO<sub>2</sub>. Mais pour réaliser ces deux réactions « simples », l'oxygène doit franchir une barrière énergétique importante. C'est la raison pour laquelle l'oxygène est inerte au contact de la matière vivante : il ne réagit pas spontanément, ce qui explique sa teneur élevée dans l'atmosphère. Sans l'existence de cette barrière énergétique, il n'y aurait pas d'oxygène dans l'atmosphère terrestre. Mais, une fois franchie la barrière, la suite des réactions se produit sans difficulté. L'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) porte sur sa couche électronique supérieure deux électrons non appariés. Par ce caractère biradicalaire, il est un triplet, <sup>3</sup>O<sub>2</sub>, plus couramment écrit O<sub>2</sub>. Les deux électrons célibataires sont de spin parallèle et situés dans deux orbitales antiliantes (Thannickal et Fanburg 2000 ; Serteyn et al., 2002). Selon les règles d'interdiction de spin, qui relèvent de la chimie quantique, <sup>3</sup>O<sub>2</sub> ne peut pas réagir avec un composé non radicalaire (un singulet), mais peut réagir soit avec un autre triplet, soit avec un doublet (monoradicalaire) (Serteyn et al., 2002).

Les molécules organiques sont des singulets, <sup>3</sup>O<sub>2</sub> est inerte vis-à-vis d'elles tant que l'interdiction de spin n'a pas été contournée en faisant passer <sup>3</sup>O<sub>2</sub> soit à l'état de doublet par transfert d'un électron, soit à l'état de singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, non radicalaire) par apport d'énergie, ou encore en faisant passer la molécule organique partenaire de la réaction à l'état de doublet (Serteyn et al., 2002).

*In vivo*, le franchissement de la barrière énergétique se fait de manière, normalement très contrôlée, grâce aux catalyseurs biologiques que sont les enzymes, soit les oxydases, soit les oxygénases. Le rôle de ces enzymes est de transformer les deux partenaires, O<sub>2</sub> et molécule organique, de manière à ce que l'un des deux devienne doublet (radical libre). Ainsi, les oxydases (comme la NADPH-oxydase) font passer l'oxygène triplet au stade doublet (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> avec un électron célibataire), tandis que les oxygénases transforment les molécules organiques en radical libre (passage du singulet au doublet). Grâce à ces catalyseurs biologiques, les réactions de l'oxygène avec la matière vivante

sont possibles par des voies totalement différentes de celle de la combustion (Deby-Dupont et al., 1995).

### 3. Flambée respiratoires et protection contre les espèces oxygénées réactives.

- **3.1. Historique** : A la suite de la constatation faite par St-Helin et al (1956,1957), relative à une augmentation spectaculaire du taux d'absorption d'oxygène par les polynucléaires et les monocytes suite à la phagocytose de bacilles tuberculeux (fait constaté d'ailleurs dès 1933 par Balbridge et Gérard). La découverte d'un phénomène « insolite » en 1959, allait bouleverser le concept de l'époque quant aux mécanismes de défense de l'organisme. Sbarra et Karnovski montrèrent que la surconsommation d'oxygène durant la phagocytose, était insensible au cyanure millimolaire (inhibiteur de la cytochrome C oxydase). L'oxygène surconsommé n'était donc pas réduit par la cytochrome oxydase lors de la respiration classique, soit la chaîne de respiration mitochondriale, en vue de produire de l'énergie. Ces auteurs n'ont pas pu expliquer le pourquoi de cette augmentation de la consommation d'oxygène. Cet accroissement remarquable, insensible au cyanure de potassium (KCN), fut dénommé *respiratory burst* ou flambée respiratoire. Sbarra et Karnovski montrèrent également l'existence d'une forte activation du shunt des hexose-monophosphates (HMS) dans les phagocytes activés, ce qui impliquait un important "turn-over" du NADPH. Depuis cette date une série de découvertes s'ensuivit :
  - 1961 : la *respiratory burst* produit  $H_2O_2$ , vraisemblablement par un mécanisme enzymatique (Iyer, 1961).
  - 1964 : L'hypothèse enzymatique fut confirmée par Rossi (1964) qui démontra que cette enzyme était dépendante du NADPH fourni par l'activation du HMS.
  - 1968 : Paul et Sbarra (1968) déterminèrent que la production d' $H_2O_2$  est quadruplée chez les polynucléaires neutrophiles au cours de la phagocytose, ce phénomène étant en rapport avec les activités bactéricides de ces leucocytes et met en relief l'importance de l' $H_2O_2$  dans l'effet bactéricide.

- Simultanément, Klebanoff (1968) établit que la MPO, enzyme caractéristique des polynucléaires neutrophiles (Agner, 1941), utilise  $H_2O_2$  formé pour produire, en présence d'ions chlorures ( $Cl^-$ ), des espèces chlorées très oxydantes.

La triade MPO/ $H_2O_2$ /halogénure était découverte.

- 1972 : Rossi et al, mirent en évidence la formation de  $O_2^{\cdot-}$ , précurseur immédiat d' $H_2O_2$ , au cours de l'activité de cette enzyme NADPH-dépendante, ils l'isolèrent, et lui donnèrent le nom de NADPH-oxydase
- Dès le milieu de la décennie 1970 commencèrent de nombreux travaux mettant progressivement en évidence le rôle de la protéine kinase C (PKC) dans la transduction du signal, allant du récepteur membranaire à l'activation du système NADPH-dépendant, produisant  $O_2^{\cdot-}$  (Takai et al., 1979 ;Myers et al., 1985).
- Durant les décennies 80 et 90, on découvrit que la NADPH oxydase est multiprotéique. Grâce aux travaux de biologie moléculaire s'appuyant sur l'étude du DNA de patients souffrant de granulomatose (dont les leucocytes ne font pas de respiratory burst) et de souris "knock-out" ne synthétisant pas certaines des protéines impliquées dans la NADPH oxydase, on a pu déterminer quelles étaient les protéines indispensables et les protéines adjuvantes.

### **3.2. Production des ERO par les cellules phagocytaires**

Le polymorphonucléaire (PMN) ou neutrophile, a été décrit pour la première fois par Paul Ehrlich vers les années 1900. Il est caractérisé par un noyau polylobé et de nombreux granules cytoplasmiques. D'ailleurs, le nom « neutrophile » provient du fait qu'il est coloré par un mélange de colorants acides et basiques, finalement un colorant neutre (Borregaard et Cowland, 1997). Il est le leucocyte le plus abondant dans la circulation sanguine, représentant 50% à 70% des globules blancs totaux dans le sang (Goldsby et al., 2001). Il est un atout très important pour l'immunité innée, et surtout pour la réaction inflammatoire, car il est le premier leucocyte à migrer, en très grand nombre, vers le site enflammé (Rosenberg et Gallin,1999). Les neutrophiles constituent un puissant système de défense contre les agents pathogènes, tels que les bactéries, champignons, parasites, virus qui ont franchi la barrière cutanéomuqueuse, et contre toutes les structures

reconnues comme étrangères telles que les cellules et molécules endogènes altérées (Gougerot-Pocidalò, 2002). Ils sont attirés précocement par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse en traversant des capillaires dont la perméabilité s'est accrue. Ils phagocytent les microorganismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiaux pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation des neutrophiles permet la digestion bactérienne par une activation de la consommation d'oxygène (la flambée respiratoire ou *respiratory burst*) et une dégranulation, indépendante de l'oxygène (phagocytose- dégranulation). La dégranulation libère des protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolypoprotéolytiques, tandis que la flambée respiratoire implique le fonctionnement de la NADPH-oxydase, de la MPO, et de la NO synthase (appelée aussi NO synthétase), agissant de concert pour éliminer les microorganismes en produisant des espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Babior, 1999 ; Babior et al., 2000). Cependant ces deux mécanismes, flambée respiratoire et dégranulation sont étroitement intriqués (Gougerot-Pocidalò, 2002). Les neutrophiles sont capables, lors de la dégranulation de libérer le contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire. Cette dégranulation se déroule dans un ordre précis : d'abord les vésicules de sécrétion, puis les granules tertiaires et les granules spécifiques et enfin les granules azurophiles. Le tableau I répertorie de façon non exhaustive le contenu en protéines des granules des neutrophiles humains.

### **3.3. Flambée respiratoire**

La structure biradicalaire de l'O<sub>2</sub> lui confère la capacité d'accepter facilement des électrons célibataires. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réduction de l'oxygène se fait préférentiellement par addition d'un seul électron. La fuite des électrons lors de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est considérée comme la source majoritaire des espèces dérivées de l'oxygène devant les autres sources telles que la xanthine oxydase et NADPH-oxydase membranaire, hormis lors de l'explosion oxydative des cellules phagocytaires activées.

Lorsqu'ils sont exposés à certains stimuli, les phagocytes (neutrophiles, éosinophiles et monocytes) subissent des changements marqués dans la façon dont ils gèrent l'oxygène (Babior et Crowley, 1983). Leur taux de consommation d'oxygène augmente fortement, parfois pour plus de 50 fois, produisant ainsi de grandes quantités de  $O_2^{\cdot-}$  et de  $H_2O_2$ , et ils commencent à métaboliser de grandes quantités de glucose par voie du shunt des hexoses monophosphates. En raison de la forte augmentation de la consommation d'oxygène, cette série de changements est venu à être connu sous le nom de "flambée respiratoire.". La « respiration » associée à cette « flambée », n'a cependant rien à voir avec la production d'énergie, le but étant la genèse de puissants agents microbicides de par la réduction partielle de l'oxygène. Le but de la flambée respiratoire à partir de l'activation de la NADPH-oxydase, -à l'état dormant dans les cellules au repos- est la catalyse de la réduction à un électron de l'oxygène en  $O_2^{\cdot-}$  au détriment de la NADPH.

- Une grande partie de cet  $O_2^{\cdot-}$  réagit rapidement avec lui-même par dismutation pour produire de peroxyde d'hydrogène. Simultanément le glucose est métabolisé via l'activation du shunt des hexoses monophosphates (HMS), dans le but de regénérer la NADPH consommée par l'enzyme à l'origine du  $O_2^{\cdot-}$  et par un système détoxifiant dépendant du GSH et du  $H_2O_2$  situé dans le cytoplasme des phagocytes. Les produits immédiats de la flambée respiratoire ne sont pas utilisés par le phagocyte en vue de combattre les microbes, car  $H_2O_2$  étant faiblement microbicide et  $O_2^{\cdot-}$  complètement inoffensif. Ces produits sont en contrepartie utilisés comme matériaux dans la production des vrais agents microbicides des phagocytes. Ces oxydants microbicides se divisent en deux classes : halogènes oxydés et radicaux oxydants. La production du premier commence avec l'oxydation en hypochlorite du  $Cl^-$  par  $H_2O_2$ , réaction catalysée par la MPO (Klebanoff, 1967)

#### - **NADPH-oxydase**

Le système enzymatique constituant la NADPH-oxydase est un système multimoléculaire complexe formé de différents composants protéiques dispersés entre le cytosol et les membranes dans le PMN à l'état de repos. Chaque composant de l'oxydase porte la désignation « *phox* » (pour « phagocyte oxydase »), ce qui indique que la protéine est une partie de l'oxydase du phagocyte. La NADPH-

oxydase active est formée, après stimulation du PMN dans des conditions diverses, par le regroupement au niveau membranaire et sous-membranaire de plusieurs molécules cytosoliques et membranaires (Segal et Shatwell, 1997 ; Babior , 1999 ; Clark, 1999 ; De Leo et qinn, 1996 ; Chanock et al., 1994). C'est ce regroupement qui déclenche le transfert d'électrons à partir du NADPH sur la flavine puis sur les groupements héminiques du cytochrome b et enfin sur l'oxygène moléculaire donnant naissance à  $O_2^{\cdot -}$ . La stimulation de la NADPH oxydase peut être induite par un grand nombre de facteurs particuliers (bactéries, zymosan, particules de latex, plus ou moins opsonisées) et solubles [peptides N-formylés (fMLP)], dont il faut signaler qu'ils stimulent l'activité oxydasique à des concentrations 100 à 1 000 fois supérieures à celles qui sont chimioattractantes, fragment C5a du complément, leucotriène B4 (LTB4), platelet activating factor (PAF), endotoxines bactériennes, ionophores calciques (Ionomycine, A231 87), activateurs de PKC de type esters de phorbol (PMA) - ou encore la conjonction de différents facteurs comme des cytokines pro-inflammatoires (TNF, GM-CSF, IL-8) exerçant un effet de « priming » (Gougerot-Pocidalò, 2002).

Granules azurophiles	Granules spécifiques	Granules tertiaires	Vésicules de sécrétion
<b>Membrane</b>	<b>Membrane</b>	<b>Membrane</b>	<b>Membrane</b>
CD63 CD68 V-type H <sup>+</sup> -ATPase	CD11b Antigènes CD15 CD66 CD67 Cytochrome b Récepteur au fMLP (f-Met-Leu-Pro) Fibronectine-R Sous-unité $\alpha$ de protéine G Laminine-R Antigène NB 1 Protéine 19 kD Protéine 155 kD Rap1, Rap2 SCAMP Thrombospondine-R TNF-R Activateur de plasminogène-R de type urokinase VAMP-2 Vibronectine-R	CD11b Cytochrome b Enzyme déacétylant le diacylglycérol Récepteur au fMLP SCAMP Activateur de plasminogène-R de type urokinase VAMP-2 ( <i>Vesicle-associated membrane protein-2</i> ) V-type H <sup>+</sup> -ATPase	Phosphatase alcaline Récepteur de C3b Cytochrome b CD11b CD14 CD16 Récepteur au fMLP SCAMP ( <i>Secretory carrier membrane protein</i> ) Activateur de plasminogène-R de type urokinase V-type H <sup>+</sup> -ATPase VAMP-2 CD10 CD13 CD45 Récepteur de C1q DAF ( <i>Decay-accelerating factor</i> )
<b>Matrice</b>	<b>Matrice</b>	<b>Matrice</b>	<b>Matrice</b>
Glycerophosphatase- $\beta$ acide Mucopolysaccharide acide $\alpha$ 1-antitrypsine $\alpha$ -mannosidase Azurocidine/CAP37/ Protéine liant l'héparine Protéine BPI Glycerophosphatase- $\beta$ Glucuronidase- $\beta$ Cathepsines Défensines Elastase Lysozyme Myéloperoxydase N-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase Protéinase-3 Sialidase Protéines ubiquitines	Microglobuline- $\beta_2$ Collagénase Gélatinase hCAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysozyme NGAL ( <i>Neutrophil gelatinase associated lipocalin</i> ) Activateur de plasminogène de type urokinase Sialidase SGP 28 ( <i>Secondary granule protein</i> ) Protéine liant la vitamine B12	Acétyltransferase Microglobuline- $\beta_2$ Gélatinase Lysozyme	Protéines plasmatiques (y compris la tetranectine)

**Tableau 1** : liste non exhaustive du contenu en protéines des granules et des vésicules de sécrétion des neutrophiles humains (Fievez 2006)

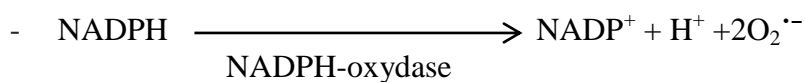


## 4. Les différents dérivés réactifs de l'oxygène dans le milieu vivant

### 4.1. L'anion superoxyde

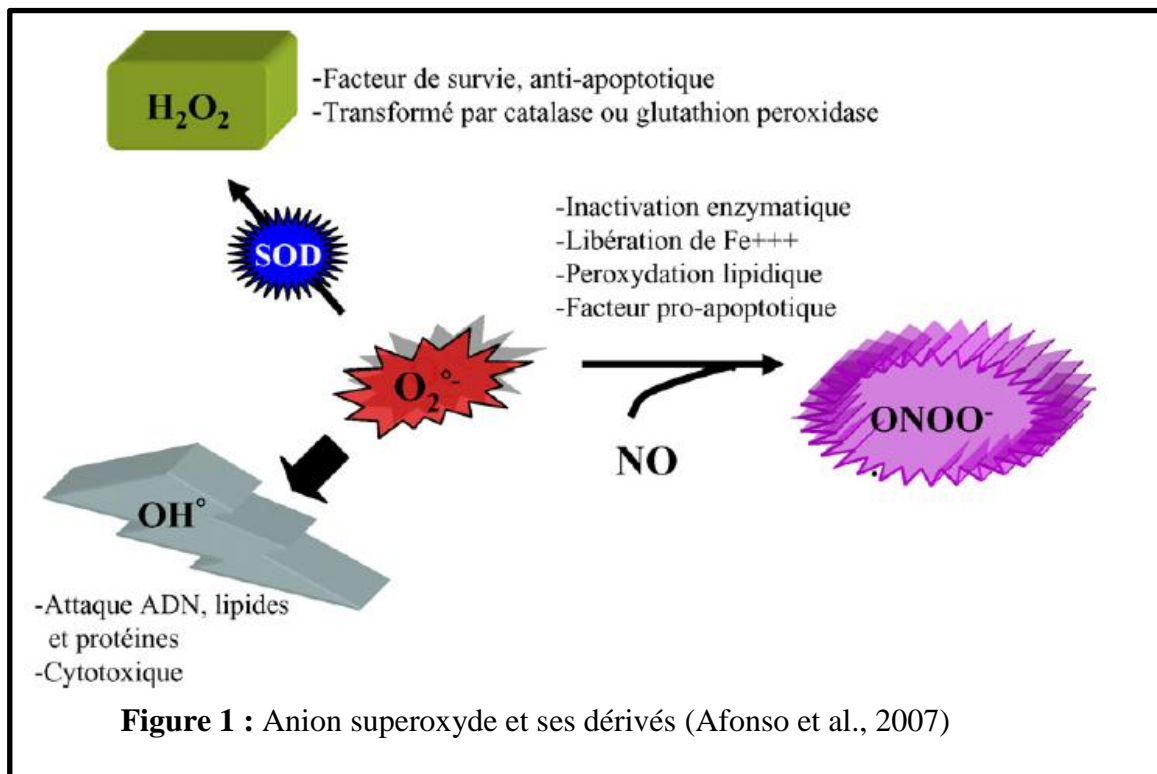
Au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production de  $O_2^{\cdot-}$  se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Si usuellement cette production de  $O_2^{\cdot-}$  reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires (effet du TNF  $\alpha$ ) ou nutritionnels (carence en ubiquinone), qui augmentent avec l'âge (Cadenas et Davies, 2000).

les cellules phagocytaires activées qui sont le siège de l'explosion oxydative l'activation du complexe NADPH oxydase, produisent de grandes quantités de  $O_2^{\cdot-}$  (Favier, 2003) selon la réaction :



Le  $O_2^{\cdot-}$  est lui mêmes peu réactif vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques (acides nucléiques, protéines, lipides et leurs constituants). C'est donc une espèce dont la durée de vie est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes) et qui peut diffuser bien au-delà de son lieu de production pour atteindre leur cible.

Toutefois, il existe très peu de cibles privilégiées de  $O_2^{\cdot-}$  (Halliwell et Gutteridge, 1999). En réalité, la toxicité de  $O_2^{\cdot-}$  semble s'exercer plutôt d'une manière indirecte. En effet, en réagissant avec l'eau oxygénée,  $O_2^{\cdot-}$  peut donner naissance à  $\cdot\text{OH}$  (réaction dite de Haber Weiss, catalysée par  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou bien encore, en réagissant avec des radicaux  $\cdot\text{NO}$  (monoxyde d'azote, radical centré sur l'azote), conduire à l'apparition de peroxydite dont la toxicité est maintenant bien établie (Moncada et al., 1991). En outre, la dismutation spontanée du  $O_2^{\cdot-}$  est suffisamment rapide, même en l'absence de superoxyde dismutase (SOD), pour que la production d'eau oxygénée soit en elle-même un phénomène délétère via les réactions de Fenton et de Haber Weiss, c'est-à-dire via la production de  $\cdot\text{OH}$  (Sharpe et al., 2003). Certaines études proposent également le superoxyde comme messenger secondaire, mais son rôle direct comme agent de signalisation n'est pas encore clairement établi. (Gardès-Albert et al., 2003).



#### 4.2. Le peroxyde d'hydrogène.

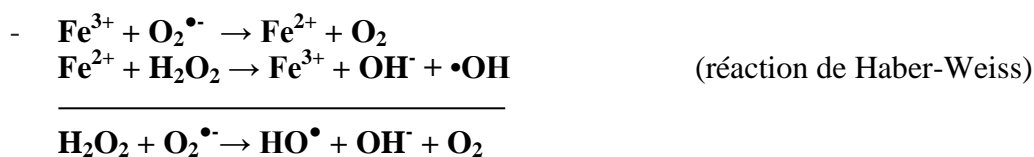
Ce n'est pas un radical libre à proprement parler mais une molécule car tous ses électrons périphériques sont appariés. Il se forme par dismutation de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sous l'action d'une enzyme : la SOD.



Cependant, il peut générer <sup>•</sup>HO en présence de cations métalliques tels que Fe<sup>2+</sup> (réaction de Fenton), ou de Cu<sup>+</sup>.



De plus, en réagissant avec l'anion superoxyde, il fournit l'hydroxyle (réaction de Haber-Weiss)



Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui en tant que molécule non chargée peut traverser les membranes (Forman, 2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est proposé comme messager secondaire essentiellement chez les organismes supérieurs mais peut l'être également chez les procaryotes. Il interviendrait dans de nombreuses voies impliquant une signalisation redox, telles l'apoptose, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou encore l'agrégation plaquettaire (Stone et Yang, 2006). Des études ont montré que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est impliqué dans l'activation de l'activité enzymatique de S tyrosines kinases et de sérine/thréonine kinases, telles les MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Forman, 2007).

La toxicité biologique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tient surtout à sa capacité à produire <sup>•</sup>HO par la réaction de Fenton, comme décrit précédemment (Seaver et Imlay, 2004).

#### 4.3. Le radical hydroxyle

<sup>•</sup>HO est donc généré essentiellement à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via la réaction de Fenton (Wink et al., 1994). Cependant, les rayonnements UV (rupture homolytique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), les ultrasons (cassures des liaisons de l'eau) et les radiations ionisantes (radiolyse de l'eau) sont également capables de générer <sup>•</sup>HO (Von Sonntag, 2008).

<sup>•</sup>HO est une espèce radicalaire hautement réactive dont le temps de demi-vie avoisine 10<sup>-9</sup> secondes (Sies, 1993). C'est le plus puissant oxydant qui puisse être généré au sein des cellules. Il réagit instantanément de façon non sélective, aux limites de la vitesse de diffusion, avec toutes les macromolécules biologiques, sucres, acides aminés, phospholipides, nucléotides ainsi qu'avec les acides organiques (Valentine et Wang, 1998). Il est donc extrêmement toxique pour la cellule. En général, il réagit par arrachement d'un atome d'hydrogène d'une liaison C-H, conduisant à la formation concomitante d'un radical organique.

#### 4.4. L'acide hypochloreux (HOCl).

L'acide hypochloreux (HOCl) est obtenu par synthèse enzymatique grâce à MPO et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



La présence simultanée de cette enzyme et de  $H_2O_2$  est en général consécutive à l'activation des PMNs au cours de la réaction inflammatoire. En effet sous l'action de cytokines, ces cellules produisent  $O_2^{\bullet-}$  et par là-même  $H_2O_2$ . Il en résulte que HOCl est essentiellement produit majoritairement par les PMNs (Klebanoff, 1999; Furtmüller et al., 2000). Cette espèce est caractérisée par un pouvoir oxydant nettement plus élevé que le  $H_2O_2$  qui est mis à profit par les PMNs pour oxyder et chlorer des structures exogènes au cours de l'inflammation.

## **5. Le système myéloperoxydase / $H_2O_2$ / $Cl^-$**

En raison du fait que la MPO dans ce présent travail a fait l'objet de deux manipulations originales, il apparaît essentiel de détailler ses différents aspects afin de replacer aisément les expériences réalisées dans leur contexte.

Les granules azurophiles des PMNs contiennent en grande quantité de MPO. De concert avec la NADPH-oxydase membranaire, la MPO est impliquée dans la formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'oxydation de la matière biologique. Dans les PMNs stimulés, la NADPH- oxydase réduit l'oxygène moléculaire en  $O_2^{\bullet-}$  (Babior et al., 1973 ; Segal et Abo, 1993), dont la dismutation en peroxyde d'hydrogène fournit le substrat pour la myéloperoxydase.

Cette enzyme a été isolée pour la première fois en 1941, à partir de pus de patients souffrant d'empyème tuberculeux, par Agner, et à laquelle il donna le nom de verdoperoxydase, en raison de sa coloration verte intense (Agner, 1941). En 1943, l'enzyme a été rebaptisé myélo-peroxydase par Theorell et Akeson. En 1951, Chance a rapporté que la myéloperoxydase forme le composé I et le composé II lors de l'addition de  $H_2O_2$ . En 1969, Odajima et Yamazaki, mirent en évidence le composé III. Cependant, son extraction à partir des cellules, ne fut possible qu'en 1972, suite à l'utilisation d'un détergent adéquat, le bromure de cetyltriméthylammonium, par Desser et ses collaborateurs. Après cela, de par bon nombre d'études expérimentales de la réaction inflammatoires, il a été montré que la MPO est un bon marqueur des PMNs, et que son activité dans les tissus est corrélée avec le nombre de ces cellules (Smith et al., 1974 ; Bailey et Sturm, 1983 ; Lundberg et Arfors, 1983 ; Krawisz et al., 1984). L'importance de son activité bactéricide est connue depuis 1965 (Klebanoff et Luebke, 1965 ; Klebanoff et al., 1966) ; Cette importance

bactéricide à été largement confirmée depuis (Clark et al., 1976 ; Klebanoff, 1980 ; Jiang et al., 1997 ; Hampton et al., 1998). L'émergence de nouvelles techniques, notamment la cristallographie, a permis de faire évoluer les connaissances relatives à sa structure et de mieux comprendre son mode d'action et ses possibles implications.

Cette enzyme fait partie de la superfamille des peroxydases (EC 1.11.1), des protéines hémiques qui catalysent la réduction du  $H_2O_2$  et qui se retrouvent tant chez les plantes, que chez les champignons, les bactéries ou les mammifères. Néanmoins, leur structure primaire et tertiaire et la nature du groupe prosthétique divergent de façon importante, ce qui a eu pour effet de distinguer, d'une part, la superfamille des peroxydases de mammifères, et d'autre part, la superfamille des peroxydases de plantes, de champignons et de bactéries (Kimura et Ikeda-Saito, 1988).

La MPO est une peroxydase hémique présente en concentrations importantes (2 à 5 % en poids) dans les granules primaires des PMNs (Tobler et Koeffler, 1991 ; Borregaard et Cowland, 1997 ; Klebanoff, 1999). On la trouve également dans les monocytes en concentration plus faible, mais la présence de l'enzyme devient indétectable lors de la maturation en macrophages (Mathy-Hartert et al., 1996). Elle appartient à la famille des peroxydases de mammifères qui comprend, outre la MPO, la lactoperoxydase (LPO), l'éosinophile peroxydase (EPO), la peroxydase thyroïdienne (TPO) et la prostaglandine H synthase (PGHS), avec un pourcentage d'homologie de 69,8% au niveau de la séquence des acides aminés (Sakamaki et al., 1989).

### **5.1. Activités de la myéloperoxydase**

Les principales activités oxydantes de la MPO sont présentées dans le Tableau. 2.

La MPO (forme native :  $MPO-Fe_3^+$ ) forme trois différents complexes lors de sa réaction avec les produits de la flambée respiratoire, les composés I, II et III, avec des propriétés spectrales différentes (Odajima et Yamazaki, 1970)

### **5.2. Le composé I**

L'enzyme développe une activité de peroxydase particulière, la chloration .L'activité principale et la plus décrite de la MPO consiste en la synthèse de HOCl par les PMNs au cours de la défense

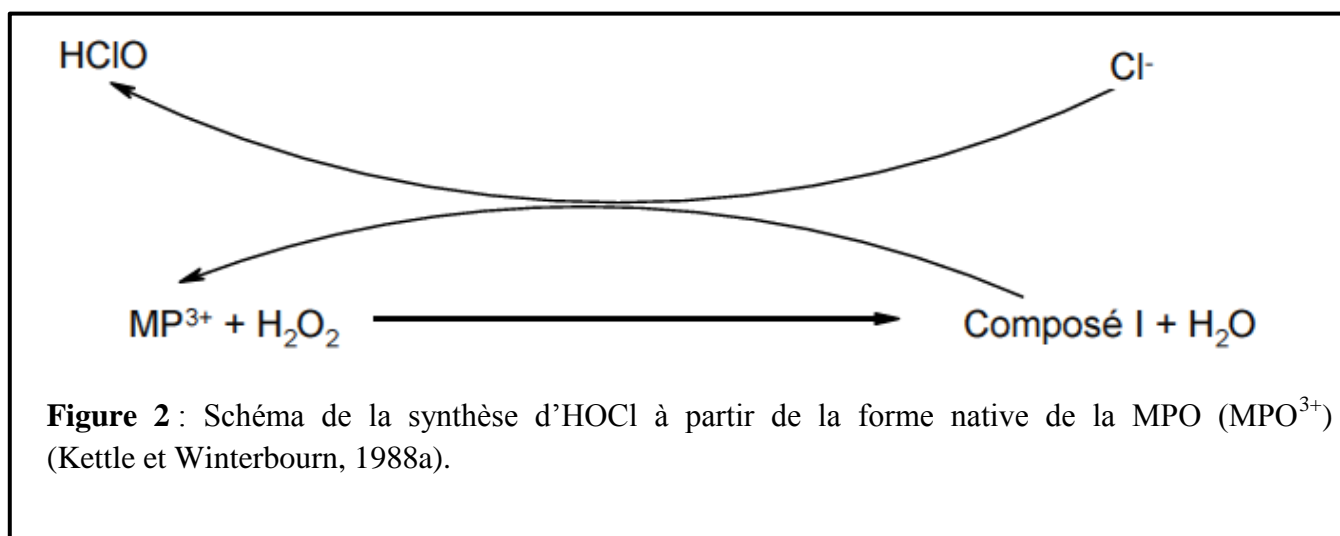
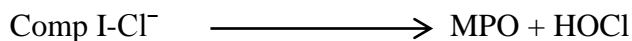
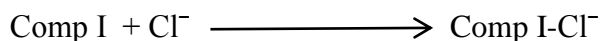
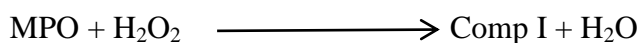
contre les structures exogènes (Klebanoff, 2005). Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à concentrations stoechiométriques (Odajima et Yamazaki, 1970), ou plus efficacement en excès

<p>1) <i>Production de l'acide hypochloreux (activité de chloration)</i></p> <p>1A) <math>\text{MPO-Fe}^{\text{III}}</math> (état natif) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <math>\leftrightarrow</math> <math>\text{MPO}^{\bullet+}\text{-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> (Cd I) + H<sub>2</sub>O</p> <p>1 B) <math>\text{MPO}^{\bullet+}\text{-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> + H<sup>+</sup> + Cl<sup>-</sup> <math>\leftrightarrow</math> <math>\text{MPO-Fe}^{\text{III}}</math> + HOCl</p> <p><i>Oxydation à deux électrons en deux étapes réactionnelles quasi simultanées.</i></p>
<p>2) <i>Activité de peroxydase</i></p> <p>2A) <math>\text{MPO}^{\bullet+}\text{-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> + D<sub>1</sub>H <math>\rightarrow</math> <math>\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> (Cd II) + D<sub>1</sub><sup>•</sup> + H<sup>+</sup></p> <p>2B) <math>\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> + D<sub>2</sub>H <math>\rightarrow</math> <math>\text{MPO-Fe}^{\text{III}}</math> + D<sub>2</sub><sup>•</sup> + H<sup>+</sup></p> <p><i>En deux étapes d'oxydation à un électron, qui exigent deux molécules de substrat réducteur</i></p>
<p>3) <i>Formation du Cd III</i></p> <p>3A) <math>\text{MPO-Fe}^{\text{III}}</math> + DH <math>\rightarrow</math> <math>\text{MPO-Fe}^{\text{II}}</math> (Cd III) + D<sup>•</sup></p> <p>3B) <math>\text{MPO-Fe}^{\text{II}}</math> + O<sub>2</sub> <math>\rightarrow</math> <math>\text{MPO-Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2</math></p> <p><math>\text{MPO-Fe}^{\text{III}}</math> : enzyme native ; <math>\text{MPO}^{\bullet+}\text{-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> : Composé I (Cd I) ;  <math>\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}\text{=O}</math> : Composé II (Cd II) ; DH / D<sup>•</sup> : donneur d'électrons, à l' état réduit / oxydé.</p>

**Tableau 2** : Principales activités de la MPO dans la production des EROs

(Marquez et al., 1994, Furtmüller et al., 2000), réagit rapidement avec le fer de la MPO (qui est normalement sous sa forme ferrique) pour former un complexe le composé I (Odajima et Yamazaki, 1970). La formation du composé I est un pré-requis indispensable à la synthèse d'HOCl par la MPO. Dans les conditions physiologiques, ce composé est formé par l'oxydation de la forme native de l'enzyme grâce à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avant que le chlorure ne soit oxydé par celui-ci. . À l'état natif (MPO-Fe), transforme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et fixe un atome d'oxygène en lui donnant deux électrons dont l'un vient de Fe<sup>III</sup> qui devient Fe<sup>IV</sup> et l'autre d'un acide aminé de la protéine qui prend un caractère radicalaire « π cation radical » désigné par les signes « •+ » (Tab. 2, équation 1A). Dans cet état (MPO<sup>•+</sup> - Fe<sup>IV</sup>=O) appelé « composé I » (Cd I, de l'anglais compound), elle reçoit deux électrons de Cl, disponible dans le milieu cellulaire, et retrouve son état natif, tandis que se forme HOCl, un puissant bactéricide et le produit le plus oxydant de la MPO (Tab. 2, équation 1B) (Serteyn et al. 2003 ; Klebanoff 2005).

La deuxième phase de l'activité de la MPO est l'oxydation par le composé I des dérivés (pseudo)halogénés et le retour à la forme native de la MPO. Furtmüller et al. (2000) se sont attachés à comprendre ce mécanisme réactionnel que l'on peut résumer comme suit :



Le modèle proposé met en évidence la formation d'un complexe entre le chlorure et le composé I. En réalité, de nombreuses expériences cristallographiques menées par l'équipe de Robert Fenna, ont tenté de mettre en évidence un site spécifique de fixation des (pseudo)halogénures tels que  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CN}^-$  et  $\text{SCN}^-$ . Il ressort de ces données qu'aucun site de fixation des chlorures ne peut être mis en évidence dans la cavité distale de l'enzyme. En ce qui concerne les bromures, le cyanure, le sulfocyanure, la disparité des données cristallographiques (Fiedler et al., 2000), démontre qu'à ce jour, il n'existe pas de site de fixation spécifique des (pseudo)halogénures dans la cavité distale de la MPO native et qu'un complexe MPO-(pseudo)halogénures dans la réaction est peu probable. Rappelons que ces résultats ont été obtenus par co-cristallisation de la forme native et des anions en raison du fait qu'il est difficile de travailler sur le composé I, très instable. Dès lors, ces résultats ne semblent pas infirmer le modèle de Furtmüller et al. (2000) dans lequel il se forme un complexe entre le composé I et le chlorure mais le mécanisme de cette oxydation doit encore être élucidé. Notons encore que l'oxydation par la MPO des (pseudo)halogénures s'opère dans le sens  $\text{Cl}^- < \text{Br}^-$

<I < SCN (Tableau 2) en fonction de l'espèce en présence, mais qu'étant donné la composition du liquide extracellulaire la réaction est en faveur de la production d'HOCl.

### 5.3. Les composés II et III

A côté de la voie classique de synthèse de HOCl, la MPO est capable de former le composé II (Cp II) par réduction du composé I en présence d'un donneur d'électron (Fig3). La réaction du composé I avec un excès d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (donneur d'électron) résulte dans la formation du composé II, qui est inactif en ce qui concerne l'oxydation du chlorure (Harrison, 1976). Cd I développe l'activité de peroxydase classique en 2 étapes de réduction monovalente :

- le premier électron arraché à un réducteur (D<sup>1</sup>H) met fin à l'état radicalaire sur la protéine le fer demeure à l'état Fe<sup>IV</sup> (Cd II ; Tab. 2, équation 2A)
- le second électron, arraché à D<sup>2</sup>H réduit Fe<sup>IV</sup> en Fe<sup>III</sup> (MPO-Fe<sup>III</sup> ; Tab. 2, équation 2B)

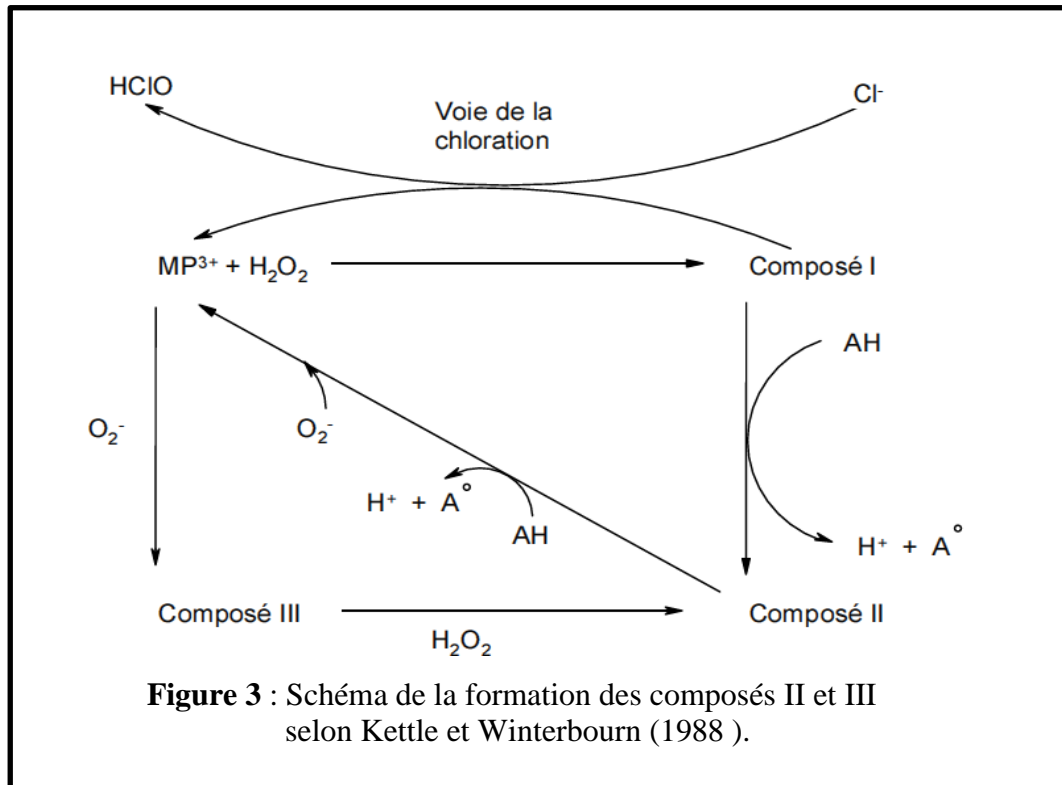
Le composé II peut être réduit sous la forme de l'enzyme native (forme active) par O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Kettle et Winterbourn, 1988, 1989, 1990), ainsi que par bon nombre d'autres agents réducteurs (Kettle et Winterbourn, 1988, 1990 ; Marquez et al., 1994), avec la restauration de sa capacité d'oxyder le chlorure pour former l'HOCl. Kettle and Winterbourn (1988, 1990, 1991) ont proposé que l'une des fonctions du O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pourrait être le maintien de la MPO sous une forme active en présence d'un excès d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pourrait donc potentialiser les dommages oxydatifs au niveau des sites de l'inflammation en optimisant la production de HOCl par la MPO, et l'effet anti-inflammatoire de la SOD peut être en partie le résultat de l'inhibition de cette réaction. Toutefois, la conversion du composé II en forme native de la MPO est considérablement plus lente que la conversion comparable par certains autres agents réducteurs, par exemple, l'acide ascorbique (Marquez et al., 1994 ; Marquez et Dunford, 1990), ce qui soulève une question sur le rôle physiologique de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans de l'activation du composé II de la MPO.

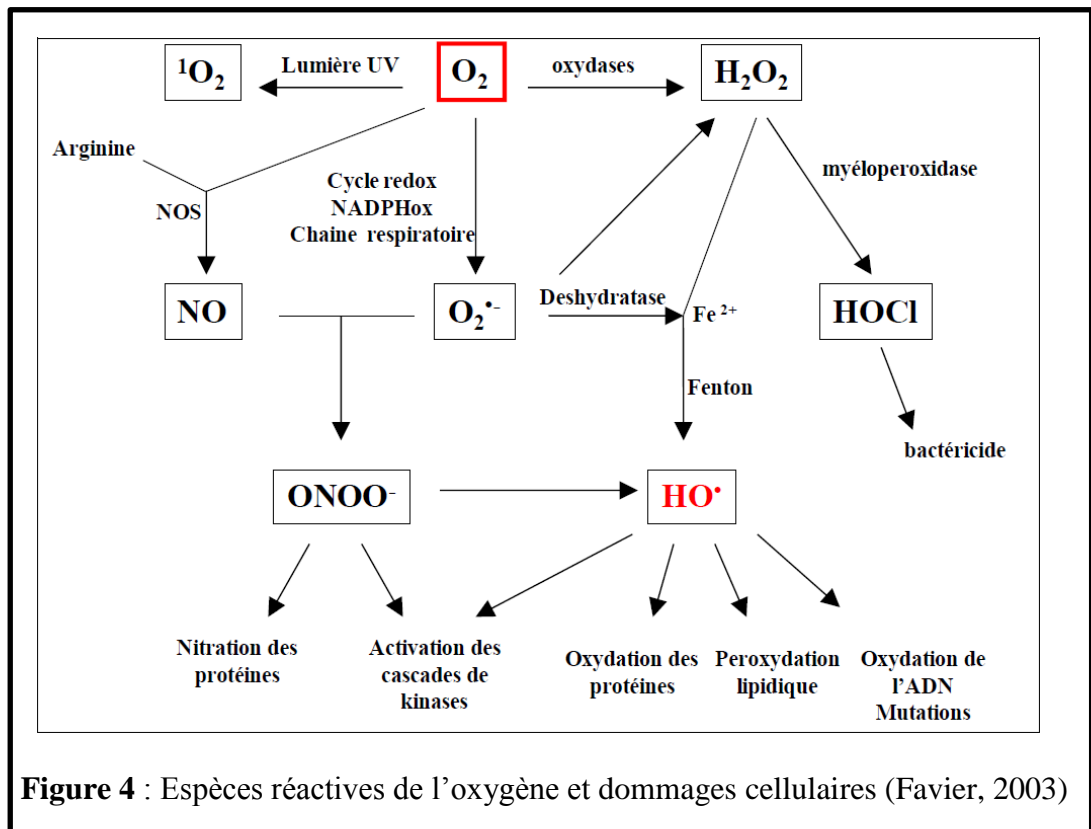
Des réducteurs peuvent transformer de manière réversible la forme native, encore active, (MPO-Fe<sup>III</sup>) en l'état inactif MPO-Fe<sup>II</sup> (Cd III, Tab. 2, équation 3A) (Serteyn et al. 2003). Tel pourrait être le cas en début de phagocytose pour maintenir dans le phagolysosome un pH



légèrement alcalin ou neutre permettant de laisser la MPO encore quiescente et d'atteindre une activité maximale de la Nox (Serteyn et al. 2003).

$O_2^{\cdot -}$  peut aussi réagir directement avec la MPO native pour former le composé III (Odajima et Yamazaki, 1970, 1972 ; Winterbourn et al., 1985 ; Metodiewa et Dunford, 1989 ; Kettle et al., 1988), une oxymyéloperoxydase, laquelle comme l'oxyhémoglobine, a son oxygène rattaché au fer de l'hème.





**Figure 4** : Espèces réactives de l'oxygène et dommages cellulaires (Favier, 2003)

## 6. Les défenses anti-oxydantes

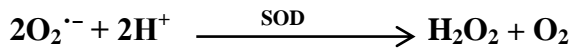
Les organismes vivants en aérobiose se sont adaptés à la vie en présence d'oxygène en développant des systèmes de défenses anti-oxydants, à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Le stress oxydant est une situation dans laquelle la balance entre pro-oxydants (EROs) et anti-oxydants est déséquilibrée, soit en raison d'une production excessive de ces EROs (par exemple dans les processus d'ischémie-reperfusion, les intoxications par des xénobiotiques, les pathologies chroniques telles que le diabète ou l'athérosclérose ... ), soit en raison d'un déficit en substances anti-oxydantes (vitamines anti-oxydantes d'origine endogène ou nutritionnelle et micronutriments nécessaires à l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes) (Halliwell et Gutteridge, 1999).

De façon générale, un anti-oxydant peut être défini comme étant une substance qui, présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat, peut significativement retarder ou inhiber l'oxydation de ce substrat (Comhair et Erzurum, 2002)

## 6.1. Les mécanismes de défense enzymatiques

### 6.1.1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Les superoxydes dismutases existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse O<sub>2</sub><sup>·-</sup> (Zelko et al., 2002).

Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnS OD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD)

L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc. Des valeurs basses en SOD peuvent s'expliquer par des taux faibles en oligo-éléments bien qu'il n'existe pas de corrélation absolue entre les concentrations de SOD et ceux-ci (Rukgauer et al, 2001).

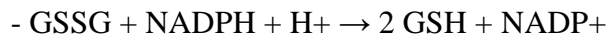
-Les principales enzymes capables de détruire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont les catalases à cofacteur fer et les glutathions peroxydases (GPx) à cofacteur sélénium (Ganther, 1999)

### 6.1.2. Glutathion peroxydase et glutathion réductase

La GPX est une enzyme séléno-dépendante, dont il existe plusieurs isoformes, réparties différemment dans la cellule. Elle catalyse la réaction de transformation des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette réaction met en jeu une molécule anti-oxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH. En réalité, 2 molécules de GSH sont nécessaires pour former la forme oxydée du glutathion à savoir le glutathion disulfide (GSSG) (fig5).

La glutathion réductase (GR) a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons (Maddipati et al, 1987). La GR est chargée de réduire le

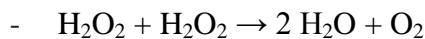
glutathion qui a été oxydé par les nombreux processus cellulaires. Elle utilise l'oxydation du NADPH en NADP<sup>+</sup> pour réduire le GSSG, suivant la réaction



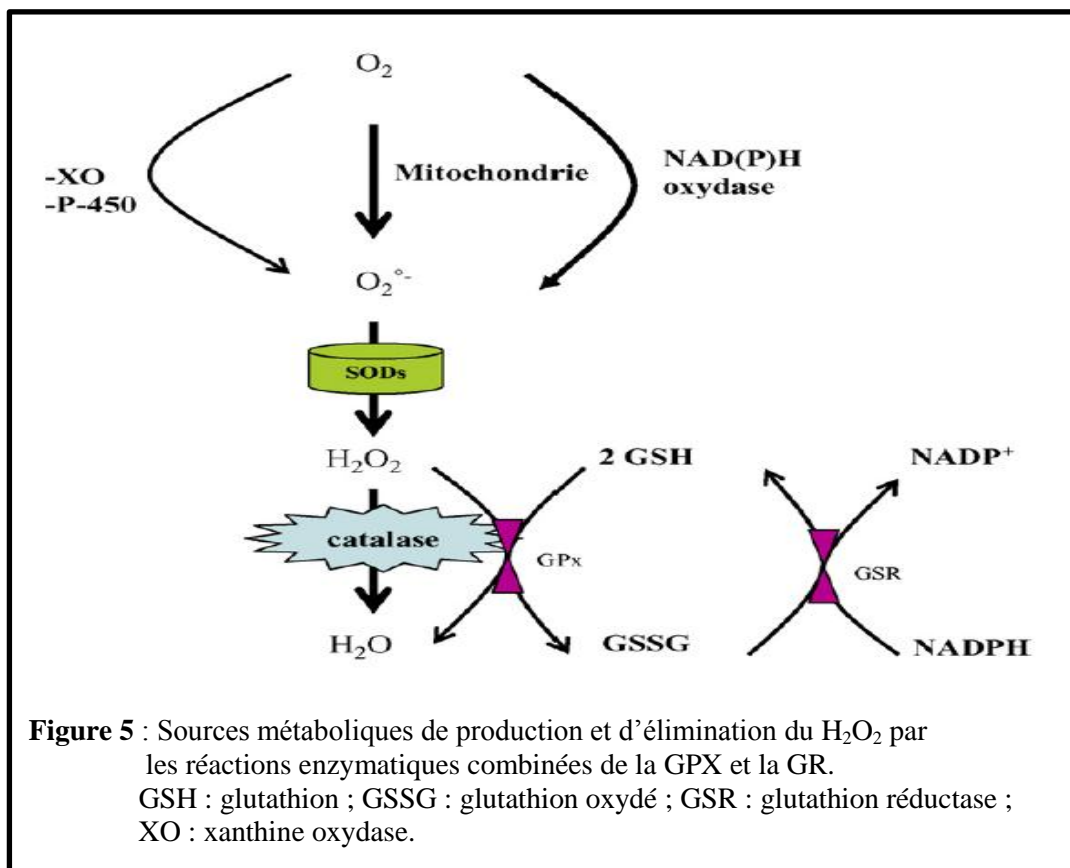
Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par les superoxydes dismutases seules (fig5) (Favier,2003)

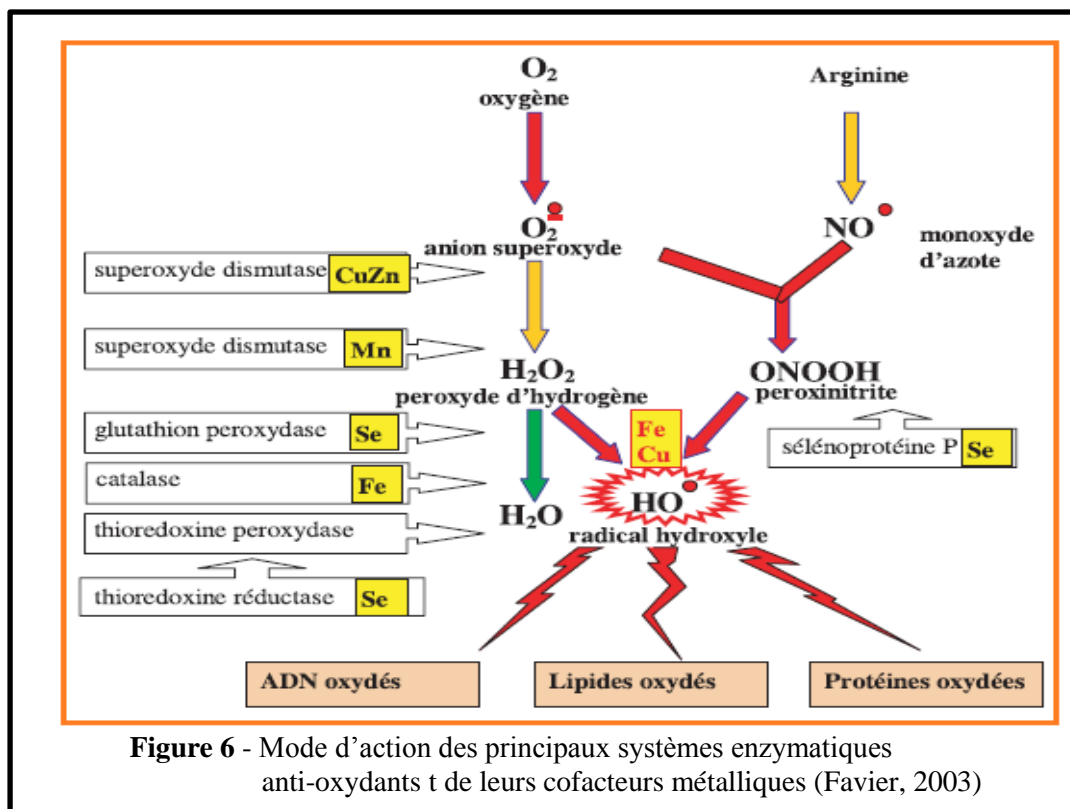
### 6.1.3. Catalases

La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau Catalase



Contrairement à la GPX, l'affinité de la catalase pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est élevée seulement lorsque la teneur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est élevée (Matés, 2000). Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol





## 6.2. Les mécanismes de défense non enzymatiques

Certaines molécules -pour la plupart apportés par l'alimentation- présentes dans l'organisme ont des propriétés antiradicalaires. Elles sont capables d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène par des processus d'oxydoréduction. Lorsqu'elles sont présentes dans des zones de risque, comme les membranes cellulaires, certaines protéines et l'ADN, elles les protègent en orientant l'espèce réactive vers une voie métabolique précise.

### 6.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Le GSH participe de façon prépondérante aux mécanismes de défense cellulaires grâce à sa fonction sulfhydryle (-SH) à l'origine d'une grande réactivité et d'un puissant pouvoir réducteur (Lehucher-Michel et al., 2001)

Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et

permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés anti-oxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. La plupart des protéines dont l'albumine contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées (Haleng et al., 2007). Les principaux dérivés à fonction thiol sont formés à partir des acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) apportés par l'alimentation protéique. La cystéine participe à la formation du glutathion au niveau du foie. Son pouvoir antiradicalaire s'exerce face aux radicaux  $O_2^{\cdot-}$  et  $\cdot OH$  (Lehucher-Michel et al., 2001).

### **6.2.2. La vitamine C**

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EROs ( $\cdot HO$  ou  $O_2^{\cdot-}$ ). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (Haleng et al., 2007).

### **6.2.3. La vitamine E**

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est l'anti-oxydant liposoluble majeur des lipides. Elle protège *in vivo* les structures moléculaires particulièrement sensibles à l'oxydation (double liaisons des acides gras polyinsaturés, bases nucléotidiques des brins d'ADN) et les structures condensées riches en lipides (membranes, lipoprotéines). La régénération de l' $\alpha$ -tocophérol se fait en permanence par les quinones et la vitamine C au niveau des sites d'action de la vitamine E, à l'interface entre les lipides et l'eau (figure). Le potentiel anti-oxydant de l' $\alpha$ -tocophérol est important malgré sa faible concentration membranaire. La teneur en vitamine E membranaire et son stockage adipeux, hépatique et musculaire sont d'ailleurs peu influencés par les apports

nutritionnels (Guillang et Lhuissier, 1996), sauf au cours des syndromes de malabsorption intestinale.

#### **6.2.4. Les caroténoïdes**

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le  $\beta$ -carotène, également appelé provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A. Tous les caroténoïdes ne possèdent toutefois pas cette propriété particulière (Haleng et al., 2007).

Le rôle anti-oxydant du bêta-carotène (provitamine A) est dû aux nombreuses doubles liaisons conjuguées. Il protège ainsi l'organisme contre les agressions de  $^1O_2$ . Certains auteurs ont montré qu'il pourrait agir en synergie avec la vitamine E pour protéger les membranes cellulaires (Palloza et Krinsky, 1992). Plusieurs études, dont l'étude YALTA (Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants), ont montré que l'effet bénéfique du  $\beta$ -carotène ne survenait qu'à des doses physiologiques ou alimentaires, alors qu'il est plutôt délétère à doses pharmacologiques, particulièrement chez le fumeur. Le tabagisme expose à des taux élevés d'EROs endogènes et exogènes et pourrait altérer le métabolisme de certains caroténoïdes, libérant des métabolites pro-carcinogènes (Hozawa et al., 2007)

#### **6.2.5. Les polyphénols**

Aliments et boissons riches en flavonoïdes et autres polyphénols ont été associés avec un risque réduit de maladies liées à l'âge dans plusieurs -mais pas toutes- études épidémiologiques ( Hirvonen et al., 2001 ; Geleijnse et al., 2002 ; Mukamal et al., 2002).

*In-vitro*, les polyphénols démontrent une puissante activité anti-oxydante par leur capacité de piéger une large gamme d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote telles que  $O_2^{\cdot-}$  et  $\cdot OH$ , les acides hypochloreux et peroxy-nitrique (Silva et al., 2002 ; Mira et al., 2002; Shirai et al., 2006). Ils peuvent agir également comme agents chélateurs de métaux, diminuant ainsi leurs effets pro-oxydants (Mira et al., 2002 ; Rice-Evans, 2000 ). De même ils ont la propriété d'inhiber la capacité

de la myéloperoxydase d'oxyder les lipoprotéines de base densité (LDL), un effet anti-atherosclérotique potentiel (Steffen et al., 2006).

Cependant il ne faut pas occulter le fait que les polyphénols peuvent agir en tant que pro-oxydants. En effet ils s'oxydent aisément dans les boissons (Aoshima et al., 2007 ; Sang et al., 2005 ; Akagawa et al., 2003) tel que le thé vert. L'interaction entre les polyphénols et les métaux de transition peuvent être souvent à l'origine de ces effets pro-oxydants (Ko et al., 2006 ; Hadi et al., 2007). Il a été soutenu que les polyphénols pourraient exercer un effet anti-oxydant et cytoprotecteur sur le tractus gastro-intestinal ou ils peuvent être présents en grande quantité (Kanner et Lapidot, 2001 ; Halliwell et al., 2005). Cependant, comme il y'a souvent présence d'ions métalliques (en particulier le fer) dans le tractus gastro-intestinal, des effets pro-oxydants pourraient éventuellement s'y produire. En effet ces effets ont été démontrés chez des insectes consommant de grandes quantités de substances phénoliques (Barbehenn et al., 2005a, 2005 b) L'oxydation des polyphenols produit  $O_2^{\cdot-}$ , de l' $H_2O_2$  et une mixture complexe de quinones et semiquinones, tous potentiellement cytotoxiques (Lambert et al., 2007 ; Sang et al., 2007)

#### **6.2.6. Les oligoéléments**

Les oligo-éléments sont des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les grandes voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires. Le rôle anti-oxydant paradoxal du fer s'exerce par l'intermédiaire de la catalase. Cependant sous forme d'ion  $Fe^{2+}$  libre, le fer peut être pro-oxydant par l'intermédiaire des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Le zinc remplit de multiples rôles dans l'organisme: un effet antioxydant par sa participation au maintien de l'activité de la SOD cytoplasmique cuivre et zinc dépendante, un effet modulateur de l'apoptose et une activité de défense anti-infectieuse (Anderson et al., 2001). Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx (Haleng et al., 2007).



## **7. Quelques pathologies liées au stress oxydant chez l'homme.**

Les conséquences pathologiques du stress oxydant sont aussi nombreuses que variées. Le seul facteur commun favorisant le stress oxydant est l'âge, dans la mesure où le vieillissement affaiblit les réponses anti-oxydantes et perturbe la respiration mitochondriale (Sohal et al., 2002).

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Il faut distinguer les maladies dont le stress oxydant est la cause principale, et celles dont l'expression implique celui-ci (toute maladie implique une inflammation, donc un stress oxydant). La première catégorie inclut les rhumatismes, l'arthrite, l'arthrose, la cataracte, le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), l'oedème pulmonaire... et de façon générale, le vieillissement accéléré de tissus comme la peau. La deuxième catégorie inclut le diabète, la maladie d'Alzheimer, les cancers et les maladies cardiovasculaires (Montagnier et al., 1997).

Il est important de souligner que le lien de causalité entre le stress oxydant et l'apparition des pathologies reste un sujet de controverse dans la communauté scientifique. Le déséquilibre oxydant/anti-oxydant est-il la cause ou la conséquence de ces pathologies ? La carence en micro-nutriments résulte-t-elle d'une carence d'apport et/ou d'une consommation excessive résultant du stress oxydant ? Où se situe la frontière entre stress oxydant physiologique et pathologique? (Magder, 2006).

La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Sohal et al., 2002).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement

accélééré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme p53. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Montagnier et al., 1998).

Dans la genèse de la plaque d'athérome, l'oxydation des LDL est un des phénomènes clefs transformant les monocytes en cellules spumeuses. Le stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes : augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs pro-oxydants (prostacycline, cytokine, facteur de fibrinolyse,  $O_2^{\cdot-}$ , NO), augmentation de la prolifération des fibres lisses. Un facteur de risque découvert récemment, l'homocystéine, voit son action liée en partie à la génération de radicaux libres au cours de son métabolisme (Favier, 2003).

Les causes essentielles de ce stress oxydant sont soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs pro-oxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène. La responsabilité la plus nette des radicaux libres est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant. Plusieurs mutations de la CuZn SOD ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Le transfert du gène de malade chez la souris recrée d'ailleurs une maladie analogue à la maladie humaine. La dégénérescence maculaire liée à l'âge est fortement associée avec la forme valine/alanine du polymorphisme du gène de la SOD (Favier, 2003).

### **7.1. Maladie d'Alzheimer**

Plusieurs hypothèses physiopathologiques ont été proposées quant à cette maladie, qui font intervenir les radicaux libres ou certains composés réactifs. Les principaux sont  $\cdot OH$  le composé

réactif peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) ainsi que ses précurseurs le monoxyde d'azote et  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Christen, 2000). Le stress oxydant est mis en évidence par une élévation des produits terminaux ou de certains intermédiaires réactifs: l'élévation intracérébrale du malondialdéhyde signe la lipoperoxydation, l'élévation de la 8-OH-2-déoxyguanosine et de l'hème-oxydase signe les lésions oxydatives de l'ADN ; le peroxynitrite et la nitrotyrosine sont également élevés, ainsi que, au niveau des agrégats neurofibrillaires, les protéines carbonylées et certains produits de glycosylation [Christen, 2000, Grundman, 2000]. Plusieurs mécanismes de lutte contre les radicaux libres sont perturbés : les activités sériques de la Cu,Zn SOD et de la catalase sont augmentées chez les patients, et des concentrations intracérébrales élevées en glutathion, glucose-6-phosphate déshydrogénase, catalase et SOD sont rapportées, par rapport à des sujets témoins (Grundman, 2000). Ces anomalies sont interprétées comme une exacerbation des mécanismes de défense lors de la maladie. L'une des hypothèses principales met en jeu la protéine amyloïde, que l'on retrouve dans les plaques séniles caractéristiques de la maladie. Elle a un effet toxique direct sur les cultures cellulaires neuronales (Christen, 2000, Grundman, 2000). La toxicité de la protéine amyloïde serait liée à une stimulation de la lipoperoxydation des membranes cellulaires synaptiques, à une atteinte radicalaire des protéines, de l'ADN nucléaire ou de l'ADN mitochondrial, à une stimulation de la production de radicaux libres dans les cellules microgliales (Christen, 2000, Grundman, 2000), mais aussi à une atteinte de type pro-inflammatoire des cellules endothéliales vasculaires (Christen, 2000).

## **7.2. Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)**

La SLA est une maladie neurodégénérative, et c'est aussi la plus fréquente des maladies neuromusculaires. Son évolution est rapidement défavorable, avec une médiane de survie comprise entre 23 et 52 mois. Elle se manifeste en priorité dans la sphère neurologique. Quatre-vingt-dix pour cent des patients ont une forme sporadique de la maladie, les autres une forme familiale (Desport et Maillot, 2002). Des altérations des processus de défense contre les radicaux libres par mutations du gène codant pour la Cu,Zn-SOD1 (SOD de type 1), situé sur le chromosome 21, ont été mises en évidence dans 10 à 20 % des formes familiales (Bowling et al., 1993 ; Borchelt et al., 1994 ;

Bowling et Beal, 1995 ; Wong et al., 1996 ; Przedborski et al., 1996). Cette découverte est à l'origine de l'une des deux principales hypothèses physiopathologiques de la maladie : l'hypothèse « oxydative ». L'enzyme Cu,Zn-SOD1 est une métallo-enzyme cytosolique ubiquitaire qui catalyse la conversion de  $O^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , qui lui-même peut-être transformé en eau par action de la GPx ou de la catalase. Il y a donc là un effet antiradicalaire. Plus de 60 mutations de la SOD1 ont été décrites lors de la SLA familiale au niveau de diverses lignées cellulaires, qui se traduisent en général par une baisse de 30 à 70% de l'activité SOD1 (Bowling et Beal, 1995, Cookson et Shaw, 1999). Par comparaison aux autres types de neurones, motoneurones humains normaux ont une expression élevée de la SOD1, peut-être en relation avec leur intense activité métabolique et leur grande taille. Ceci explique en partie leur sensibilité à une baisse d'activité de l'enzyme et au stress oxydant (Cookson et Shaw, 1999). Les autres raisons invoquées sont leur faible contenu en glutathion, à effet anti-oxydant, la concentration de leurs membranes cellulaires en acides gras polyinsaturés, et enfin les fortes quantités d'oxygène utilisées à l'état normal par le métabolisme neuronal, d'où une forte production de radicaux libres liée au fonctionnement mitochondrial (Christen, 2000). D'autres mécanismes de toxicité peuvent être présents en cas de baisse d'activité SOD1 : il peut y avoir une activation de la production de  $\cdot OH$ , toxiques pour la SOD1 elle-même et pour diverses structures cytoplasmiques [Cookson et Shaw, 1999] ; on peut mettre en évidence une augmentation de la formation de  $ONOO^-$ , qui est un dérivé oxygéné toxique non radicalaire inducteur de la nitration des récepteurs tyrosine (Christen, 2000, Cookson et Shaw, 1999, Torreilles et al., 1999). L'augmentation de la production de  $ONOO^-$  est repérée par le dosage de la 3-nitrotyrosine. La nitration des radicaux tyrosine génère des lésions des récepteurs des facteurs de croissance neuronaux ou des neurofilaments (Brown, 1996).

### **7.3. Le diabète**

Le diabète sucré est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il résulte d'une déficience de la sécrétion et/ou de l'activité de l'insuline. La classification, basée sur l'étiologie de la maladie, distingue quatre types de diabète : type 1, type 2, diabète gestationnel et les autres types (parmi

lesquels des déficiences génétiques conduisant à un déficit en insuline, des altérations génétiques des cellules bêta pancréatiques, des diabètes mitochondriaux, et plusieurs endocrinopathies ou maladies du pancréas). La majorité des cas de diabète sont représentés par les diabètes de type 1 et de type 2 (respectivement environ 15 % et 80 % des cas), le reste étant constitué par des formes plus rares, telles que les diabètes MODY («*maturity-onset diabetes of the young*») représentant moins de 5 % des cas (Bonfont-Rousselot et al., 2004).

Un état de stress oxydant a été décrit dans le diabète ; il s'agit d'un déséquilibre entre la production des EROs, en particulier des radicaux libres, et les défenses anti-oxydantes [Bonfont-Rousselot, 2002 ; Laight et al., 2000]. Ce stress oxydant pourrait être impliqué dans les atteintes tissulaires [Betteridge, 2000] et pourrait représenter un nouveau facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires au cours du diabète de type 2. L'hyperglycémie, en conduisant à un état de stress oxydant, peut être impliquée dans de nombreuses complications du diabète (néphropathie, rétinopathie, neuropathie) [Baynes et Thorpe, 1999 ; Rosen et al., 2001], en particulier par la production de produits de glycation avancée (AGE : «*advanced glycation end products*») et l'oxydation de macromolécules, notamment celles de la matrice extracellulaire. Diverses études ont montré que dans le diabète de type 2, l'hyperactivation de la glycolyse mitochondriale conduit à un stress oxydant. Ce stress inhibe à la fois la sécrétion d'insuline (Krippeit-Drews et al., 1994) et la transduction de son signal, conduisant vers l'insulino-résistance (Delattre et al. 1999). En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit massivement dans la mitochondrie sous les effets de l'hyperglycémie chronique du diabète, inhibe l'auto-phosphorylation du récepteur de l'insuline et son substrat IRS-1 (Insulin receptor substrat-1). Cette inhibition se répercute sur l'activation de la PI3-kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase) et les MAP kinases (mitogen-activated protein kinases), la translocation du transporteur du glucose GLUT4, l'activation de la protéine kinase B et médie les effets du TNF $\alpha$ , favorisant un syndrome inflammatoire (Hansen et al. 1999).

Dans le diabète de type 1, certains travaux ont pu montrer que le stress oxydant conduit vers la destruction insulaire du pancréas, soit par nécrose ou apoptose de la cellule bêta (Bonfont-Rousselot 2002). Les effets délétères à la fois de l'hyperglycémie chronique (glucotoxicité) et des

Acides Gras Libres (lipotoxicité) trouvent leur impact au niveau mitochondrial (Brownlee 2001). En effet, l'élévation accrue des AGL favorise la synthèse de céramides qui vont activer la NO synthase. L'excès de NO formé accentue la formation du radical du monoxyde d'azote, ce qui va inhiber la cytochrome C oxydase, entraînant l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (PTP) de la membrane interne mitochondriale. Cette brèche du PTP conduit à la fuite de protons et entraîne à son tour un gonflement mitochondrial, la sortie du cytochrome C dans le cytosol et l'activation des caspases, phénomène relié à la mort de la cellule bêta (Detaille et al., 2002). D'autre part, les EROs agissent comme second messenger des interleukines, ce qui explique la destruction de la cellule bêta dans le diabète type 1 autoimmun (Cunningham et Green, 1994).

#### **7.4. Cancer**

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformations pouvant se dérouler sur une période de plusieurs années. La cancérogenèse est donc un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état pré-cancéreux et, finalement, à un stade précoce de cancer. Le développement du cancer se divise en trois grandes étapes (initiation, promotion et progression) dans lesquelles le stress oxydatif est impliqué (Pincemail et al., 1999).

L'étape d'initiation débute lorsque des agents chimiques carcinogènes se fixent sur l'acide désoxyribonucléique (ADN). Des lésions peuvent également se produire sous l'effet de radiations ionisantes ou de rayonnements ultraviolets. Dans ce cas, les EROs, dont font partie les radicaux libres et  $l^1O_2$  (Pincemail et al., 1998), jouent un rôle important dans l'altération du matériel génétique des cellules.  $\cdot OH$  s'attaque à la guanine, base purique constitutive de l'ADN, qui se transforme en 8 hydroxy-2' déoxyguanosine (Poulsen et al., 1998). Ceci a comme conséquence l'apparition d'une mutation au niveau de l'ADN.  $l^1O_2$  réagit aussi avec la guanine pour former un autre dérivé oxydé, la 8-oxo-7, 8-dihydroguanine. Les EROs peuvent aussi agir comme messagers secondaires (Palmer et Paulson, 1997) en modifiant dans la cellule la régulation rédox du glutathion (GSH) qui est un agent anti-oxydant important. Il en résulte une activation de la thiorédoxine (TRX) qui active le facteur de transcription qu'est le  $NF-\kappa B$  normalement dans un état inactif dans

le cytoplasme. Une fois activé, le NF- $\kappa$ B migre dans le noyau de la cellule où il peut transactiver des gènes cibles. Il participe de la sorte à la synthèse de nombreux médiateurs comme des protéines d'adhésion impliquées dans le processus du développement du cancer. Grâce au stress oxydatif, les cellules tumorales agissent sur leurs plus proches voisines pour faciliter leur « échappée » hors de la tumeur initiale. Dans un cancer, les cellules tumorales évoluent dans une niche, le stroma, composé essentiellement de cellules de soutien, les fibroblastes. Lorsque ces fibroblastes sont soumis à un stress oxydatif, on constate qu'ils se transforment en myofibroblastes, des cellules connues pour leurs propriétés contractiles. En fait, ce stress oxydatif provient de la tumeur elle-même.

Les radicaux libres ainsi produits par les cellules tumorales diffusent dans les cellules environnantes, ce qui conduit à l'accumulation des deux protéines dans les fibroblastes, la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1) et le facteur de transcription HIF-1. Ce sont ces protéines qui provoquent la conversion des fibroblastes en myofibroblastes aux fortes capacités migratoires. Ces deux protéines, CXCL12 et HIF-1, constituent en quelque sorte une signature du stress oxydatif.

Le stress oxydatif varie en fonction du type tumoral. Les tumeurs qui surexpriment le récepteur HER2 souffrent d'un stress oxydatif important ; elles produisent de nombreux radicaux libres qui se propagent ensuite dans les tissus environnants (Toullec et al., 2010).

### **7.5. Athérosclérose**

L'athérosclérose est aujourd'hui la cause majeure de morbidité dans les pays développés. Cette atteinte inflammatoire chronique des artères de gros calibre a une étiologie multifactorielle, et une présentation clinique et biologique très variable selon les individus. Les mécanismes physiopathologiques de formation et d'évolution des lésions athéromateuses vasculaires sont liés aux facteurs de risque de cette pathologie (hypertension, hyper-LDLémie, diabète, tabagisme...) pour lesquels le stress oxydant est retrouvé, à des degrés divers, comme composante des événements cellulaires et moléculaires délétères pour le tissu vasculaire, à la fois dans sa structure et ses fonctions (Beaudeau et al., 2006). L'implication du stress oxydant dans les pathologies cardiovasculaires a été initialement révélée par l'oxydation des lipoprotéines de basses densités, les LDL, dont la modification biochimique qui en résultait leur conférait un pouvoir

athérogène (Witztum et Steinberg, 2001). Ce mécanisme se double en fait de l'augmentation de la production de EROs et de l'azote par les cellules de la paroi artérielle, qui concourt fortement à l'altération des fonctions vasculaires, effecteur majeur du processus d'athérogenèse et de fragilisation des lésions athéroscléreuses. L'oxydation des lipoprotéines athérogènes telles que les LDL (ou la lipoprotéine Lp(a) (Beaudeux, 1999) a été proposée au cours des années 1980. L'oxydation des LDL est l'un des processus de modification des LDL, avec la glycation ou l'agrégation par exemple, permettant leur fixation au niveau intrapariétal vasculaire, et finalement leur action toxique vis-à-vis des cellules environnantes. In vivo, différents EROs peuvent permettre l'oxydation des LDL, qui génère de nombreuses modifications à la fois des lipides et de la copule protéique (apolipoprotéine B, apo B) de la lipoparticule (Heinecke, 1997). Le pouvoir athérogène des LDL ainsi oxydées résulte de l'action de lipides oxydés pro-inflammatoires ou de l'apo B modifiée (favorisant leur captation par des récepteurs non conventionnels) à la fois sur les monocytes-macrophages, sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses. Les lipoprotéines de haute densité (HDL), traditionnellement reconnues comme protectrices vis-à-vis du risque athéromateux, peuvent également subir des modifications oxydatives, produisant aussi des effets délétères. Les HDL exercent un pouvoir antiathérogène en favorisant l'efflux cellulaire et le transport inverse du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie. Elles ont également des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires par la présence en leur sein d'enzymes capables de détruire les lipides oxydés pro-inflammatoires, parmi lesquelles la paraoxonase et la PAF-acétylhydrolase. L'action des EROs sur ces molécules enzymatiques réduirait ou inhiberait la capacité des HDL à « détoxifier » les lipides oxydés provenant d'autres lipoparticules (LDL notamment). De façon plus générale, les HDL oxydées présentent une diminution de leur capacité à promouvoir l'efflux du cholestérol cellulaire et une altération de leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Comme pour les LDL, il est très probable que l'oxydation in vivo des HDL a lieu dans le liquide interstitiel au niveau des sites d'inflammation et non au niveau systémique (Van Lenten et al., 2001).



## 8. Le stress oxydatif chez les animaux de rente

Le stress oxydatif dans les maladies des animaux d'élevage a été principalement étudié chez les porcs, les bovins et les chevaux, et s'est focalisé surtout sur les niveaux d'ascorbate et la production de NO<sup>•</sup>. Les études chez les porcs et bovins ont été quelque peu sporadiques et ont principalement porté sur les maladies infectieuses, telles que la pneumonie, l'entérite, la mammite, l'endométrite et la septicémie. Les études chez les chevaux, en particulier les chevaux de course et les chevaux avec obstruction des voies respiratoires ont été plus systématiques, y compris récurrente obstruction des voies aériennes (RAO), l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (EIPH), la fourbure, l'arthrite et la strangulation intestinale (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007).

Dans une étude visant à déterminer lors de mises bas spontanées et non compliquées l'influence de la durée de la phase d'expulsion sur l'apparition du stress oxydatif post-partum chez les truies, il a été constaté une forte baisse post-partum dans l'activité de la catalase et de la concentration en GSH dans le groupe avec la plus longue étape d'expulsion. Ces résultats laissent suggérer un épuisement dans les mécanismes de défense anti-oxydant résultant de la neutralisation d'une quantité excessive de EROs générés. Il semble que le risque accru d'épuisement des mécanismes des défenses anti-oxydants et l'apparition du stress oxydatif de grande intensité chez les truies chez lesquelles la mise bas dure pendant une longue période peut les prédisposer à l'apparition de maladies en période post-partum (Szcubia et al. , 2013).

Chez les ruminants et chez la vache laitière en particulier, le stress oxydatif a été associé à plusieurs états pathologiques, tels que la rétention placentaire, l'œdème du pis, la mammite, qui à leur tour peuvent altérer les performances de reproduction. Le rôle du stress oxydatif dans le contrôle de la reproduction des femelles n'a pas été pleinement élucidée chez les ruminants, mais il semble que les pro-oxydants et les anti-oxydants peuvent influencer l'axe de la reproduction à différents niveaux (Celi, 2010).

Dans les mammites bovines aiguës et sub-cliniques, les antibiotiques sont le traitement standard contre les microorganismes, parfois en combinaison avec des médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) pour la réduction de l'inflammation, de la fièvre et de la douleur. Il semble

y avoir un grand besoin de nouveaux objectifs d'intervention dans cette maladie très répandue car la part du stress oxydant est généralement complètement occulté (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007). Il existe une corrélation significative entre la supplémentation en anti-oxydants et la diminution de l'incidence des mammites (Allison et Laven, 2000; Smith et al., 1984; Weiss et al., 1997). Une diminution marquée des concentrations d'ascorbate a été trouvée chez les bovins laitiers présentant des formes sub-cliniques de mammites causées par *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ou *E. coli* en comparaison avec des témoins sains (Kleczkowski et al., 2005). Cela a également été démontré par Ranjan et al. (2005), que ce soit lors de mammites aiguës ou sub-cliniques. Dans le but de traiter le stress oxydatif lors de mammites, Chaiyotwittayakun et al. (2002) ont induit une mammites par perfusion intra-mammaire d'endotoxine et les vaches ont été traitées avec des doses élevées d'ascorbate. Bien que le traitement avec l'ascorbate n'a eu aucun effet sur les signes cliniques, la reprise de la production laitière a été améliorée par le traitement. Les anti-oxydants vit E et sélénium sont deux nutriments spécialement associés à la résistance aux mammites lorsqu'ils sont apportés en supplément pendant la période de transition. La supplémentation des vaches avec ces deux nutriments a raccourci la durée des symptômes cliniques de la mammites comparé à chaque nutriment donné séparément (Smith et al., 1984). Plusieurs études mettent le point sur la basse concentration plasmatique en vit E durant la période du péripartum et qui augmente lors de supplémentation en cette vitamine (Hogan et al., 1990, 1992; Weiss et al., 1997). Les auteurs ont corrélié cette augmentation avec une amélioration de la fonction des neutrophiles comme l'a montré une plus grande destruction intracellulaires de certains pathogènes et une diminution de l'incidence des mammites. Peu de recherches ont été effectuées sur les effets potentiels de la vitamine A et du  $\beta$ -carotène dans la contrôle des mammites. L'impact potentiel de ces deux substances sur la mammites reste incertain il en est de même pour les autres micronutriments tels que la vit C, le zinc et le cuivre. (Sordillo et Aitken, 2009). Blum et al., (2000) ont constaté qu'après la perfusion intra-mammaire de *E. coli* ou d'endotoxine de *E. coli*, les concentrations de nitrites et de nitrates augmentent nettement dans le plasma et le lait, cette augmentation n'a pas été affectée par le traitement avec l'antibiotique enrofloxacin. Toutefois, Bouchard et al. (1999) ont démontré que

l'augmentation des concentrations de nitrates et de nitrites dans le lait ont été empêchés par traitement avec l'aminoguanidine, inhibiteur spécifique de iNOS.

Au vu de ces résultats il serait intéressant d'essayer un traitement combiné de vit C et d'aminoguanidine pour prévenir les conséquences du stress oxydatif en relation avec la mammite (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007). Lors des maladies inflammatoires telles que les mammites, il y'a une augmentation de la peroxydation lipidique ce qui entraîne une diminution du niveau de certaines molécules anti-oxydantes qui a pour conséquence un stress oxydatif (Weiss et al., 2004).

Un niveau élevé de NO réagit avec  $O_2^{\cdot-}$  aboutissant à la formation du peroxinitrite (Beckman et al., 1990). Ces derniers oxydent les acides gras à longues chaînes des membranes cellulaires il en résulte une augmentation dans la peroxydation lipidique et la formation de radicaux libres (Wang et al., 2002). Par conséquent, l'augmentation du niveau d'hydroperoxyde lipidiques suivant la peroxydation lipidique au cours de la mammite aiguë induite expérimentalement chez les bovins indique clairement que la mammite provoque la formation de radicaux libres (Celi, 2010).

Dans une étude récente, le profil inflammatoire chez les vaches avec mammites sub-cliniques et cliniques se traduit par des niveaux élevés des protéines de la phase aiguë telles que le sérum amyloïde A, l'haptoglobine, le complément C3, la serpine A3-1, la vitronectine et des niveaux réduits de protéines anti-oxydantes et anti-inflammatoires telles que la paraoxonase-1, l'acétylhydrolase du facteur d'activation des plaquettes, de l'apolipoprotéine A-I, du facteur H du complément, ce qui indique, chez les vaches, une réponse systémique au stress oxydatif et inflammatoire à la fois au cours de la mammite subclinique et clinique (Turk et al., 2012).

L'augmentation des EROS dans le corps jaune semble être impliquée dans la lutéolyse (Kato et al., 1997; Sugino, 2006). Par exemple, une diminution de l'expression de la SOD, ainsi que de la catalase, se produit pendant l'apoptose lors de la régression du corps jaune de l'ovaire bovine (Rueda et al., 1995). Bien les EROS aient été impliqués en tant que régulateurs positifs et négatifs de la stéroïdogénèse cellulaire lutéale (Carlson et al., 1993), il a été proposé que la production incontrôlée de EROS, telle que celles induites par  $PGF_2\alpha$  (Sawada et Carlson, 1991), perturbe l'homéostasie cellulaire conduisant à la lutéolyse fonctionnelle et structurelle.

Les données à l'appui du rôle joué pour les EROs dans la perte de synthèse de la progestérone sont dérivées de nombreuses études *in vitro* sur les effets du stress oxydatif et des facteurs anti-oxydants sur la stéroïdogénèse cellulaire lutéale (Musicki et al., 1994; Vega et al., 1994)

En outre, l'accumulation des EROS induite par PGF2a se produit avant la diminution de la synthèse de la progestérone (Sawada et Carlson, 1991), suggérant une relation directe de cause à effet. Considérant que les EROS sont générés dans le corps jaune et que l'activité de la SOD a été rapporté dans le corps jaune, il est raisonnable de supposer que EROS et SOD sont impliqués dans la régulation de la fonction du corps jaune. Lors du déséquilibre entre les deux, l'activité de corps jaune peut être altérée conduit à la lutéolyse prématurée (Sugino, 2006).

Chez les ovins la mortalité embryonnaire précoce est la principale source de perte en reproduction (Celi et Bush, 2010). Ce taux de mortalité embryonnaire a d'énormes conséquences économiques. Les biomarqueurs du stress oxydatif semblent y être impliqués (Celi et al., 2010), Le taux élevé d'échec de la grossesse est supposée être une conséquence de l'insuffisance la communication entre le produit de conception et l'environnement maternel. Le statut oxydant peut influencer sur le développement précoce de l'embryon en modifiant les facteurs de transcription essentiels et, par conséquent modifier l'expression des gènes (Dennery, 2004). Les concentrations des EROs peuvent également jouer un rôle majeur à la fois dans l'implantation et dans la fécondation des œufs (Sharma et Agarwal, 2004).

Selon la littérature disponible peu d'études ont été menées sur le rôle du stress oxydatif dans les pneumonies bovines. Chez des veaux atteints de bronchopneumonie, il a été trouvé que les granulocytes isolés produisaient dix fois plus de  $O_2^{\cdot-}$  et, que le taux plasmatiques de SOD était plus bas comparativement à ceux des veaux sains (Ledwozyw and Stolarczyk, 1992). dans une autre étude il a été montré que les neutrophiles isolés provenant d'animaux malades produisaient une large quantité de  $NO^{\cdot}$  et de MPO, dont la combinaison pourrait donner lieu à la formation de nitrotyrosine et conduire par voie de conséquences à un dommage protéinique (Wessely-zponder et al., 2004).

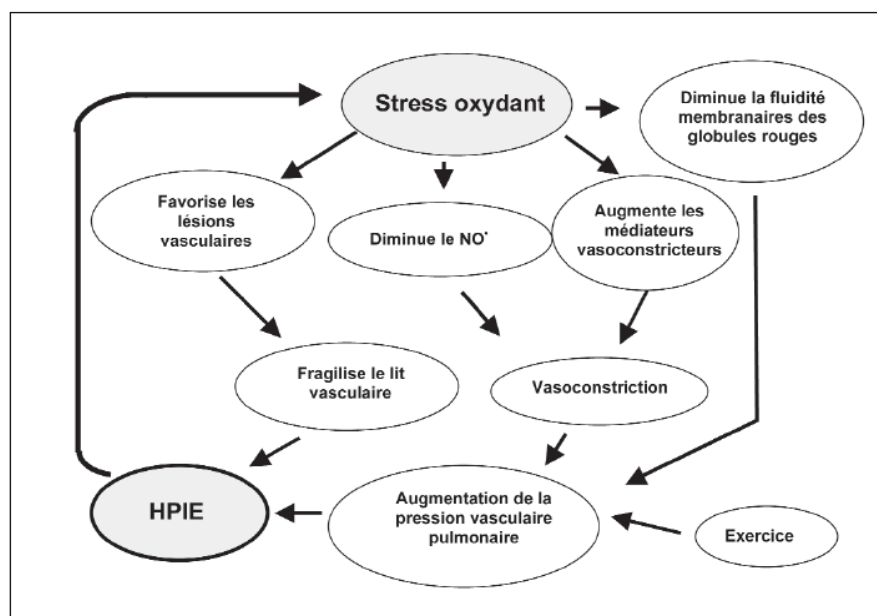
Chez le chien le stress oxydant induit par une réaction inflammatoire pathologique a été très peu étudié. Les rares publications semblent confirmer les observations faites chez l'homme. Elles concernent uniquement l'hépatite chronique et l'arthrose (Spee et al., 2006 ; Goranov , 2007)

Le vieillissement cérébral physiologique associé à la diminution des capacités cognitives porte le nom de sénescence. Lorsque, chez le chien, celle-ci devient pathologique et lorsqu'on est en présence de dysfonctionnements cognitifs (perte d'énergie, détérioration de la qualité des relations avec le propriétaire, comportements compulsifs, etc...), on parle alors de sénilité. Selon Jungbluth (2008), la sénilité s'accompagne de l'accumulation cérébrale d'un peptide amyloïde  $\beta$  possédant la même séquence d'acides aminés que le peptide incriminé dans la maladie d'Alzheimer chez l'Homme. Ce peptide serait neurotoxique et à l'origine de la production de nombreuses EROs. Même si le lien de causalité n'a pas été trouvé, de nombreuses études ont montré que le dysfonctionnement cognitif, la présence anormale de ce peptide et l'augmentation des marqueurs du stress oxydant sont corrélés dans la sénilité canine.

En médecine vétérinaire équine, le stress oxydant semble jouer un rôle au moins favorisant dans certaines entités pathologiques, à savoir : l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (la figure 7 illustre le mécanisme potentiel impliquant le stress oxydant dans cette pathologie), l'inflammation des voies respiratoires profondes, les obstructions récurrentes des voies respiratoires, certains types de myopathies induites ou non par l'exercice, ainsi que dans plusieurs maladies dégénératives atteignant le système nerveux telles que la maladie dégénérative des neurones moteurs, la « maladie de l'herbe » ou encore la myéloencéphalopathie dégénérative équine (De Moffarts et al., 2005). la génération des EROs et le stress oxydant induit par l'exercice ont pu être mis en relation dans différentes espèces animales avec la fatigue musculaire (Sen et al., 1994), les myopathies (Tews et Goebel, 1998) et une diminution de la défense immunitaire (Vider *et al.*, 2001). Dans l'espèce équine, plusieurs études suggèrent que l'exercice peut induire un stress oxydant (De Moffarts *et al.*, 2004). Effectivement, lors de l'exercice, la consommation d'oxygène du cheval peut augmenter jusqu'à 30 fois (Butler *et al.*, 1993). Le flux d'oxygène à travers les cellules musculaires varie de 1 à 100 entre le repos et l'exercice maximal. Deux à 5 % de l'oxygène sont convertis dans

la chaîne de *transfert* des électrons en EROs, capables d'induire des dommages cellulaires par l'oxydation de ses composants (Poole, 2004).

L'exercice est un puissant stimulateur de la production des EROs bon nombre d'évidences suggèrent que les EROs peuvent contribuer aux perturbations induites sur l'homéostasie musculaire par l'exercice (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007). Cependant, dans une étude comparant les marqueurs du statut oxydatif, après l'exercice, dans le sang de chevaux en bonne et de chevaux présentant une obstruction récurrente des voies respiratoires, il a été conclu que le statut oxydant de sang est probablement plus dépendant de la maladie des voies respiratoires que de l'exercice (Kirschvink et al., 2002). Malgré cela, l'exercice physique en soi a été impliquée dans la production de EROs et le stress oxydatif chez les chevaux (White et al., 2001). Chiaradia et al. (1998) ont rapporté une augmentation du Malondialdéhyde (MDA) et du GSH oxydé chez les chevaux après exercice. Le même groupe a constaté que la supplémentation alimentaire en vitamine E et sélénium améliorait ces changements (Avellini et al., 1999). Dans une course d'endurance de 80 km, Williams et al. (2004) ont trouvé une augmentation des hydroperoxydes lipidiques plasmatiques et une diminution de l'activité de la GSH peroxydase leucocytaire, ce qui désigne une composante liée au stress oxydant.



**Figure 7:** Implication du stress oxydant dans l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (HPIE), adapté de Derksen, 1997.

## 9. Stratégies thérapeutiques

Les constituants chimiques présents dans les médicaments à base de plantes ou dans les plantes sont une partie des fonctions physiologiques de la flore vivante, et de par ce fait sont considérés comme ayant une meilleure compatibilité avec le corps humain. L'utilisation de composés bioactifs dérivés des plantes est en nette hausse, car les effets secondaires dus à l'utilisation de drogues de synthèse se sont révélés au fil du temps plus dangereux que les maladies qu'ils sont censés guérir (Sen et al., 2009).

En revanche, les médicaments dérivés de plantes sont basés sur le principe qu'ils contiennent des substances naturelles qui peuvent promouvoir la santé et soulager la maladie, sont mieux tolérés par les patients, relativement moins coûteux et concurrentiels à l'échelle mondiale. Ainsi, dans le respect du pouvoir de guérison, un retour à des remèdes naturels est une exigence absolue de notre temps (Sen et al., 2009).

Les médicaments synthétiques utilisés pour traiter divers troubles peuvent produire des radicaux libres à l'origine de stress oxydatif entraînant des dommages tissulaires. Par exemple les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), sont largement utilisés dans le traitement de la douleur, de la fièvre, l'inflammation, les maladies rhumatismales et cardiovasculaire, mais l'administration chronique de ces médicaments entraîne la génération de radicaux libres qui peut donner lieu à des érosions gastriques, de l'estomac ou des ulcérations duodénales ainsi que des complications graves telles que des hémorragie gastro-intestinale et des perforations (Kamboj, 200).

Pour un grand nombre de praticiens, les connaissances médicales sur les conséquences nocives de l'utilisation chronique d'AINS se limitent aux effets secondaires gastro-intestinaux ainsi qu'à ceux sur la fonction rénale. Or, la littérature médicale récente montre que les effets délétères des AINS s'étendent également au métabolisme et à la croissance des principaux tissus constituant l'appareil musculo-squelettique. En effet, l'inhibition de la réponse inflammatoire précoce par les AINS peut altérer la cicatrisation naturelle d'une lésion et avoir un impact négatif sur le processus de réparation (Gremion et Saugy, 2013). L'utilisation de phytoconstituants comme thérapie médicamenteuse dans les troubles dus au stress oxydatif s'est révélée être cliniquement efficace et relativement moins toxiques que les médicaments existants (Sen et al., 2010).

La présence d'anti-oxydants dans les aliments permet d'éviter le rancissement dû à l'oxydation causée par l'oxygène, la lumière, la chaleur ou le contact de certains métaux. C'est souvent le cas

des aliments riches en lipides comme les huiles. L'oxydation peut également entraîner la formation de composés secondaires potentiellement toxiques (Moure *et al.*, 2001 ; Ivanova *et al.*, 2005). C'est pourquoi les industriels ajoutent des molécules dans les aliments pour augmenter leur durée de vie. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou des plastiques afin d'éviter leur dégradation. Cependant, il a été montré que ces anti-oxydants de synthèse comme le 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), le di-tertbutyl-4-hydroxyméthylphénol (IONOX-100), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG), l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et le 4-hexylresorcinol (4HR), pouvaient être toxiques (Yu *et al.*, 2000 ; Guo *et al.*, 2006). En effet, le BHA par exemple, convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hepatiques (Barlow, 1990). Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (Ito *et al.*, 1985). Le gallate de propyle et le butylhydroxyanisole sont des anti-oxydants phénoliques synthétiques hautement actifs qui agissent en inhibant la chaîne de réactions d'initiation et en réduisant de la peroxydation des acides gras insaturés (Xiang *et al.*, 2007). Malgré la puissance de leur activité anti-oxydante, l'excès de ces anti-oxydants synthétiques peut être toxique, responsable de mutagénéités et peut même présenter un danger sur la santé humaine (Williams, 1993, 1994). Il est bien évident qu'une alimentation saine et équilibrée assure un apport considérable d'anti-oxydants naturels pour le bon fonctionnement de l'organisme humain, surtout lors de la consommation de fruits, de végétaux, de céréales, de la viande et du poisson. Ils existent d'autres sources de composés anti-oxydants bien intéressantes, dont l'application peut s'étendre à des domaines comme la pharmacologie, la microbiologie médicale et clinique, la phytopathologie et la conservation des aliments (Daferera *et al.*, 2000). C'est ce qui a stimulé l'intérêt de bon nombre de chercheurs pour la recherche d'anti-oxydants naturels (Dash *et al.*, 2007).

Les méthodes de recherche scientifique reconnues se basent sur l'isolement d'un principe actif alors qu'en phytothérapie, par exemple, c'est plutôt la synergie<sup>2</sup> (1+1=3) entre les différents principes actifs qui produit l'effet escompté. De plus, lorsqu'on utilise des plantes entières (*totum*) plutôt qu'un élément isolé, on réduit considérablement le risque d'effets secondaires. De nouveaux



protocoles de recherche respectant le principe de synergie sont explorés pour contourner cette difficulté (Réseau Proteus, 2002).

En phytothérapie, en herboristerie et en apithérapie les moyens technologiques actuels, nous permettent de valider scientifiquement le savoir empirique hérité de la tradition. Le nombre et la qualité des études vont en s'accroissant malgré les lacunes de la recherche scientifique en matière d'évaluation des médecines alternatives et complémentaires.

Profitant de l'essor plus en plus important des médecines naturelle, les produits de la ruche s'inscrivent dans cette tendance, le plus souvent en complément des traitements conventionnels. Miel, gelée royale, propolis, pollen ou encore la cire et le venin d'abeilles trouvent ainsi des applications dans des domaines thérapeutiques très variés. De plus en plus pratiquée dans le monde, l'apithérapie ou l'usage médical de ces produits de la ruche fait l'objet de plusieurs études scientifiques mais qui restent toutefois encore trop peu nombreuses ou incomplètes.

Il a été suggéré que la plupart des propriétés médicinales des plantes peuvent être transmises via le miel, de sorte que le miel peut être utilisé comme véhicule pour le transport de ces propriétés (Alvarez-Suarez et al., 2010).

## **10. Le miel**

- Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur elles par des insectes suceurs qu'elles butinent, transforment en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. A l'exception du miel filtré, aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré, sauf si cela est inévitable lors de l'élimination de matières organiques et inorganiques étrangères (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

La principale différence entre le miel de nectar et de miel de miellat est la source de la matière première recueillie par les abeilles pour la production du miel. Pour le miel de nectar, la source principale en est le nectar des fleurs, tandis que le miel de miellat est fait à partir des gouttelettes de

miellat sécrété par des insectes suceurs de sève de l'ordre des Hémiptères. L'ordre *Hemiptera* comprend 4.000 espèces telles que les pucerons et les cigales.

### **10.1. Composition**

C'est un produit qui n'est pas stable et ne peut donner lieu à aucune constante parfaitement précise. Cette composition varie d'une variété à l'autre, et est influencée par de nombreux facteurs). Malgré que les constituants majeurs sont à peu près les mêmes dans tous les miels, la composition chimique précise et les propriétés physiques diffèrent en fonction de La nature du sol et du végétal, des conditions pratiques, du moment et du mode de la récolte, du mode d'extraction et de conservation, la race d'abeille et leur état physiologique (Cantarelli et al., 2008, Omafuvbe et Akanbi, 2009; Ebenezer et Olubenga, 2010).

Les sucres sont les principaux constituant du miel, ils comptent pour 95% de sa matière sèche. Les principaux sucres en sont le glucose et le fructose, qui sont produits par l'hydrolyse du saccharose sous l'action d'une invertase. En outre, environ 25 sucres différents ont été détectés. Les principaux oligosaccharides dans les miels de fleurs sont les disaccharides : saccharose, maltose, turanose, erlose. Le miel de miellat contient en plus les trisaccharides, melezitose et raffinose. Des traces de tétra et de pentasaccharides ont y été également isolés (Bogdanov, 2011).

Quantitativement l'eau est la deuxième composante la plus importante du miel. Son contenu dépend d'un certain nombre de facteurs environnementaux lors de la production tels que les conditions météorologiques et l'humidité à l'intérieur de la ruche, mais aussi sur les conditions et le traitement de miel pendant l'extraction et le stockage. Seuls les miels avec moins de 18% l'eau peuvent être stockés avec peu ou pas de risque de fermentation (Molan, 2002).

Le miel est acide, sa haute teneur en sucres tend à masquer cette acidité. A l'origine on pensait que l'acide formique et l'acide citrique étaient les acides dominants du miel. Cependant, présentement il est bien établi que l'acide gluconique, produit par l'oxydation du glucose sous l'action d'une glucose oxydase provenant de l'abeille est l'acide prédominant et est considéré comme un bon chélateur. D'autres acides ont été également identifiés dans le miel tels que les acides acétique, butyrique, lactique, maléique, oxalique et succinique (Ball, 2007). Le pH du miel de fleurs varie

entre 3,3 et 4,6. Le miel de miellat de par son contenu plus élevé en éléments minéraux a un pH compris 4,5 et 5,5 (Bogdanov, 2011).

Le miel contient en petite quantité, presque tous les acides aminés physiologiquement importants, le principal en est la proline qui est un indice de la maturité du miel (Cotte et al., 2004 ; Perez et al., 2007). Il est généralement admis que la plupart des acides aminés proviennent de l'abeille et non du pollen ou du nectar (White, 1992)

Les protéines du miel sont principalement des enzymes. Les abeilles incorporent différentes enzymes lors du processus de maturation du miel. Les Diastases (amylases) transforment l'amidon en maltose, les invertases (saccharase,  $\alpha$ -glucosidase) catalyse essentiellement la conversion du saccharose en glucose et fructose. La glucose oxydase et la catalase régulent la production de  $H_2O_2$  (Bogdanov, 2011).

Des différences considérables ont été trouvées quant à la teneur en composés phénoliques entre les différents miels (Amiot et al. 1989). La plupart des propriétés biologiques du miel sont dues aux substances phénoliques, Le miel en contient environ 0,1%-0,2%. Jusqu'à présent 25 à 30 composés phénoliques ont été caractérisés dans différents miels, pour la plupart unifloraux (Kolayli et al., 2014). Les acides phénoliques dans le miel se divisent en deux classes : les substitués de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, et les flavonoïdes en trois classes avec des structures similaires flavonols, flavones, et flavanones (Davidson et al. 2005).

Le miel peut avoir une gamme de couleurs en fonction de la saison, la source de nectar, le temps entre la collecte de nectar et la récolte de miel, ...Curieusement, les produits chimiques responsables de la couleur de miel restent largement inconnus. Certains chercheurs suggèrent que la couleur est due à la présence ou l'absence de caroténoïdes; d'autres suggèrent que les polyphénols en sont responsables. Une autre possibilité est un produit de la caramélisation chimique des saccharides du miel, catalysée par les acides présents. D'autres suggèrent une réaction Maillard entre les sucres et les acides aminés ((Ball, 2007).

Le miel n'est pas considéré comme une bonne source de vitamines, car il en contient une minuscule, mais cependant, détectable quantité (Graham, 1992).

La teneur totale en minéraux du miel est d'environ 0,04% -0,2%. De nombreux facteurs affectent la composition minérale de miel, y compris le type de sol, la source florale, les conditions climatiques et la fertilisation, une grande variabilité a été rapporté quant à cette teneur (Anklam 1998). K, Na, Ca, et Mg sont les principaux minéraux contenus dans tous les miels. Fe, Mn, Cu, Zn, Al, B, Sr, Na sont présents à des concentrations plus faibles. Le potassium est présente la plus haute teneur et varie de 500 à 5000 mg kg<sup>-1</sup> en fonction des sources florales . Il a été signalé que les niveaux K étaient 1,290 mg kg<sup>-1</sup> dans le miel de Manuka et 3640 mg kg<sup>-1</sup> dans le miel de miellat dans la région de la Nouvelle-Zélande. Jusqu'à présent, 2 011 éléments minéraux ont été détectés dans les miels (Vanhanen et al. 2011). De nombreuses études ont montré que les miels sombres ont un contenu minéral total plus élevé. Les miels foncés, comme ceux originaire miellat contiennent toujours des niveaux plus élevés en minéraux (Golob et al 2005; Pisani et al 2008)

## **10.2. Quelques propriétés thérapeutiques du miel**

En une époque assez récente, le miel a joué un rôle relativement mineur en médecine conventionnelle, n'étant pas acceptée par les praticiens occidentaux, dans un monde où les antibiotiques et autres produits pharmaceutiques sont considérés comme les remèdes de choix.

Parmi les Chinois, hindous, arabes et races africaines, cependant, le miel est toujours considérée comme un remède interne et externe précieux (Beck and Smedley,1997). Graduellement l'utilisation du miel en médecine occidentale gagne en reconnaissance; d'autant plus que dans des situations où les remèdes les plus usuels sont inefficaces, les preuves scientifiques démontrant son l'efficacité continuent à être produites.

### **10.2.1. Diabète**

Chez les sujets diabétiques, comparativement avec le dextrose, le miel donne lieu une augmentation significativement plus faible des niveaux de glucose plasmatique. entraîne la réduction des lipides sanguins, des niveaux d'homocystéine et de la protéine C-réactive (CRP) chez les sujets normaux et hyperlipidémiques (Al-Waili, 2004 ; Bansal et al., 2005). Il a été également constaté que le miel stimule la sécrétion d'insuline, réduit les niveaux de glucose dans le sang, élève la concentration en hémoglobine et améliore le profil lipidique (Al-Waili et Haq, 2004a).

Les cellules  $\beta$  du pancréas sont très sensibles au stress oxydatif, car elles expriment faiblement les enzymes anti-oxydantes et les activités de ces dernières y sont très réduites (Grankvist et al., 1981). La gluco-toxicité contribue au dysfonctionnement des cellules  $\beta$  du pancréas par le biais du stress oxydatif. Il a été montré que le miel Tualang améliorait le stress oxydatif rénal et induisait un effet hypoglycémiant chez des rats présentant un diabète induit par la streptozotocine (STZ) (Erejuwa et al., 2009). Dans une étude postérieure faite par les mêmes auteurs (Erejuwa et al., 2010), ayant pour but d'évaluer si l'effet hypoglycémiant du miel Tualang pouvait en partie être lié à son action protectrice anti-oxydante sur le pancréas. Un diabète a été induit par une seule dose de STZ. Les rats diabétiques étaient randomisés en deux groupes dont l'un recevait de l'eau distillée et l'autre du miel Tualang. En parallèle, deux groupes de rats non diabétiques recevaient de l'eau distillée ou du miel Tualang. Les animaux étaient traités oralement pendant 28 jours. À la fin de la période de traitement, les rats traités par le miel avaient une glycémie significativement plus basse comparativement aux rats témoins diabétiques. Le pancréas des rats diabétiques témoins contenait des niveaux significativement plus élevés de malondialdéhyde (MDA) ainsi qu'une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx). L'activité Catalase (CAT) était significativement réduite tandis que la glutathion-S-transférase (GST) et la glutathion réductase (GR) étaient inchangées dans le pancréas des rats diabétiques. Le miel Tualang a réduit significativement les niveaux élevés de MDA, avec une restauration de l'activité de la SOD et de la CAT.

### **10.2.2. Maladies cardiovasculaires**

La Maladie cardiaque ischémique (IHD) provoque plus de décès et d'handicaps et, entraîne des coûts économiques plus élevés que toute autre maladie dans le monde développé (Selwyn et Braunwald, 2004). Dans la gestion de ces maladies, la pharmacothérapie (médicaments anti-arythmiques en particulier) peut sauver la vie. D'autre part, les risques de médicaments anti-arythmiques (tels que des arythmies fatales chez certains patients) ont conduit à une limitation de l'administration de médicaments anti-arythmiques (Hume et Grant, 2007)

Par conséquent, il y a une tendance à utiliser des médicaments moins nocifs et plus efficaces. Le miel naturel a été appliquée à des fins médicinales depuis les temps anciens (Ahmed et al., 2003). Toutefois, dans le cas des maladies cardiovasculaires, la plupart des études ont été menées chez les animaux, et sont principalement axée sur les effets du miel contre les facteurs de risque cardiovasculaires telles que l'hyperlipidémie et la production de radicaux libres (Schramm et al., 2003; Chepulis, 2007; Bahrami et al., 2008; Yaghoobi et al., 2009)

L'effet de miel naturel sur le cholestérol total, le LDL-cholestérol (LDL-C), le HDL-cholestérol (HDL-C), les triglycérides, la protéine C-réactive (CRP), la glycémie à jeun et le poids corporel a été étudiés chez 38 personnes en surpoids. Les résultats ont montré que la consommation de 70 g de miel naturel pendant 30 jours provoque la réduction du taux de cholestérol total, de LDL-C, triglycérides et de la CRP ( $P < 0,05$ ). Les auteurs ont conclu que le miel naturel réduit les facteurs de risque cardio-vasculaires, en particulier chez les sujets présentant des facteurs de risque élevé, et qu'il n'augmente pas le poids corporel chez les sujets en surpoids ou obèses (Yaghoobi et al., 2009).

Le miel peut contenir des métabolites de l'oxyde nitrique (NO) et des niveaux accrus de NO dans le miel pourraient jouer une fonction de protection dans les maladies cardio-vasculaires (Bogdanov et al., 2008). Le miel diminue également la pression sanguine veineuse, ce qui peut réduire la précharge du cœur et par conséquent peut diminuer la congestion dans le système veineux (Rakha et al., 2008).

Najafi et al (2008) ont démontré des effets prophylactiques du miel naturel associé à la Solution de Krebs comme agent de préconditionnement pharmacologique sur les lésions induites par l'ischémie / reperfusion. Une étude menée sur des rat montre que l'administration oral du miel pendant 45 jours montre des effets anti arythmiques et anti infarctus puissants (Najafi et al., 2011).

le miel naturel pourrait causer ses effets cardio-protecteurs et thérapeutiques contre les dysfonction cardiaque et vasomoteurs induits par l'adrénaline, directement (via sa haute capacité anti-oxydante totale ainsi que ses anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques, en plus de sa teneur minéraux

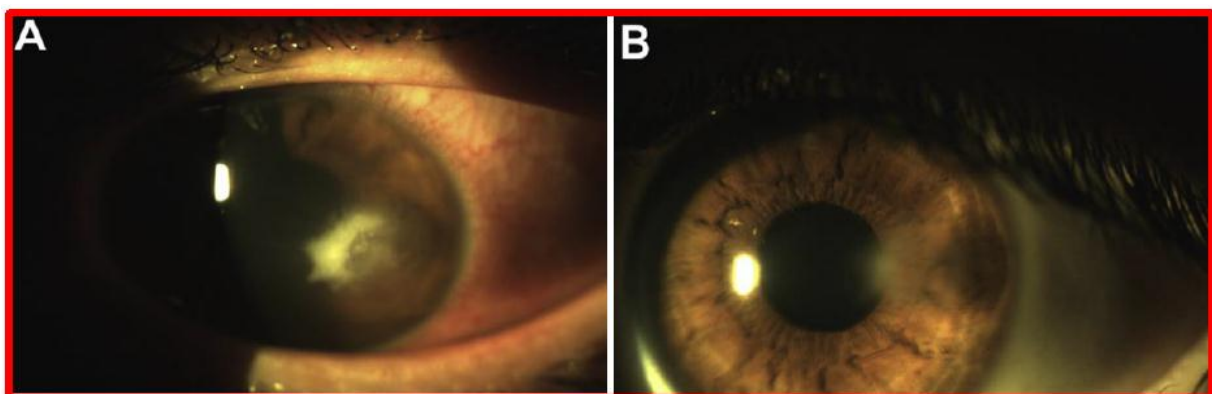
tels que le magnésium, le sodium, et le chlore) et / ou indirectement en stimulant la libération d'oxyde nitrique à partir de l'endothélium sous l'influence de la vitamine C (Rakha et al., 2008).

Dans l'athérosclérose la perturbation de l'agrégation plaquettaire et la coagulation du sang complique la lésion athérosclérotique, par la formation de thrombus superposés (Sobel, 2002). Cette formation de thrombus conduit à une variété d'événements cliniques aigus telles que l'angine instable, l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (Levi et al., 2004). Une étude sur du sang humain a montré que le miel avait un effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire et la coagulation du sang (Ahmed et al., 2015)

### 10.2.3. Affections oculaires

Le miel est utilisé dans le monde entier pour le traitement de diverses affections ophtalmologiques telles que blépharite, kératite, conjonctivite, blessures de la cornée, et brûlures thermiques et chimiques des yeux (Meda et al., 2004 ; Shenoy et al., 2009). L'application topique du miel comme pommade, chez 102 patients atteints de troubles de la vue rebelle au traitement, une amélioration a été observée chez 85% des patients, pour les 15% restants il y'a eu arrêt de progression de la maladie. L'application du miel dans la conjonctivite infectieuse réduit la rougeur, la tuméfaction, l'écoulement de pus et le temps pour l'éradication bactérienne (Al-Waili, 2004b).

Le Traitement d'un ulcère de la cornée chez une jeune femme de 23 ans en utilisant une combinaison de levo-Floxacin et de miel de miellat en instillations oculaire a entraîné une décontamination oculaire et une amélioration significative de l'acuité visuelle (Majtanova et al., 2015).



**Photo1:** Ulcère de la cornée ,avant (A) et après l'utilisation du miel de miellat à 25% en association avec la levo-Floxacin

#### **10.2.4. Effets neurologiques**

La recherche sur les effets nootropes et neuropharmacologiques de miel sont rares. Néanmoins, la conviction que le miel est un complément alimentaire stimulant la mémoire est un fait en ethnomédecine. Le miel est une composante importante du Brahma rasayan, une formule ayurvédique qui est prescrit pour prolonger la durée de vie et améliorer la mémoire, l'intelligence, la concentration et la force physique (Mishra, 2011). Des rats nourris au miel ont montré significativement moins d'anxiété et une meilleure mémoire spatiale à tous les stades par rapport au groupe témoin. Plus important encore, la mémoire spatiale des rats nourris au miel, telle qu'évaluée par les tests de reconnaissance d'objet, est restée significativement plus élevée pendant les mois (Chepulis et al., 2009). En accord ce qui précède, la supplémentation à court et à long terme avec du miel chez des rats, a diminué de manière significative la peroxydation des lipides dans le tissu cérébral avec une augmentation concomitante de la SOD et de l'activité de la glutathion réductase (Oyefuga et al., 2012). En outre, le miel a diminué chez des gerbilles le nombre de cellules neuronales dégénérées dans la région CA1 de l'hippocampe, une région connue pour être très sensible à l'oxydation (Cai et al., 2011)

En plus de ses effets les neurones, les cellules gliales peuvent également répondre à la thérapie au miel car il a montré un effet neuro-protecteur dans un modèle d'ischémie cérébrale focale induite chez le rat (Zàrraga-Galindo et al., 2011).

En outre, le miel atténue la neuro-inflammation induite par l'ischémie en activant la microglie. les processus neuro-inflammatoires dans le cerveau sont soupçonnés de jouer un rôle crucial dans le développement des maladies neuro-dégénératives ainsi que dans les lésions neuronales associées à un AVC (Frank-Cannon et al., 2009). Fait intéressant, les déficiences cognitifs induites par l'ischémie et résultants de la neuro-inflammation de la microglie et/ou des astrocytes ont été significativement atténuée par la thérapie au miel (Akanmu et al., 2011).

Candiracci et al. [2012] ont montré que les effets des extraits flavonoïdiques du miel sur les cellules microgliales N13 activées par les LPS inhibent significativement la libération des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, et inhibent l'expression de la nitrique oxyde synthase



inductible (iNOS), ainsi que la production des ERO. Faisant du miel un agent thérapeutique potentiel des maladies neurodégénératives impliquant la neuroinflammation.

#### **10.2.5. Effets anti-tumoral et anti-mutagénique**

Selon Hamzaoglu et al. (2000), l'implantation de tumeur chez des rats a été nettement réduite par l'application de miel en pré- et post-opératoire, ce qui suggère que son action physico-chimique (diminution de la disponibilité de l'oxygène dans l'environnement de la tumeur, à savoir, l'effet anti-angiogénique) et son potentiel anti-oxydant peuvent prévenir la propagation métastatique (Mobarok et, Al-Swayeh, 1997).

Les mutagènes sont omniprésents dans notre environnement (Venitt et Phillips, 1995). Certains constituants de l'alimentation humaine ordinaires ont été démontrées comme mutagène (Reutersward, 1887 ; Brands et al., 2000). L'exposition à des amines hétérocycliques dans les aliments est inévitable (Wakabayashi et al., 1992). L' hétérocyclique non polaire amine trp-P-1 (3-amino-1,4-diméthyl-5H-pyrido [4,3-b] indole) a été détectée dans la gamme de 0,5 à 7,4 ng / g dans la plupart des aliments frits à 225 ° C , et également dans des sauces à base de viande préparés à des températures de 175 à 200 ° C (Skog et al., 1997) ), et les sardines grillés (Yamaizumi et al., 1980)). Le Trp-P-1 a été montré comme mutagène chez les bactéries (Sugimura et Sato, 1983) et cancérigène chez les animaux de laboratoire (Sugimura, 1985)). L'activité antimutagène de miels de sept sources florales différentes a été testée contre Trp-P-1. Tous les miels ont montré une inhibition significative du mutagène Trp-P-1 (Wang et al., 2002).

L'effet anti-métastatique du miel et son mode d'action anti-tumoral possible a été étudiée par son application dans le carcinome mammaire spontané dans le fibrosarcome induit par le méthylcholanthrène, chez la souris ,et dans l'adénocarcinome anaplasique du côlon de rats (Orsolich et, Basic, 2004). Dans une autre étude, l'effet anti-tumoral du miel contre le cancer de la vessie a été examiné in vitro et in vivo chez la souris (Swellam et al., 2003).

L'effet anti-tumoral, du miel semble être un processus multifactoriel à savoir: la libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et/ou <sup>•</sup>OH suite à la réaction de fenton (Lopez-Lazaro, 2006), une direct inhibition de la COX-2 par certain constituant spécifiques (chryisine ,acide caféique et ester du penyl d'éthyle, CAPE) (Wang et

al., 2002) et le piégeage des ERO responsables de l'induction de l'explosion exsudative, et s'ils ne sont pas proprement désactivés ou contenues peuvent entraîner la malignité (Greten et al., 2004)

### **10.3. Le miel en usage vétérinaire**

Chez les animaux de rente, comme chez l'Homme, le stress oxydant est généré par des situations de stress d'origine physiologique, environnementale ou nutritionnelle. De nombreuses molécules biologiques (lipides, protéines, glucides, acides nucléiques) peuvent être oxydées par les espèces radicalaires générées lors d'un stress oxydant. L'organisme possède tout un arsenal de molécules anti-oxydantes d'origine endogène ou alimentaire. Il est possible d'évaluer la capacité anti-oxydante globale au niveau de l'animal lui-même ou de ses produits par l'emploi simultané de plusieurs méthodes complémentaires. Le stress oxydant peut avoir des conséquences sur la qualité des produits mais aussi sur la santé des animaux. Ainsi, il a été montré que de mauvaises conditions d'élevage comme la diminution des surfaces au sol ou la conduite sur caillebotis diminuaient la résistance des animaux au stress oxydant. De même, il existe de fortes corrélations entre différentes maladies métaboliques ou différentes pathologies de type infectieux ou inflammatoire et un déficit en anti-oxydants (Durand et al., 2013).

Le miel étant acide, il facilite la digestion des protéines et des graisses et la précipitation des caséines en flocons fins. Certains éleveurs supplémentent le lait destiné aux veaux avec du miel (4 cuillères à soupe + 150 mL de chlore de magnésium dans 1L de lait), notamment dans les élevages biologiques. Les veaux reçoivent ce breuvage avant la tétée, qui joue un rôle de stimulant et de tonique réel chez des animaux affaiblis. Certaines vaches adultes en bénéficient également en cas de besoin (Gilard 2011).

L'inflammation des mamelles des vaches laitières est une pathologie courante. Classiquement, une antibiothérapie est instaurée. Mais, ce traitement présente des inconvénients: d'une part son coût élevé, et d'autre part, le lait ne peut être commercialisé avant la disparition de toute trace d'antibiotique. Une étude néozélandaise (Allen et al., 1997) a montré que le miel inhibe la croissance des bactéries les plus fréquemment impliquées dans les mammites comme *Actinomyces pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae*,

*Streptococcus uberis* ... L'utilisation du miel présente un double avantage: le coût du traitement est relativement faible et le lait n'est pas "pollué" comme avec les antibiotiques. Le miel apparaît donc comme une alternative intéressante à l'antibiothérapie pour traiter les mammites.

Du fait de ses qualités cicatrisantes, le miel intéresse aussi les vétérinaires. Simon *et al.* (1997) rapporte le cas d'une génisse Prim'Holstein âgée d'un an soignée par du miel. L'animal présentait trois plaies profondes suite à un chevauchement de barrière. Au bout de deux mois de traitement, les vétérinaires ont obtenu une cicatrisation totale des lésions.

Au niveau de l'institut des sciences vétérinaire de Tiaret, Algérie, une jument arabe âgée d'un an et demi présentant une plaie profonde infectée suintante et malodorante a été traitée au miel d'euphorbe. Au bout d'une semaine, la mauvaise odeur et les suppurations ont disparu. En un mois, le bourgeonnement conjonctif comblait complètement la plaie. Au bout de un mois et demi, la cicatrisation était totale (Photos 1 et 2) (Khiati *et al.*, 2014).



**Photo 2:** 21/04/13. Avant l'utilisation du miel d'euphorbe.



**Photo 3:** 09/06/13. Après utilisation du miel d'euphorbe.

De même, au niveau de l'institut de Tiaret, le miel a été utilisé, en soins post-opératoires chez une vache ayant subi une énucléation de l'œil gauche (Photos 3, 4, 5 et 6) (Khiati et al., 2013).



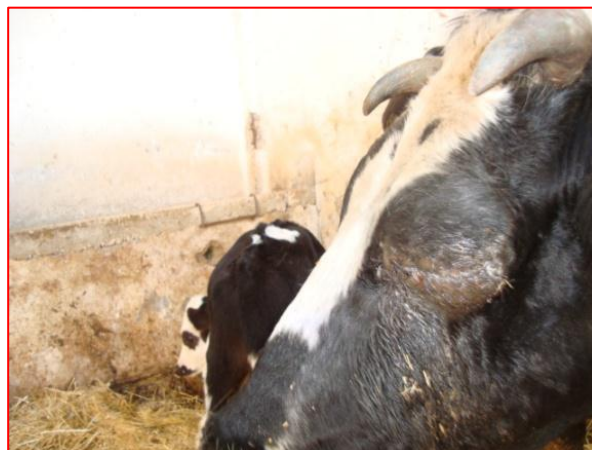
**Photo 4:** 19 Mai, 2013, avant l'opération



**Photo 5:** 22 Mai, 2013, 4 jours après opération



**Photo 6:** 28 Mai, 2013, 10 jours après.



**Photo 7 :** 30 Mai, 2013, 12 jours après.

Chez la vache et la jument, l'endométrite représente une cause importante d'infertilité et le traitement aux antibiotiques donne des résultats variables (Blanchard *et al.* 2003). Le traitement idéal de l'endométrite devrait conduire à l'élimination de la contamination bactérienne et favoriser le drainage des glandes endométriales et la résorption rapide de l'inflammation de la muqueuse ; ce qui n'est pas possible avec l'antibiothérapie locale. Dans les années 1970, le traitement de la métrite chez la vache à l'aide d'infusion de dextrose à 50% a été utilisé mais a été abandonné par manque de bases scientifiques. Une étude a montré que l'infusion intra-utérine de miel pur aurait permis de traiter des cas d'infertilité due à des endométrites chez la vache (El- Hafeez *et al.*, 2001). King *et al.* (2000) ont montré *in vitro* que certains sucres et en particulier le mannose inhibaient l'adhésion aux cellules épithéliales de bactéries pathogènes telles que *Streptococcus zooepidermicus*, *Pseudomonasaeruginosa* et *Escherichia coli* et pourraient ainsi être une alternative à l'usage des antibiotiques. Une étude a exploré *in vivo* les effets d'une infusion intra-utérine de miel chez la jument (Allano *et al.*, 2009). Une solution de miel non pasteurisé de trèfle à 70% est administrée dans le corps utérin de juments en dioestrus à raison de 50 ml par jument. Des examens complets de l'appareil génital sont effectués régulièrement. Les résultats montrent que 6h après l'infusion, le liquide *in utero* des juments traitées était nettement plus important que chez les témoins ( $p < 0,01$ ). Cette quantité de liquide a persisté durant les premières 24 heures. L'absence d'infiltration significative de cellules inflammatoires dans la muqueuse utérine à J4 confirme que cette sécrétion n'est pas provoquée par une réaction inflammatoire mais par la présence de soluté hypertonique. De plus, les biopsies utérines ont montré que l'infusion de miel n'occasionnait pas d'altération histologique significative à l'endomètre de jument. La cytologie endométriale est demeurée négative chez les juments traitées malgré l'accumulation importante de sécrétions durant la première semaine. Au contraire, chez deux juments porteuses de germes pathogènes à J0, la cytologie s'est révélée négative à J14. La solution de miel n'a de plus pas occasionné d'irritation sévère ou prolongée comme l'indiquent les résultats à J14. Malgré la dilution de l'infusion par les sécrétions utérines, le miel s'est révélé suffisamment concentré pour inhiber la croissance de germes.

Cette étude démontre l'innocuité d'une infusion intra-utérine de solution de miel à 70% et son efficacité à induire un appel d'eau, ce qui favoriserait la vidange des glandes endométriales.

## **11. Mécanismes d'action et composés actifs**

### **11.1. Activité antibactérienne**

Le miel est bien connu pour son activité antibactérienne, fait signalé pour la première en 1892 (tel que cité par Dustmann en 1919). Depuis l'Antiquité, le miel a été utilisé pour le traitement des plaies infectées et leur prévention. Avec l'avènement des antibiotiques, l'application clinique du miel a été abandonnée en médecine moderne occidentale, bien que dans de nombreuses cultures, il soit encore utilisé (Kwakman et Zaat, 2012).

Dans le monde entier, l'antibio-résistance envers toutes les principales classes d'antibiotiques, y compris ceux de dernier recours, est en nette augmentation (Walsh, 2003 ; Levy et Marshall, 2004), et fait encore plus alarmant, très peu de nouveaux antibiotiques sont en cours d'élaboration (Kwakman et Zaat, 2012). La puissante activité du miel contre les bactéries antibiorésistantes (Cooper et al., 2002a ; Cooper et al., 2002b ; Efem, 1998) a donné lieu à un regain d'intérêt pour son application. Plusieurs miels ont été approuvés pour une application clinique (Aissat et al., 2014). Fait remarquable, des recherches *in vitro* ont montré que le miel peut réellement inverser la résistance aux antibiotiques, ce qui suggère que le miel utilisé en combinaison avec des antibiotiques peut avoir des effets thérapeutiques supplémentaires (Jenkins et Cooper, 2012). Il a été proposé que le miel induit une régulation à la baisse des produits du gène *mecR1*, un transducteur associé à la résistance des SARM (*S. aureus* résistant à la méthicilline) aux antibiotiques. En effet, Muller et al (2013) ont rapporté que le miel de Manuka agit en synergie avec la rifampicine pour inhiber la croissance du SARM et des isolats cliniques de *S. aureus*. La connaissance incomplète des composés antibactériens impliqués et de la variabilité de l'activité antibactérienne représentent des obstacles majeurs à l'applicabilité de miel en médecine.

L'enzyme glucose oxydase ajoutée par l'abeille est activée lors de la dilution du miel et convertit le glucose en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et acide gluconique. L'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est maximale dans la gamme de dilution comprise entre 30-50% et décline rapidement en dessous de 30% (Bang et al., 2003). La

neutralisation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réduit l'activité antibactérienne de la majorité des miels. Cependant, un nombre substantiel de miels retiennent l'activité antibactérienne après la neutralisation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Allen et al., 1991 ; Mundo et al., 2004). Il a été suggéré que la catalase originaire du pollen, du nectar ou de micro-organismes responsable de la neutralisation enzymatique du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schepartz, 1996 ; Huidobro et al., 2005). Cependant, dans la mesure de notre connaissance, la catalase n'a jamais été identifiée dans le miel (Kwakman et Zaat, 2012).

Comme dans le miel, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est également un système de défense antimicrobien majeur dans le nectar des plantes (Carter et Thornburg, 2004 ;) et une variation importante dans l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> existe aussi parmi les échantillons de nectar (Hillwig et al., 2010, 2011). Fait intéressant, les peroxydases sont parmi les protéines les plus abondantes dans le nectar de pétunia et le niveau d'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tabac et dans le nectar de pétunia est inversement proportionnelle au niveau de l'activité des peroxydases dans ces nectars (Gonzalez-Teuber et al., 2009 ; Hillwig et al., 2011). Les Peroxydases dérivées du nectar plutôt que la catalase pourraient être éventuellement une cause de la variation de la variation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans différents miels (Kwakman et Zaat, 2012). Cependant, dans bon nombre de miels, l'activité antibactérienne est due à des composés non peroxydes (Allen et al., 1991 ; Molan, 1992).

Un niveau exceptionnellement élevé de l'antimicrobien le methylglyoxal (MGO) a été trouvé dans le miel de Manuka (Adams et al., 2008 ; Mavric et al., 2008). En se basant sur la forte corrélation entre les niveaux de MGO et le potentiel du miel à inhiber la croissance de *S. aureus*, il a été suggéré que le MGO est entièrement responsable de l'activité antibactérienne non peroxyde du miel de manuka (Adams et al., 2008). La neutralisation du MGO a aboli l'activité du miel de manuka contre *S. aureus* et sensiblement réduit l'activité contre *B. subtilis*, mais n'a pas affecté l'activité contre *E. coli* et *P. aeruginosa* (Kwakman et al., 2011). Ainsi, le MGO n'est pas entièrement responsable de l'activité antimicrobienne non peroxyde du miel de manuka.

Récemment, il a été identifié dans le miel un peptide antimicrobien provenant de l'hémolymphe de l'abeille, la royalsine ou bee defensine-1 (Kwakman et al., 2010 ; Casteels-Jossonet al., 1994). La bee défensine-1 a une puissante activité, mais seulement contre les bactéries Gram-positives,

notamment *B. subtilis*, *S. aureus*, et *Paenibacillus larvae* (Kwakman et al., 2010, Bachanova et al., 2002), cette dernière espèce est l'agent causal de la dévastatrice maladie des larves d'abeille : la loque américaine.

Dans le cadre de leur système immunitaire inné, les invertébrés sont fortement tributaires des peptides antimicrobiens pour leur défense contre les micro-organismes. Chez les abeilles, après une infection expérimentale par *E. coli*, quatre types de AMPs ont été produites dans l'hémolymphe : l'héménoptecin, la bee défensine -1, l'apidaecin et le groupe de peptides abaecin. Chacun de ces AMPs a un spectre d'activité antimicrobienne distincte, mais collectivement ces peptides couvrent toutes les principales catégories de micro-organismes (Casteels-Jossonet al., 1994).

Ces composés antibactériens protéiques ont été précédemment signalés pour six miels sur 26, mais l'identification de ces protéines n'a pas été poursuivie (Mundo et al., 2004 ; Gallardo-Chacon et al., 2008).

Mundo et al. (2004) ont rapporté qu'après la neutralisation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la dégradation des composés protéiques, plusieurs miels conservent une activité contre *Bacillus stearothermophilus*, mais pas contre plusieurs autres micro-organismes, y compris *S. aureus* très sensibles au MGO. Cela donne à penser que l'activité supplémentaire de ces miels est exercée par des composants autres que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la bee défensine-1, ou le MGO.

Les composés phénoliques provenant du nectar des plantes ont été proposés comme d'importants facteurs dans l'activité antibactérienne non peroxyde du miel. Plusieurs composés phénoliques antibactériens ont été identifiés dans les miels (Molan, 1992 ; Weston et al., 2000 ; Isla et al., 2011), mais leur contribution à l'activité globale de miel reste incertaine. L'activité individuelle des composés phénoliques isolés à partir du miel est trop faible pour contribuer de manière substantielle (Molan, 1992, Weston et al., 2000). Des complexes d'extraits phénoliques de plusieurs miels malaisiens exercent une activité antibactérienne, mais l'identité du composé (s) responsable de cette activité est (sont) inconnue(s). Il se pourrait que la combinaison de différents composés phénoliques au lieu de composés individuels pourrait contribuer sensiblement à l'activité antibactérienne du miel (Aljadi et Yusoff., 2003)



Les micro-organismes présents dans le miel ont été proposés comme une source potentielle de composés antimicrobiens. Les bactéries isolées à partir de miel peuvent en effet produire des composés antimicrobiens lorsque sont cultivées *in vitro*, mais il reste difficile de savoir si ces composés sont en fait présents dans le miel (Lee et al., 2008).

De récentes recherches ont montré que les propriétés antimicrobiennes *in vitro* du miel sont plus que bactéricide. Il a été montré que le miel réduisait également la pathogénicité bactérienne. La capacité des micro-organismes pathogènes à causer la maladie est en partie due à la production de facteurs de pathogénicité. *S. aureus*, par exemple, produit une gamme de protéines, incluant : catalase, hémolysine ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), toxines et les entérotoxines épidermolytiques. Dans les plaies infectées l'Alphatoxine ( $\alpha$ -hémolysine) provoque des lésions tissulaires par la création de pores dans les membranes de la cellule hôte; permettant de décharger des composés de faible poids moléculaire et en induisant la production de cytokines et l'apoptose (Mc Loone et al., 2015).

Selon Jenkins et al (2014), le miel de Manuka réduit l'expression de l'  $\alpha$ -toxine des SARM le miel à une concentration aussi basse que 0,5% inhibe significativement la formation de biofilm par *E. coli* O157:HA et réduit l'expression des gènes (csgBAC) du quorum sensing et les gènes de virulence (LEE genes) (Lee et al., 2011)

Des concentrations sub-létales du miel de Manuka réduisent la production de sidérophores - facteurs de virulence qui piègent le fer nécessaire pour la croissance bactérienne- dans des souches cliniques et non cliniques de *P. aeruginosa* (Kronka et al., 2013).

L'activité antibactérienne du miel pourrait être également due en fonction de sa dilution à ses effets « pro-oxydants » ou « pro-inflammatoires » (Cf la suite).

### **11.2. Le miel et les cytokines**

Les cytokines pro-inflammatoires sont produites normalement suite à l'activation des cellules immunitaires et sont impliquées dans l'amplification des réactions inflammatoires. Ces cytokines jouent un rôle important dans la cicatrisation des plaies (Hubner et al., 1996). Les macrophages qui se différencient à partir des monocytes, migrent dans les divers tissus durant le processus inflammatoire et possèdent trois fonctions majeures, la phagocytose, la présentation de l'antigène et

l'immuno-modulation par le biais de la production de facteurs de croissance et de cytokines. Les macrophages suppriment les corps étrangers, et en fonction de l'étendue de la lésion, ils persistent dans la plaie pendant des mois, nettoyant les corps étrangers et nécrotiques (Anderson, 2001). Les macrophages jouent un rôle critique dans l'initiation, la maintenance et la résolution de l'infection et, sont activés ou désactivés durant le processus inflammatoire (fujiwara et Kobayashi, 2005). La capacité des macrophages dans la production des cytokines inflammatoires et des facteurs de croissance est considérée comme jouant un rôle majeur dans la cicatrisation des plaies (Gillitzer et al., 2001). Après la lésion les macrophages induisent immédiatement les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Stroncek et Reichert, 2008). Le TNF- $\alpha$  est une cytokines pro-inflammatoire régulatrice qui joue un rôle important dans la défense contre les micro-organismes intracellulaires (Ciacci-Woolwine et al., 1999) et induit la synthèse du collagène par les fibroblastes en initiant la cicatrisation (Van Den Berg et al., 2008). Le TNF- $\alpha$  possède une large gamme de fonctions et partage de nombreux effets physiologiques et pathologiques de l'IL-1 (Beutler et Cerami, 1998). De concert avec l'IL-1, le TNF- $\alpha$  est la première cytokine pro-inflammatoire qui régule positivement la phase inflammatoire de la cicatrisation et contribue au stress oxydatif au sein de la plaie en générant les EROs et les protéines intracellulaires qui sont libérées par les cellules nécrotiques, ce qui est crucial pour la cicatrisation.

Les cadhérines sont une classe de glycoprotéines qui s'expriment à la surface cellulaire. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire, ce qui fait qu'elles assurent la liaison intercellulaire au sein des tissus. La E-cadhérine (épithéliale) est probablement la cadhérine la mieux connue, elle est liée à la  $\beta$ -caténine par un domaine intracellulaire. L'expression et la distribution la E-cadhérine/  $\beta$ -caténine pour restaurer l'adhésion cellule-cellule et le re-épithelialisation. Chaudhary et al. (2015), ont testé l'effet du miel à des dilutions variées sur la cicatrisation et ont constaté que la dilution optimale était de 1%, ils ont également montré que cette dilution permettait la modulation positive des gènes de la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine

Au cours des dernières années, plusieurs groupes se sont penchés le miel et / ou ses composants individuels afin d'élucider ses propriétés de cicatrisation. Les macrophages / monocytes sont un

modèle approprié pour l'étude de l'activité immuno-modulatrice de nouveaux immuno-modulateurs potentiels. Tonks et ses collègues ont suggéré que l'effet cicatrisant de miel guérison peut être en partie liée à la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules environnantes, principalement les monocytes et les macrophages (Tonks et al., 2001 ; Tonks et al., 2003). Un effet immuno-modulateur a été montré par la libération de cytokines à partir de la lignée cellulaire monocyttaire Mono Mac 6 (MM6) ainsi que par les monocytes périphériques humains après incubation avec 1% (p / v) de miel. Plusieurs miels naturels ont été utilisés dans cette étude, et tous ont induit ou stimulé la libération de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 des cellules MM6 et des monocytes du sang périphérique humain. Ces résultats semblent être largement acceptés comme indiquant la présence dans les miels naturels d'une substance immuno-modulatrice non identifiée, qui améliore la cicatrisation des plaies en induisant activement la libération de cytokines par les macrophages (Timm et al., 2008).

La signification médicale de miel contient une contradiction, d'un côté il contient des micro-organismes, et de l'autre, il est actif contre la plupart des micro-organismes (Iurlina et Fritz, 2005; Olaitan et al., 2007; Sereia et al., 2011). Les micro-organismes dans le miel vont influencer sa qualité et son innocuité (Snowdon et Cliver, 1996). Cependant, même les miels récoltés proprement, sont des produits naturels contenant un niveau minimal de micro-organismes due à ses propriétés antimicrobiennes naturelles innées (Olaitan et al., 2007).

Les macrophages stimulés par les lipopolysaccharides sont capables de synthétiser et de sécréter des médiateurs inflammatoires, y compris le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

l'oxyde nitrique (NO), et l'IL-6 (Mantovani et al., 2002). Les auteurs de l'étude ont soutenu que la concentration d'endotoxines dans tous les miels naturels (56-690 pg / ml) est négligeable, et que la stimulation des cellules MM6 est indépendant des endotoxines. Cependant, il est important de noter que les cellules MM6 sont très sensibles aux endotoxines (Timm et al., 2008), et il est très probable que la teneur en endotoxines du miel pourrait être à l'origine de cet effet. Les endotoxines possèdent des caractéristiques spéciales. Elles sont, dans une large mesure, stables à la chaleur, et leur activité peut être inhibée par la polymyxine B (Tsuzuki et al., 2001). Il a été montré que les

cellules MM6 répondent aux endotoxines avec une limite de détection aussi basse que 3,1 pg / mL, et qu'une forte libération d'IL-6 a lieu quand elles sont stimulées avec 100 pg / ml d'endotoxine (Moesby et al., 1999). Timm et al. (2008) ont étudié l'effet de quatre miels différents sur la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6) par les cellules MM6. D'une façon similaire aux études effectuées par Tonks et al. (2001, 2003), les miels (0.1% p/v) ont induit une libération maximale d'IL-6 après 18 heures de traitement. Il a été rapporté que les substances du miel responsables de son activité immuno-modulatrice sont (1) stable à la chaleur; (2) retenu dans la fraction de haut poids moléculaire (> 20 kDa); et que (3) leur activité a été inhibée lorsque le miel a été incubé avec de la polymyxine B, un inhibiteur de l'activité de l'endotoxine. Toutes ces caractéristiques concordent avec les propriétés des endotoxines (Majtan, 2014). Contrairement à ces résultats, Tonks et al. (2007) ont montré que le traitement thermique provoque une réduction significative de la capacité du miel à stimuler la production de cytokines par les cellules MM6. Par ailleurs, l'effet simulateur du miel (0.5% p/v) sur la libération de cytokines a été évalué. De même, la capacité des miels de Nouvelle-Zélande en présence de polymyxine B à libérer le TNF- $\alpha$  à partir de la lignée cellulaire monocyttaire THP-1 et U937 a été récemment caractérisée. L'activité immuno-modulatrice de tous les miels a été associée à un composant à poids moléculaire élevé (> 30 kDa), partiellement thermolabile et inhibée par la polymyxine B (Gannabathula et al., 2011).

Un certain nombre de peptides et de protéines provenant de sources naturelles sont connus pour leurs actions immunostimulantes non spécifiques (Dutta, 2002). Peptides et protéines immuno-modulateurs, en général, génèrent une réponse physiologique dans les cellules cibles via leurs récepteurs spécifiques. Les protéines glycosylées sont connues pour induire la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les macrophages, lesquels sont connus pour induire des mécanismes de réparation des plaies (Majtan, 2014).

Il a été montré par Majtan et al. (2006) que le miel naturel d'acacia (1% p/v) est capable de stimuler la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les macrophages murins, tandis que le miel déprotéiné n'a aucun effet. Ces auteurs suggèrent que la glycoprotéine (MRJP1), protéine majeure de la gelée royale, dominante dans la gelée royale (Schmitzova et al., 1998) ainsi que dans le miel (Simuth et al., 2004)

pourrait être responsable de l'effet immuno-modulateur du miel. Il est très probable que les échantillon purifiés de MRJP1 contiennent des endotoxines à un niveau suffisant pour stimuler la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages murins (Majtan, 2014). D'autre part, il a été rapporté que MRJP1, à une concentration de 25 pg / ml, a doublé l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  dans des cultures de kératinocytes épidermiques primaires. De même, une tendance à la hausse dans l'expression d' l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  et du facteur de croissance transformant beta (TGF- $\beta$ ) a été observée suite au traitement des kératinocytes humains avec MRJP1 (Majtan et al., 2010).

En revanche, il a été rapporté par Gannabathula et al. (2012) et Raynaud et al. (2013) que les traces de lipopolysaccharide (LPS) dans le miel ne pouvaient pas, par eux-mêmes, compter dans la stimulation de la production de cytokines . Il a été rapporté que les protéines arabinogalactan type II (AGPs) issues de plantes et présentes dans le miel de Kanuka de Nouvelle-Zélande Kanuka stimulent la libération du TNF- $\alpha$  par les monocytes (Gannabathula et al., 2012), les AGPs sont sensibles à l'inhibition par la polymyxine B, et semblent imiter certaines propriétés des LPS.

L'apimisin est un peptide riche en valine et serine, sécrété par les glandes hypopharyngées et mandibulaires de l'abeille (Bíliková et al., 2002) . Ce peptide présent dans le miel forme un complexe avec la protéine Apa1 de la gelée royale et est capable de stimuler la prolifération des lymphocytes (Tamura et al., 2009). Ce qui semble confirmer l'étude faite par Abuharfeil et al. (1999) que le miel non traité au LPS stimule la prolifération des lymphocytes B et T. L'apimisin agit en synergie avec AGPs pour renforcer la libération du TNF- $\alpha$  par un mécanisme n'incluant pas leur complexation. L'apimisin et les AGPs sont présents dans différentes sortes de miels (Gannabathula et al., 2015).

Le traitement des cellules de l'hépatocarcinome humain avec du miel aux concentrations de 5%, 10%, 15%, 20% et 25% a entraîné une inhibition dose et temps dépendante de la libération du TNF- $\alpha$  et du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Hassan. et al., 2013) L'activation de NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans la stimulation de l'expression de plusieurs gènes de cytokines inflammatoires, comprenant le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-8 (Wu et al., 2009).

Il a été montré que l'administration quotidienne du miel par voie orale à des rats chez lesquels une hépatotoxicité a été induite par le jaune de mélanine (Al-Malki et Sayed, 2013) et à des rats chez lesquels a été induit un œdème aigu des pattes (Hussein et al., 2012), diminuait significativement la libération du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  ainsi que l'activation du NF- $\kappa$ B

### **11.3. Le miel et les espèces réactives de l'oxygène**

De nombreuses études suggèrent que le miel éradique rapidement l'infection sans effets indésirables, réduit l'inflammation, la tuméfaction, la douleur, et l'odeur, et stimule le processus de cicatrisation de la plaie. Les recherches étayées par des observations cliniques positives ont principalement porté sur ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Fox, 2002; Molan et Betts, 2004; Dunford, 2005 ; Gethin et Cowman, 2008 ; Robson et al., 2009). Les plaies chroniques sont considérées comme des milieux très oxydants en raison de la libération des ERO due à l'infiltration par les neutrophiles et les macrophages. Les ERO possèdent certaines propriétés antimicrobiennes bénéfiques contre l'invasion bactérienne, une exposition prolongée à des niveaux élevés d'ERO provoque des dommages aux cellules, et peut inhiber la guérison des plaies aiguës et chroniques (Gordillo et Sen, 2003). Par conséquent, une façon d'interrompre le cycle inflammatoire chronique est de supprimer les ERO au moyen d'anti-oxydants, le miel est connu pour contenir des anti-oxydants qui piègent les radicaux libres (Henriques et al., 2006; van den Berg et al., 2008).

Divers composants de miel contribuent à ses propriétés anti-oxydantes, tels que flavonoïdes, les acides phénoliques, catalase, peroxydases, acide ascorbique, caroténoïdes et produits de la réaction de Maillard. La quantité de ces composants varie en fonction de son origine géographique et botanique (Martos et al., 1997; Aljadi et Yusoff, 2003; Yao et al., 2004; Estevinho et al., 2008)

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques dans le miel sont responsables de ses propriétés antibactériennes et anti-oxydantes, mais n'en sont pas les principaux contributeurs (Gueldof et al., 2002; Estevinho et al., 2008, Truchado et al., 2009; . Silici et al., 2010; Alvarez-Suarez et al., 2010). Dans une assez récente étude, les effets de l'extrait méthanolique et l'extrait par l'acétate d'éthyle du miel ont été testés *in vitro* sur l'oxyde nitrique libéré par les macrophages murins stimulés par les endotoxines et l'interféron  $\gamma$ . Il a été montré que les deux

extraits avaient la capacité d'inhiber la production de NO par les macrophages murins. Malgré que la teneur en composés phénoliques de l'extrait méthanolique était plus élevée que l'extrait à l'acétate d'éthyle, ce dernier a montré la plus forte activité (Kassim et al., 2010).

Une étude, par Ahmad et al. (2009) soutient l'hypothèse que le miel présente son activité anti-inflammatoire par l'inhibition des macrophages activés. Il a été trouvé que le traitement par le miel des macrophages de rongeurs, activés par la thrombine bovine, aboutit à la suppression effective de la libération respiratoire. Fait intéressant, tous les échantillons de miel de différentes origines ont présenté une suppression efficace.  $O_2^{\cdot-}$  réagit facilement avec le NO produit par les macrophages, donnant lieu à la formation de peroxynitrite, un oxydant majeur à l'origine de dommages tissulaires (Fukuyama et al., 1996). Le miel inhibe la production de NO par les macrophages murins stimulés avec LPS/IFN- $\gamma$ , ainsi que le peroxynitrite chez les rats traités aux LPS (Kassim et al., 2012).

L'infiltration persistante par les neutrophiles et la libération des ERO contribuent à la physiopathologie des lésions chroniques. Une diminution de la libération de  $O_2^{\cdot-}$  par le miel a été reportée (van den Berg et al., 2008 ; Alvarez-Suarez et al., 2010 ; Leong et al., 2012). Une activité anti-oxydante des miels a été attribuée à l'inhibition de la formation des ERO, soit par inhibition de l'explosion oxydative des neutrophiles ou par piégeage direct des ERO (Henriques et al., 2006). Fait intéressant, une réduction dose-dépendante de la production de  $O_2^{\cdot-}$  par les neutrophiles humains par le miel n'a pas de corrélation avec les niveaux de composés phénoliques connus comme pièges de radicaux libres (Leong et al., 2012). Cette observation indique que l'activité anti-oxydante de miel est probablement causée par l'inhibition de l'explosion oxydative des neutrophiles (Majtan, 2014)

Dans une étude assez récente, un composé avec un poids moléculaire de 261 Da, isolé du miel de jungle a montré une activité chimiotactique sur les PMNs (Fukuda et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont également étudié le mécanisme de l'activité anti-tumorale du miel de jungle, qui semble être liée à la production d'ERO par les PMNs activés. Le miel de jungle a été injecté dans le tissu tumoral de souris (1mg/souris/jour), entraînant une infiltration consécutive et une production

d'ERO par les PMNs dans les zones nécrotiques de la tumeur, avec une diminution de l'incidence et du poids moyen des tumeurs. Le miel à une faible concentration (3% v / v) induit l'apoptose des cellules cancéreuses HCT-15 et HT-29 du cancer du côlon en provoquant la déplétion des thiols non protéiques intracellulaires, et en augmentant la génération des ERO (Jaganathan et Mandal, (2010). Selon Enriques et al., 2006, Alvarez et al. (2010) ainsi que Brudzinsky et Lannigan (2012) le miel entraîne la génération de  $\bullet\text{OH}$ , ce qui pourrait être à l'origine d'une large part de son activité antibactérienne. Cependant pour d'autres auteurs le miel inhibe la génération de  $\bullet\text{OH}$  (Alvarez et al., 2012) avec un effet dose dépendant (Nagai et al., 2011; Das et al., 2013).

#### **11.4. Actions anti-inflammatoires du miel**

La réduction de l'inflammation observée en clinique suite à l'application de miel est étayée par la preuve histologique mettant en évidence la réduction du nombre de cellules inflammatoires présentes dans la plaie (Molan 2002). L'inflammation est une réponse non spécifique de tissu de mammifère à une variété d'agents hostiles. Il existe de nombreux médiateurs de l'inflammation. Par conséquent, l'inhibition de ces médiateurs est l'une des étapes importantes dans le contrôle de l'inflammation (Sobota et al., 2000).

Le miel présente de puissants et multiples effets anti-inflammatoires. De nombreuses observations cliniques rapportent que le miel réduit l'œdème et l'exsudation, minimise les cicatrices et possède un effet apaisant lorsqu'il est appliqué sur les plaies enflammées et les brûlures (Molan, 2011). L'effet anti-inflammatoire de miel peut être expliqué par plusieurs mécanismes d'action: (1) l'inhibition de la voie classique du complément (van den Berg et al., 2008) (2); l'inhibition de la formation des ERO (van den Berg et al., 2008); (3) l'inhibition de l'infiltration leucocytaire (Leong et al., 2012); et (4) l'inhibition de la cyclo-oxygénase -2 (COX-2) et l'expression de la NO synthase inducible (Hussein et al., 2012). Dans une étude très récente, il a été montré que le miel d'acacia à une concentration de 1% (p / v) augmente de manière significative l'expression de l'ARNm de la métalloprotéase matricielle-9 (MMP-9) dans des cultures de kératinocytes primaires humains (Majtan et al., 2010). En outre, l'incubation pendant 24 heures de fragments de peau humaine avec

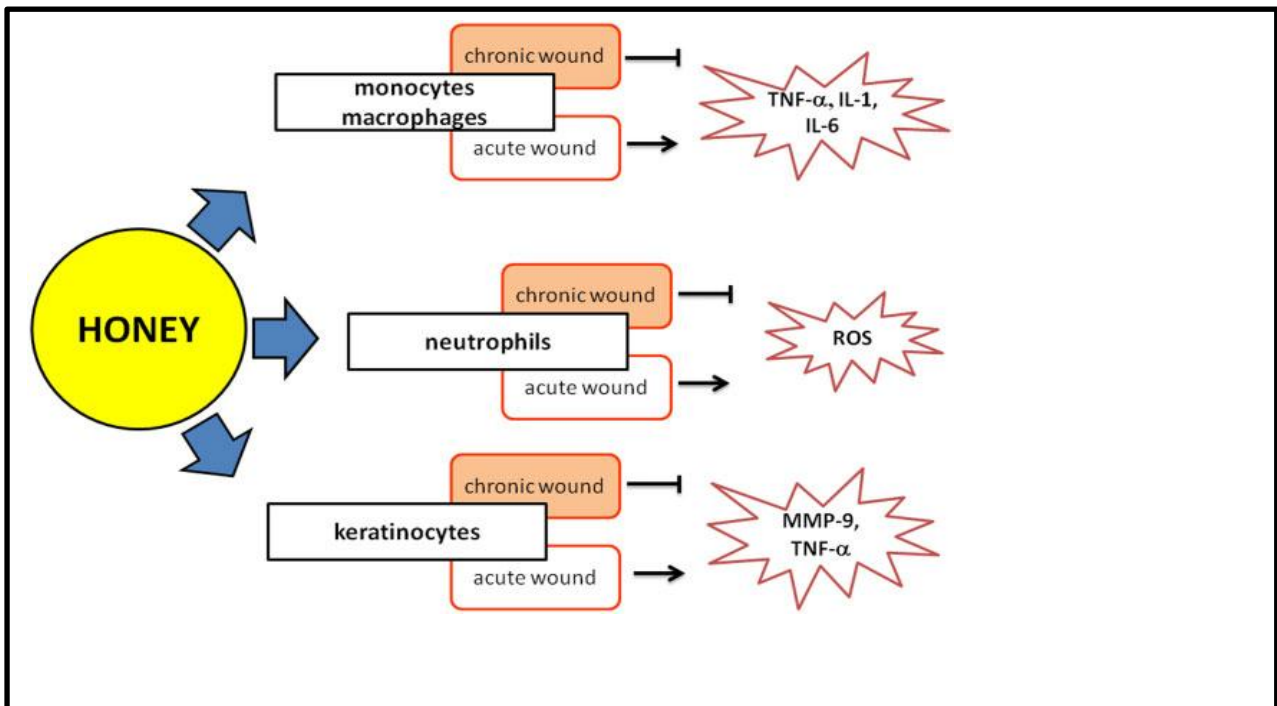


du miel a été associée à une expression accrue de la protéine MMP-9 dans l'épiderme à proximité de la membrane basale. Il a été également constaté une diminution de la quantité relative de collagène de type IV dans la membrane basale et autour des vaisseaux sanguins. Ces résultats semblent contradictoires avec une étude postérieure faite par les mêmes auteurs où le miel de miellat a entraîné l'inhibition de l'expression de la MMP-9 induite par le TNF- $\alpha$  (Majtan et al., 2013). Par conséquent, les auteurs émettent l'hypothèse que le miel peut agir comme un immuno-modulateur à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoires (figure 8). Le miel stimulerait la production de MMP-9 et de cytokines inflammatoires à partir des kératinocytes en présence d'un faible niveau d'un médiateur inflammatoire /stimulateur. D'autre part, si un environnement est infecté et que l'inflammation est en cours, le miel supprime la production de MMP-9 et de cytokines inflammatoires.

Pris ensemble ces résultats semblent contradictoires, le miel semble réduire ou activer la production des EROs en fonction du microenvironnement (fig 8)(Majtan, 2014).

Cependant, il est important de signaler que dans la dernière étude, d'une part, les concentrations utilisées étaient de beaucoup plus élevées. D'autre part, des extraits du miel ont été utilisés et non le miel complet. Selon Aliyu et al.(2012) le fractionnement du miel d'acacia affecte négativement son potentiel anti-oxydant le rendant ainsi un agent générateur de radicaux, en contraste avec le miel non fractionné.

Les effets anti-inflammatoires suite à l'ingestion du miel chez l'être humain ont été étudiés par Al Waili et Boni (2003), au jour 15 les concentrations plasmatiques du thromboxane B, de la PGE(2) et PGF(2 $\alpha$ ) ont diminuées respectivement de 48%, 63% 50%.



**Figure 8 :** Action immune-modulatrice du miel sur les cellules immunitaires et les cellules cutanées impliquées dans la cicatrisation des plaies (Majtan, 2014).

Le miel est capable de stimuler ou d'inhiber la libération de certains facteurs (cytokines, MMP-9, EROs) à partir de cellules immunitaires et cutanées en fonction de l'état de la plaie. Il induit respectivement, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de MMP-9 au cours de la phase inflammatoire et proliférative de la cicatrisation. D'autre part, lorsque l'inflammation est incontrôlée, le miel inhibe l'inflammation prolongée de la plaie et réduit les niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires, EROs, MMP-9, interleukines, 9 et TNF- $\alpha$ .

**NB/ ROS = EROs**

# **MATERIELS ET METHODES**

---

## IV. Matériels et méthodes

---

D'après Halliwell (1996), les mécanismes d'action d'un anti-oxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des radicaux libres (RL).
- L'inhibition des enzymes responsables de la production des RL
- La protection par les systèmes de défense antioxydants

L'objectif de notre présente étude est de tester l'effet des trois types de miels sur :

- le  $\cdot\text{OH}$  généré par la réaction de Fenton (piégeage direct des RL),
- Sur la déplétion du GSH par le système horseradish peroxydase/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , (protection par les systèmes de défense antioxydants),

et ce en utilisant la RPE

- Le  $\text{O}_2^{\cdot-}$  libéré par les PMNs équins activés par la méthode de chemiluminescence (piégeage direct des RL)
- Sur la dégranulation des PMNs en prenant comme témoin de cette dégranulation la quantité de MPO libérée en utilisant dans ce dernier cas un test ELISA spécifique (inhibition des enzymes responsables de la production des RL).
- Pour terminer, en utilisant une méthode originale appelée SIEFED (Specific Immun-Extraction Followed by Enzymatic Detection), permettant d'éviter tout effet artefactuel, nous avons testé nos échantillons de miel sur l'activité spécifique de la MPO équine (inhibition des enzymes responsables de la production des RL).

### 1. Echantillons de miels

Trois types de miels Algériens d'origines botaniques certifiées (voir annexes) : Miel de miellat (HH : le plus foncé) originaire de Sidi Lazreg (Relizane), miel mixte (MH) originaire de Laghouat, et miel de nectar (NH : le plus clair provenant de Bouguirat (Mostaganem). Les miels crus utilisés dans cette études n'ont été soumis à aucun traitement thermique ou à aucune autre opération susceptible d'altérer leurs compositions. Ces échantillons ont été stockés à 4°C et à l'obscurité

jusqu'à leur analyse. Les trois types de miels sont en accord avec le standard international (Analyses effectuées au niveau du laboratoire CARI ABSL, Louvain la Neuve, Belgique. Analyses effectuées le 13/07/2010). Voir bulletins d'analyses en annexe.

## 2. Réactifs

Les sels de sodium et de potassium de qualité analytique, le chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), l'albumine de sérum bovin (BSA), dimethyl-sulfoxyde (DMSO), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le sulfate de fer ( $\text{FeSO}_4$ ) provenaient de Merck (VWRI, Belgique). 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxyde (DMPO), paranitrophenyl phosphate (pNPP), ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lucigénine (*bis-N*-methylacridinium nitrate), Percoll provenaient de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). Le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate sodium solution, l'acide gallique, le chlorure d'aluminium et la catéchine provenaient de Sigma (représentée par Algerian Chemical Society, Algérie). Le bleu Trypan de ICN Biomedicals (Solon, OH, USA). Amplex Red de Molecular Probes (Pays-Bas) Horseradish peroxidase (HRP) de Boehringer Mannheim. Les plaques de microtitration (Cliniplate EB) provenaient de Fisher Scientific (Aalst, Belgique). Toutes les solutions aqueuses ont été préparé avec de l'eau préalablement purifiée en Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA)

## 3. Taux des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu selon Singleton et al.(1999).

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le miel.

Trente microlitre de solution de miel (0,1 g / ml) a été mélangé avec 2,37 ml d'eau Milli Q et 150  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu à 0,2 N. La solution a été soigneusement mélangée au vortex et incubée pendant 2

min à température ambiante. 450 microlitres de solution de carbonate de sodium (0,2 g / ml) a été ajoutée au mélange réactionnel et incubées pendant 2 h à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Le dosage de chaque miel a été réalisé en triplicate, suivi du calcul de la moyenne des densités optique mesurées. La quantité de polyphénols totaux, exprimée en mg équivalents acide gallique par 100g de miel, est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec l'acide gallique ( $R^2 = 0.9990$ ).

#### **4. Taux des flavonoïdes totaux**

Le taux de flavonoïdes (TFC) a été déterminé en utilisant le test de chlorure d'aluminium selon la méthode de Amaral et al. (2009). Le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxyles OH des phénols ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 420 nm.

Un volume de 10  $\mu$ l d'une solution de miel de 10% (w / v) a été ajouté dans les puits d'une microplaque à 96 puits, puis 30  $\mu$ l de nitrite de sodium à 2,5%, 20  $\mu$ l de solution de chlorure d'aluminium à 2,5% puis 100  $\mu$ l d'une solution d'hydroxyde de sodium à 2% ont été ajoutés successivement. Les échantillons ont été bien mélangés et L'absorbance a été mesurée à 450 nm.

La quantité de flavonoïdes totaux, exprimée en mg équivalents catéchine par 100g de miel, et est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec la catéchine ( $R^2 = 0.9997$ )

#### **5. Etude par résonance paramagnétique électronique (EPR).**

La résonance paramagnétique électronique (ou Electron Spin Resonance : ESR) est une technique spectroscopique qui détecte des électrons non appariés présents dans l'échantillon. En tant que tel, l'EPR est la seule méthode précise qui peut fournir une preuve directe de la présence d'un radical libre. En outre, l'analyse du spectre EPR permet généralement la détermination de l'identité du radical libre (Mason, 1994). En raison de leur courte durée de vie, la détection de ces radicaux libres est très difficile dans des échantillons biologiques et, par conséquent, des agents de spin trap (les nitriles) sont utilisés pour former des adduits avec une durée de vie plus élevée.

Les mesures ont toutes été faites à la température du laboratoire. Les mesures de hauteur de raies et de largeur de la raie centrale ont été faites à l'aide du logiciel d'exploitation Bruker Win-Simfonia program fonctionnant sous Microsoft Windows.

### **5.1. Effet du miel sur le radical hydroxyle produit par la réaction de Fenton.**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µl, 10<sup>-3</sup> M) en présence de FeSO<sub>4</sub> (25 µl, 10<sup>-4</sup> M), le DTPA (25 µl, 10<sup>-4</sup> M), et la DMPO (50 µl, 100 mM) ont été ajoutés à chaque échantillon de miel à la concentration finale de 2%, 5% ou 10% (p / v). Les mélanges réactionnels ont été immédiatement transférés dans la cellule de la cavité TM du spectromètre. Les spectres ESR ont été enregistrés à température ambiante sur un spectromètre Bruker (Bruker ESP300E, Bruker, Kalsruhe, Allemagne). La réaction de Fenton en absence de miel a été considérée comme contrôle positif (CTRL) pour les spin adduct DMPO-OH, et la hauteur du signal du spectre ESR a été prise comme 100%.

Les caractéristiques du spectromètre étaient les suivantes : Centre du champ magnétique : 3480 G, fréquence de l'onde irradiatrice : 9,8 GHz, puissance de l'onde : 20 mW, modulation d'amplitude : 1.012 Gauss, fréquence de modulation : 100 KHz, largeur de balayage : 100 G, temps constant 1.92 ms et temps de conversion 168 ms, Gain : 2.10<sup>4</sup>, nombres de scan : 2.

### **5.2. Effet du miel sur la génération du radical thiyle**

Le mélange réactionnel 25 mg/ml horseradish peroxydase (HRP), 10mM GSH, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et 100 mM DMPO en tampon phosphate (pH 7, 5) ont été ajoutés à chaque échantillon de miel à la concentration finale de 2%, 5% ou 10% (p / v), et immédiatement transférés dans la cavité TM du spectromètre. Les spectres ESR ont été enregistrés à température ambiante sur un spectromètre Bruker (Bruker ESP300E, Bruker, Kalsruhe, Allemagne), dont les caractéristiques étaient les suivantes : fréquence de l'onde irradiatrice (9.8 GHz), puissance de l'onde (20 mW); gain 2x 10<sup>4</sup>; temps constant, 164 ms ; temps de conversion, 40,96 ms ; centre du champ magnétique 3480± 50 G et nombre de scan 2. Le signal EPR, correspondant au spin adduit de DMPO/thiyl (GS•) résultant de la réaction du DMPO avec le radical GS• produit par l'activité enzymatique de la HRP enzymatic sur le GSH. Le signal EPR obtenu en absence de miel a été pris comme contrôle (Ctrl).

## **6. Isolement des neutrophiles équins**

Le but de cette manipulation est d'isoler les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) équins à partir de sang complet prélevé sur Ethylène-diamine-tetra-acétique acide (EDTA) . Les échantillons de sang sont prélevés à partir de chevaux sains et récoltés dans des vacutainers stériles de 9 ml contenant de l'EDTA (1,6ml/ml de sang). Les chevaux étaient, élevés, nourris et logés dans les mêmes conditions (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liege, Belgique). Les PMNs ont été isolés selon la technique de Pycock et al (1987).

**-Réactifs :** Solution tamponnée PBS (Phosphate Buffer Saline), Solution tamponnée HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), solution de Percoll, solution d'éclatement des globules rouges (Hémolyse) voir annexes.

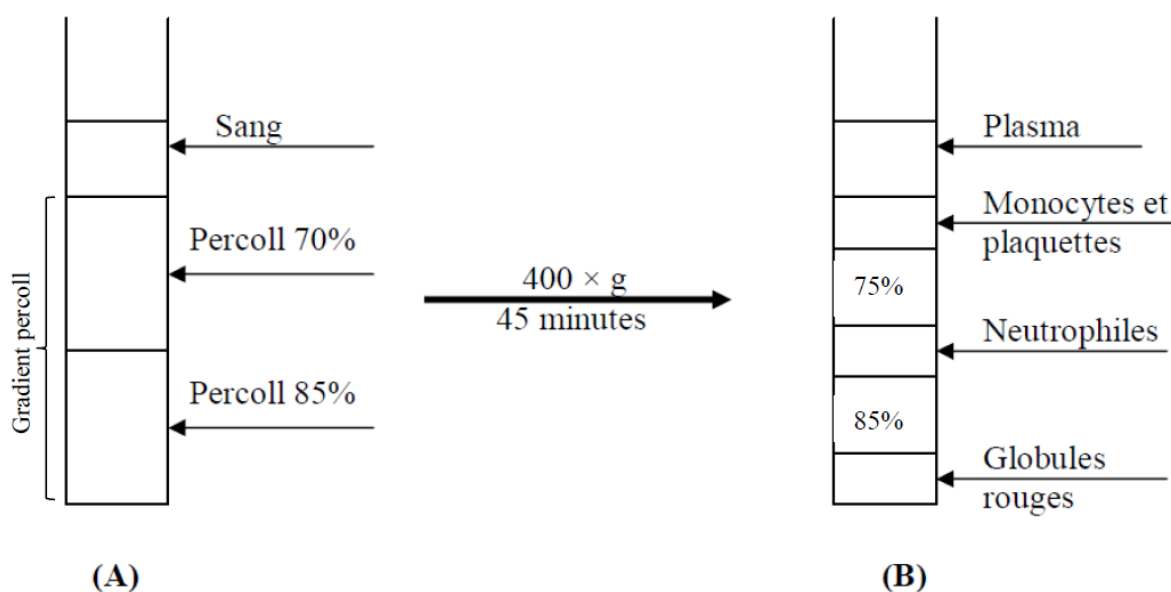
### **- Isolement des neutrophiles sur gradient Percoll.**

Au fond d'un tube falcon de 15 ml déposer 2,5 ml de la solution Percoll 70%. A l'aide d'une seringue ajouter délicatement en dessous de cette première couche 2,5ml de solution Percoll 85%, en veillant à ce que les deux couches ne se mélangent pas. Attention, déposer lentement et de manière continue, sans coups répétés, sinon risque de ne pas obtenir la séparation des phases Percoll 70% et 85%.

Ajouter délicatement à la surface du gradient 3ml de sang de cheval. Centrifuger les tubes 45 mn à 400g, sans frein (la lampe témoin frein ne doit pas s'allumer) pour préserver la séparation des cellules. Pendant la centrifugation préparer des tubes à essais de 10ml où l'on déposera les PMNs isolés : pipeter 2,0 ml de HBSS 1X dans le fond du tube (1 tube à essai pour le contenu de 2 tubes falcon). Après centrifugation, dans le fond du tube se trouvent les globules rouges et les éosinophiles. Les neutrophiles forment une couronne entre les solutions de Percoll à 70% et 85%. Au-dessus de cette couronne se trouvent une autre couronne constituée par les monocytes, les lymphocytes et les plaquettes et au-dessus de laquelle se trouve le plasma. Aspirer le plasma ainsi que la couronne contenant les cellules mononuclées à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à une trompe à eau. Moyennant Pipette pasteur, prélever la couche qui à présent, surnage sur la seule



couche de Percoll encore restante (PMNs isolés), et la déposer sur du HBSS 1X du tube à essai préparé pendant la centrifugation (Chaque tube à essai de 10ml avec 2,0 ml de HBSS 1X reçoit l'isolat de 2 tubes Falcon). Lors du prélèvement, faire attention en aspirant doucement, sans relâcher le contenu de la pipette Pasteur vers le tube, car alors les PMNs deviennent irrécupérables. Re-centrifuger 10min (sans fermer les tubes) à 1500trs/min (2000trs/mn) à température ambiante, puis éliminer le reste de Percoll surnageant.



**Figure 9:** Schématisation de la séparation des cellules sanguines en fonction de leur densité grâce à un gradient de Percoll : (A)= Préparation du gradient et dépôt de l'échantillon (sang) et (B)=Séparation en bandes distinctes des différents constituants du sang après la centrifugation

Si le culot de PMNs présente des taches rouges (présence de globules rouges), les faire éclater moyennant la solution d'éclatement des globules rouges. Pour ce faire, re-homogénéiser le culot avec la solution et les regrouper dans un 1 seul tube à essai, re-centrifuger pendant 10mn à 1500 trs/min, éliminer le surnageant. Le culot obtenu est représenté par les PMNs. Eliminer ce surnageant, et remettre en suspension le culot de cellules dans 2 ml de PBS 1X et homogénéiser = suspension cellulaire des PMNs.

#### - Comptage des PMNs sur une lame de Burker

Dans les différentes manipulations qui vont suivre, il est obligatoire d'utiliser un nombre plus ou

moins précis de cellules par cuvette ou par tube. Il est donc indispensable de connaître le volume cellulaire de départ afin d'ajuster le nombre de cellules adéquat à la manipulation.

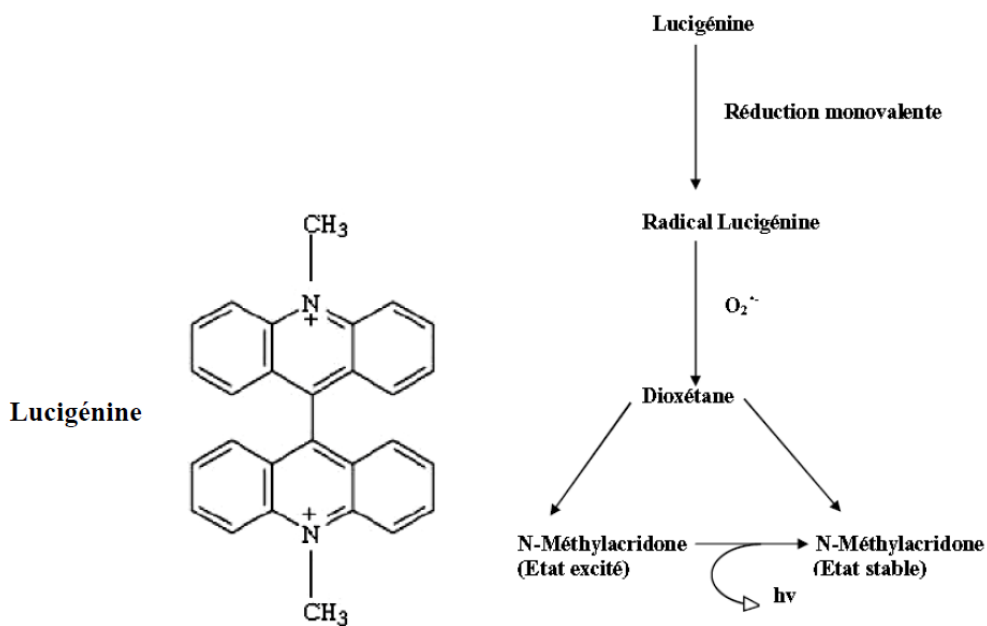
## **7. Détection de la chimiluminescence des EROs produites par les PMNs (D'après Benbarek et al., 1996)**

**Réactifs :** voir annexes

La chimiluminescence (CL) est une réaction d'oxydoréduction au cours de laquelle, des molécules, portées à un état excité, retournent à l'état fondamental en émettant de la lumière. Dans les cellules, l'intensité de la CL est généralement très faible sans activateur ou amplificateur.

L'amplificateur utilisé au cours de nos travaux est la lucigénine ou le Bis-N-méthylacridinium nitrate ; L'utilisation de la lucigénine est intéressante car son excitation est provoquée par l'anion superoxyde (Vladimirov et Proskurnina, 2009). Ainsi, l'intensité de la lumière (vert-jaune) mesurée sera proportionnelle au taux d'anion superoxyde produit dans le milieu. Celui-ci étant essentiellement produit via l'activité de de la NADPH oxydase des PMNs. En neutralisant l'anion superoxyde produit par les PMNs, une molécule anti-oxydante aura pour effet de diminuer la réponse en chimiluminescence (Van Dyke et al., 2003 ; *Bartosz*, 2006).

Le mécanisme par lequel la lucigénine émet la lumière est résumé dans la figure 10 ; notamment, en présence de l'anion superoxyde, il y a une réduction monovalente de la lucigénine ( $LC^{2+}$ ) formant un anion radicalaire ( $Luc\bullet^-$ ). Ce dernier peut interagir avec l'anion superoxyde pour donner un dioxétane ( $LCO_2$ ) instable; le dioxétane se décompose rapidement en donnant deux molécules de N-méthylacridone. L'une de ces molécules se trouve dans un état électronique excité et lors du retour à l'état fondamental, la lumière est produite (Figure 10) (*Bartosz*, 2006). La lumière produite est proportionnelle à la production de l'anion superoxyde et est mesurée grâce à un Multiscan reader (Multiscan Ascent; Fisher Scientific)



**Figure 10:** Mécanismes réactionnels de la chimiluminescence avec la lucigénine (adapté de Bartosz, 2006).

### Mode opératoire

Déposer dans les puits de la microplaque  $10^6$  PMNs dilués dans 200  $\mu$ l PBS et incubé avec chaque miel aux concentrations finales de 2%, 5%, 10% et 20% (faire un triplicat). Réaliser trois contrôles, 2 contrôles négatifs et un contrôle positif. A cette fin remplacer le miel par :

- PBS IX pour le contrôle 0
- DMSO pour le deuxième contrôle zéro.
- Eau à la place du miel pour le contrôle 100%.

Incuber 10 mn à 37°C à l'étuve.

Ajouter 25  $\mu$ l de  $CaCl_2$  et 2  $\mu$ l de lucigénine dans chaque puits (tests et contrôle). Ensuite, juste avant la mesure 10  $\mu$ l de PMA ( $1,6 \times 10^{-5}$  M) sont ajoutés dans les puits tests et les puits contrôle 100%.

Lecture à 37°C pendant 30 mn. La réponse obtenue est exprimée selon la valeur intégrale du pic de l'émission totale de chimiluminescence.

**8. Dosage ELISA de la MPO totale dégranulée par les PMNs activés.** (Daprès Franck et al., 2005).

Ce dosage ELISA permet de doser la MPO équine totale, c'est-à-dire la MPO active et non active libérée par les PMNs. Cette technique permet d'apprécier la libération de MPO par les neutrophiles équins et permet indirectement d'étudier l'effet d'une substance (ici le miel) sur le processus de dégranulation des PMNs. La MPO totale libérée par les PMNs est donc le témoin de leur activation et dégranulation.

Le principe du dosage ELISA de la MPO équine est basé sur un dosage immunologique de type « sandwich ». La MPO sera entourée par deux anticorps : un primaire pour la fixation et un secondaire couplé à une enzyme pour la révélation. Il y'a fixation sur une microplaque d'anticorps polyclonaux liant (anticorps primaire, IgG anti-MPO équine produits chez le lapin). Une fois la MPO fixée, un second anticorps d'une autre origine animale est ajouté (anticorps secondaire IgG anti-MPO équine produits chez le cobaye). Celui-ci se fixera spécifiquement sur la MPO. Cet anticorps est couplé à une enzyme, la phosphatase alcaline. Une fois cet anticorps fixé, ajouter le pNPP (Paranitrophenyl phosphate), substrat de la phosphatase alcaline.

Le produit de la réaction entre la phosphatase alcaline et le pNPP donne une coloration jaune dont l'intensité sera lue par Multiskan à 405 nm. L'intensité de la coloration sera proportionnelle à la quantité de MPO présente dans l'échantillon à doser.

**Réactifs :** Tampon de coatage, tampon de blocage, solution de lavage (tampon PBS/tween. (voir annexes)

### **Mode opératoire**

#### **Coatage d'une plaque EB**

Coater une plaque 96 puits de type EB avec une solution saturées d'IgG de lapin anti-MPO équine (anticorps primaires, 3 µg/ml) diluée dans un tampon de coatage. Ajouter 100µl de la solution d'IgG dans chaque puits et incuber une nuit à 4°C en couvrant les puits avec du film plastique autocollant.

Le lendemain, renverser la plaque pour éliminer la solution d'anticorps et ajouter 200 µl de la solution de blocage par puits afin de saturer les sites de fixation non spécifiques. Incuber la plaque pendant 2 h 30 mn à température ambiante couverte d'un film pastique autocollant.

### **Chargement de la plaque coatée**

Éliminer le tampon de blocage et laver quatre fois la plaque avec la solution de lavage et laisser sécher la plaque.

La première étape de ce protocole consiste à provoquer la dégranulation de la MPO par les neutrophiles. Pour ce faire, les miels à tester aux concentrations finales de 2%, 5%, 10% et 20% sont ajoutés à 940 µl d'une suspension cellulaire de PMNs ( $10^6$  cellules/ml) et placés dans un incubateur à 37°C pendant 10 minutes. À la fin de l'incubation, les PMNs sont stimulés avec le PMA (50 µl, 0,8µM) et les tubes sont de nouveau placés à 37°C pendant 30 minutes. La deuxième étape du protocole permet de déterminer l'effet du miel sur la dégranulation. Ainsi, après la stimulation, les tubes sont centrifugés (10 minutes à 450g) puis les surnageants récupérés délicatement et dilués 200 fois avec le PBS. 100 µl des surnageants sont distribués dans les différents puits dans la plaque préalablement coatée avec des anticorps anti-MPO (obtenus chez le lapin) et la plaque est placée toute la nuit à 4°C.

Éliminer les échantillons et laver quatre fois avec la solution de lavage. Ajouter 100µl d'une solution d'IgG de cobaye (anticorps secondaires, 5µg/ml) dans le tampon de coatage par puits. Incuber 2 h à 37°C.

La plaque est de nouveau lavée (4 ×) et 100 µl de para Nitro-Phényl-Phosphate (pNPP) sont ajoutés ; la plaque, recouverte de papier aluminium, est placée à 37°C pendant 30 mn, puis la réaction est arrêtée en ajoutant 100 µl d'une solution de NaOH. L'absorbance, mesurée à 405 nm (Multiskan Ascent Labsystems), est proportionnelle à la quantité de MPO libérée par les neutrophiles. Le contrôle représentant 100% de la quantité de MPO libérée sont : le contrôle PBS (PMNs stimulés et du de PBS à la place du miel). Expérience en triplicate avec 5 répétitions.

## 9. Dosage SIEFED

Le SIEFED est une méthode originale mise au point par Franck et al. (2006) et qui consiste en une extraction de la MPO par des anticorps spécifiques immobilisés. Du fait que ce soit à l'aide d'anticorps immobilisés et non dans un tube permet la réalisation de lavages qui vont permettre une élimination des impuretés (contaminants protéiques, espèces anti-oxydantes en excès), qui risquent d'interférer avec l'activité de l'enzyme ou les substrats de révélation de l'enzyme.

L'extraction est suivie d'une révélation enzymatique directe de la MPO immobilisée par l'ajout d'une solution réactionnelle contenant l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'Amplex red et le nitrite de sodium.

La MPO active en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , transforme l'Amplex red (substrat révélateur) en résorufine qui est excitable à une longueur d'onde de 544 nm et réémet après excitation à 590 nm. La fluorescence émise par la résorufine est mesurée au fluoroskan pendant une cinétique de 30 mn à 37°C. La fluorescence sera proportionnelle à la quantité de MPO active fixée par les anticorps.

**Réactifs :** Tampon de coatage, tampon de blocage, solution de lavage, Tampon phosphate, solution de nitrite de sodium, solution de peroxyde d'hydrogène, solution d'Amplex red

**Préparation :** coatage et blocage de la plaque 96 puits (cf :7)

### Mode opératoire

Avant l'étape d'immuno-extraction, les échantillons de miels aux concentrations finales de 2%, 5%, 10% et 20% (p/v) ont été mis à incuber 37 °C pendant 10 minutes avec 250  $\mu\text{l}$  d'une solution de MPO équine (20 ng/ml). la solution de MPO équine (20 ng/ml) utilisé pour le SIEFED a été préparée avec de la MPO équine purifiée diluée dans un tampon PBS à pH 7,4 et 5 g/l de d'albumine de sérum bovin ou BSA et 0,1% de tween 20.

100  $\mu\text{l}$  de chaque tube sont distribués dans les différents puits d'une plaque multi-puits. La plaque est placée dans l'incubateur (37°C, 2H). A la fin de la période d'incubation, la plaque est lavée 4  $\times$  avec une solution de PBS (7.4) et Tween (0.1%). L'activité de MPO est révélée par l'ajout des substrats de la MPO constitués de l'Amplex red (40 $\mu\text{M}$ ) , du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 $\mu\text{M}$ ) et le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) (10 mM) qui permet d'amplifier la réaction. L'Amplex red est un composé stable et non fluorescent qui interagit avec le peroxyde d'hydrogène de manière stoechiométrique pour produire

un composé fluorescent. Le milieu réactionnel (10 ml) est composé de 20  $\mu\text{l}$  d'Amplex red, 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (11.5  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% + 988.5  $\mu\text{l}$  d'eau MilliQ) et le tampon phosphate (9.880 ml). 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaNO}_2$  sont distribués dans tous les puits suivis de 10  $\mu\text{l}$  du milieu réactionnel. L'effet des miels sur l'activité de la MPO s'effectue en mesurant la fluorescence (Fluoroscanner Ascent FL, Thermo scientific, Belgique). Pour le contrôle représentant 100% de l'activité de la MPO le miel est remplacé par l'eau distillée

### **9. Etude statistique**

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux a été réalisée en triplicate ( $n=3$ ). En ce qui concerne le modèle enzymatique et cellulaire chaque point a été fait en triplicate et chaque expérience répétée 2 à 4 fois ( $n$  entre 6 et 12). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel : GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).  $p < 0.05$  a été considérée comme significative.

# RESULTATS

---






## V. Résultats

### 1. Taux des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été respectivement effectué par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocaltheu et celle au chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Malgré sa sensibilité et sa simplicité la méthode Folin, n'est pas spécifique des polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton et al., 1999).

Les résultats obtenus, présentés dans le tableau 3 déterminés à partir de courbes étalons, sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100 g de miel (mg EAG/100g) pour les polyphénols, et en mg équivalent catéchine par 100 g de miel (mg EC/100g) pour les flavonoïdes.

Echantillons	Couleur* (PMS)	polyphénols totaux (mg GAE /100 g miel)	flavonoïdes totaux (mg CE/100 g miel)
Miel de nectar NH	PMS 128 	59.52 • ± 1.31	4.80 ± 0.08
Miel mixte MH	PMS 129 	68.36 • ± 1.20	7.47 ± 0.07
Miel de miellat HH	PMS 145 	122.76 • ± 4.20	20.55 ± 0.72

\* La couleur a été classé en fonction de l'analyse visuelle et du système PMS (Pantone Matching System)

**Tableau 3.** Teneur en polyphénols totaux (mg GAE/100 g de miel) flavonoïdes totaux (mg CE/100 g de miel)

Les résultats obtenus, présentés dans le tableau 1, sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100 g de miel (mg EAG/100g) pour les polyphénols, et en mg équivalent catéchine par 100 g de miel (mg EC/100g) pour les flavonoïdes. Que ce soit pour les polyphénols totaux ou les flavonoïdes on constate que la valeur la plus élevée au miel de miellat (HH) et la plus basse au miel de nectar (NH).

## 2. Effet des différents types de miels sur le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton.

La réaction de Fenton est basée sur la réduction du  $H_2O_2$  par un électron fourni par les ions métalliques pour générer le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ). Le fer est utilisé ici comme donneur d'électrons. Nous avons utilisé le 5,5'-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) comme piègeur de spin, qui réagit avec  $\cdot OH$  pour former une espèce paramagnétique relativement stable : la DMPO-OH spin adduit caractérisé par un spectre ESR quatre lignes (Quadruplet 1:2:2:1) (Mason et al., 1994).

Les figures 10 :1a et 1b, spectre 1, montrent le spectre obtenu par le piégeage du radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) par le DMPO en absence de miel (contrôle).

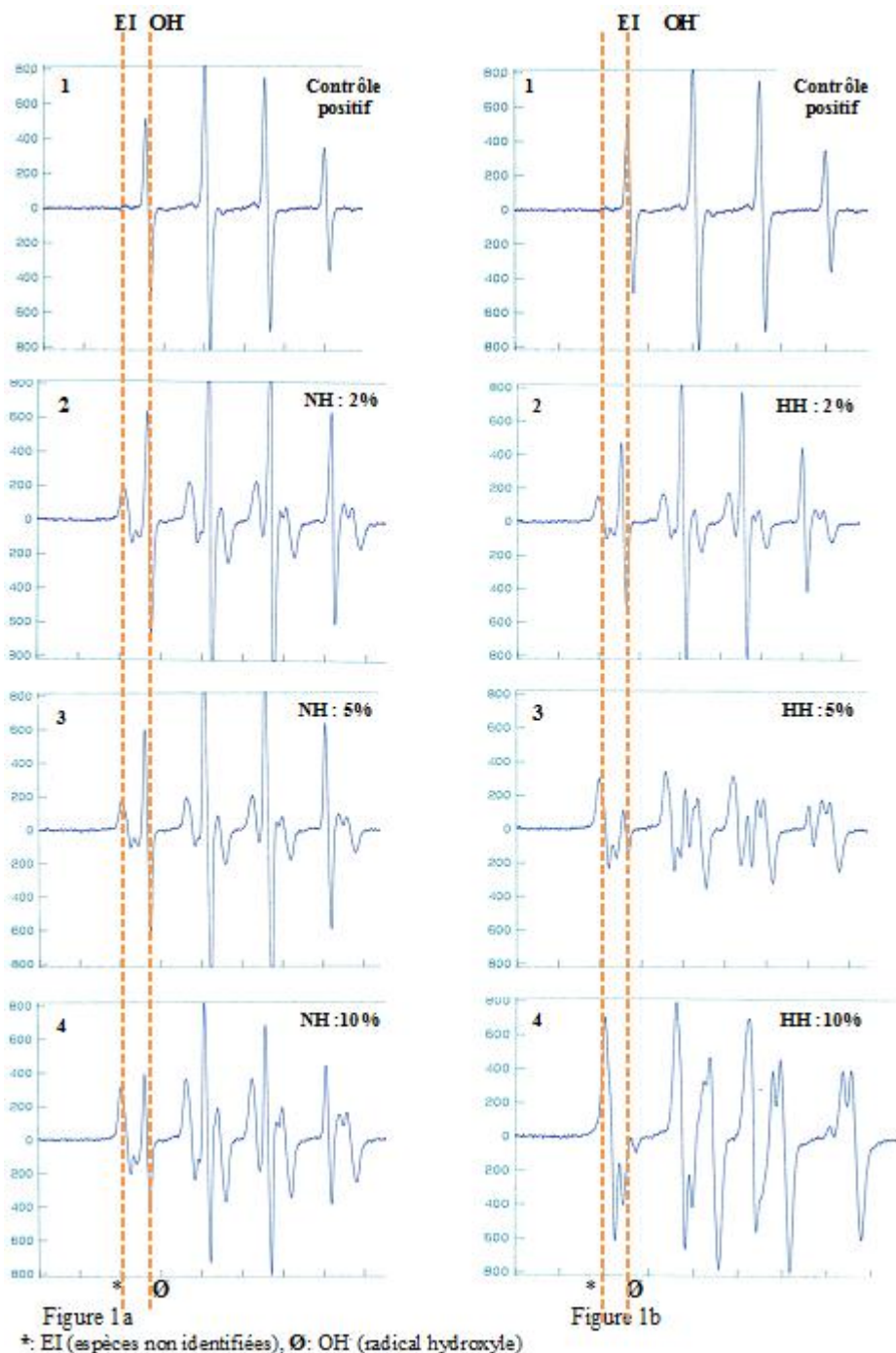
L'addition au système complet de 2% de NH a donné lieu à un spectre complexe avec l'augmentation de l'amplitude du quadruplet ESR attribué au DMPO-OH adduit (signet Ø spectres 2, fig 10 : 1b), et un nouveau signal (signet \* spectre 2, fig 10 : 1b). Lors de l'addition de 5% de NH (P/V) au système complet, il n'y a pas eu de modifications notables dans l'intensité du signal du spectre que ce soit du DMPO-OH adduit (signet Ø) ou du nouveau signal (signet \*) comme le montre la figure 10 :1a, spectre 3.

Suite à l'addition de 10% de NH, nous avons remarqué une diminution de la hauteur du spectre Vs Ctrl. En revanche, les lignes attribuées aux espèces non identifiées ont été augmentées (fig10 : 1a spectre 4). L'addition de 2% de HH à 2 % (p/v) a donné lieu à une légère diminution du quadruplet du spectre ESR de l'adduit DMPO-OH (sign Ø fig 10 : 1b spectre 2), le nouveau signal était également présent. Quand de plus hautes concentrations de HH (5 et 10% p/v) ont été ajoutées au mélange, les lignes correspondantes au DMPO-OH adduit ont été fortement réduites voire totalement disparues pour la concentration de 10 %. Au contraire, le second signal ESR 1 (\*) a augmenté considérablement (fig 10 : 1b spectre 3 et 4).

### 3. Effet du miel sur la déplétion du glutathion.

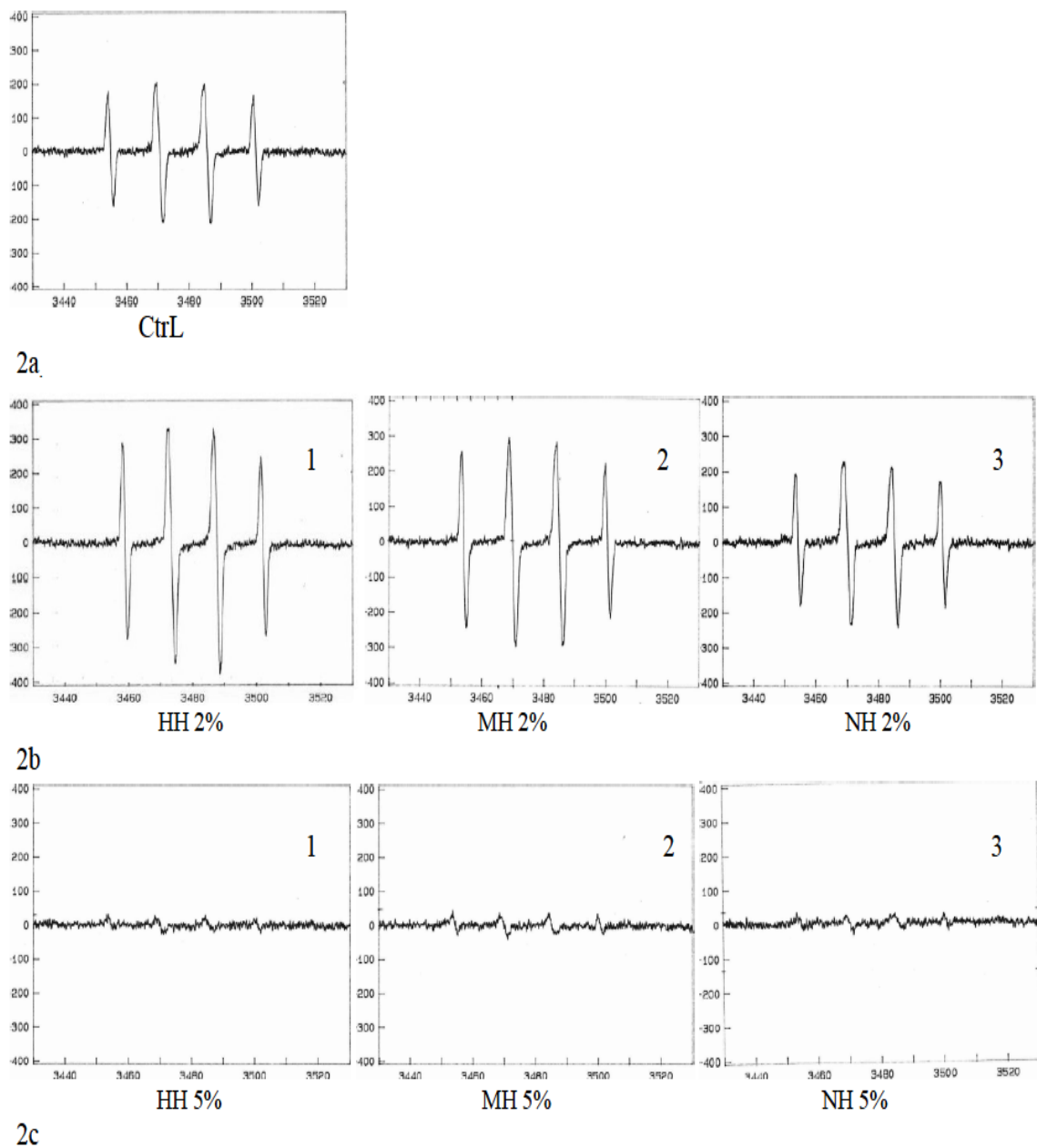
Le système d'oxydation catalysée par la peroxydase nous a permis de tester l'effet du miel sur la formation du radical intermédiaire thiyle ( $\text{GS} \bullet$ ) déclenchée par l'addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence d'une peroxydase (HRP). Ce système avait pour but d'évaluer la capacité de miel à protéger le glutathion de l'attaque oxydante par le couple de  $\text{H}_2\text{O}_2$  / HRP (Fig 11).

La figure (11 ;2a) montre le spectre ESR caractéristique du radical thiyle produit par le système enzymatique HRP/GSH/ $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de DMPO (contrôle). L'addition de 2 % de HH et NH au système complet a donné lieu à une augmentation de l'intensité du signal du quadruplet ESR attribué au thiyle radical adduit, MH étant légèrement actif (fig11 : 2b). Le quadruplet ESR a été totalement aboli lorsque HH, MH et NH à la concentration finale de 5% ont été ajouté au mélange réactionnel (fig11 : 2c).



**Figure 11 : effet du miel sur le radical hydroxyle produit par la réaction de Fenton**

Spectre ESR typique du radical hydroxyle ( $\text{OH}$ ) obtenu par de la réaction de Fenton à partir de  $25\ \mu\text{l Fe}^{2+}$  ( $10^{-4}\text{M}$ ) en présence de  $25\ \mu\text{l DTPA}$  ( $10^{-4}\text{M}$ ),  $5\ \mu\text{l H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-3}\text{M}$ ) et piégé avec  $50\ \mu\text{l DMPO}$  ( $10^{-2}\text{M}$ ). Le signal est caractérisé par un spectre ESR 4-lignes (constante de couplage :  $a^{\text{N}}=14.9\ \text{G}$  et  $a^{\text{H}}=14.9\ \text{G}$ ). Nombre de scan : 2) : contrôle positif ((fig. 1a). Spectre ESR composite obtenu après addition de 2%, 5% and 10% NH (fig.1b). Figure 1c: même chose que pour la figure fig. 1b mais après addition de 2%, 5%, et 10% HH. Paramètres expérimentaux (gain  $2 \cdot 10^4$ , temps constant 1.92 ms et temps de conversion 168 ms).



**Figure 12 : effet du miel sur le radical thiyle produit par le système enzymatique (HRP/GSH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).**

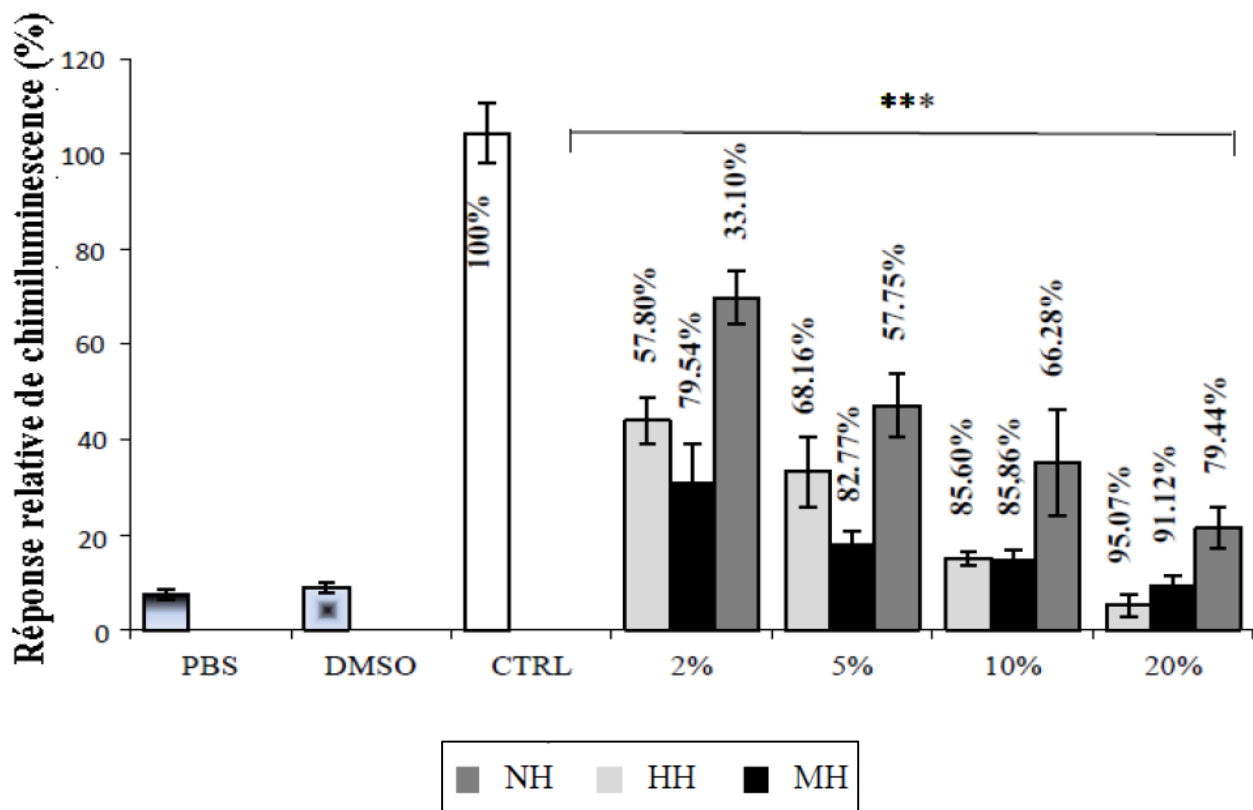
Système complet: HRP/GSH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DMPO (2a). Même chose que (2a) mais avec addition du miel à la concentration finale de 2% (p/v) (2b même chose que (2a) mais avec addition du miel à la concentration finale de 5% (p/v) (2c). Les réglages de l'appareil sont listés dans matériel et méthodes.

#### **4. Inhibition de la production du radical superoxyde par les neutrophiles stimulés avec le PMA.**

L'effet du miel sur le radical superoxyde produit par les PMNs préalablement stimulés au PMA a été mesuré par chimiluminescence en présence de lucigénine, composé connu pour interagir spécifiquement avec l'anion superoxide. Auparavant, afin de vérifier une possible cytotoxicité du miel sur les PMNs, ces derniers ( $10^6$  cellules/ml PBS) ont été incubés avec le miel aux différentes concentrations utilisées et la viabilité cellulaire a été estimée par le test d'exclusion au bleu trypan, cette viabilité a été  $\geq 96\%$ .

La figure 12 montre qu'en absence de miel la luminescence était élevée comparativement aux contrôles négatifs PBS et DMSO (PMNS non activés). Au contraire, quand les différents échantillons de miels aux concentrations finales de 2, 5, 10 et 20% ont été ajoutés à la suspension des PMNs, on constate une inhibition dose dépendante de la luminescence.

Par comparaison à MH les miels HH et NH ont exercé un effet plus prononcé. Cependant, l'inhibition était significative pour les trois miels. A la plus forte concentration soit 20% Cette inhibition a atteint 95.07% pour NH, 91.12% pour HH et 79.44% pour MH. L'ordre d'efficacité suivante a été observée: HH > NH > MH. L'effet du miel a montré un réel effet inhibiteur sur la production du radical superoxyde .



**Figure 13: effet des différentes concentrations des trois types de miels sur la chimiluminescence dépendante de la lucigénine.**

Le pourcentage d'inhibition de la CL de chaque miel a été comparé au contrôle (Ctrl) pris comme 100% (essai réalisé sans miel. PBS et DMSO: valeur de la CL obtenues avec les PMNs non stimulés dans le PBS ou le DMSO (véhicule du PMA). Les résultats sont données en moyenne  $\pm$  SD (n = 9), \*\*\*p < 0.0001 pour tous les échantillons de miels comparés au contrôle.

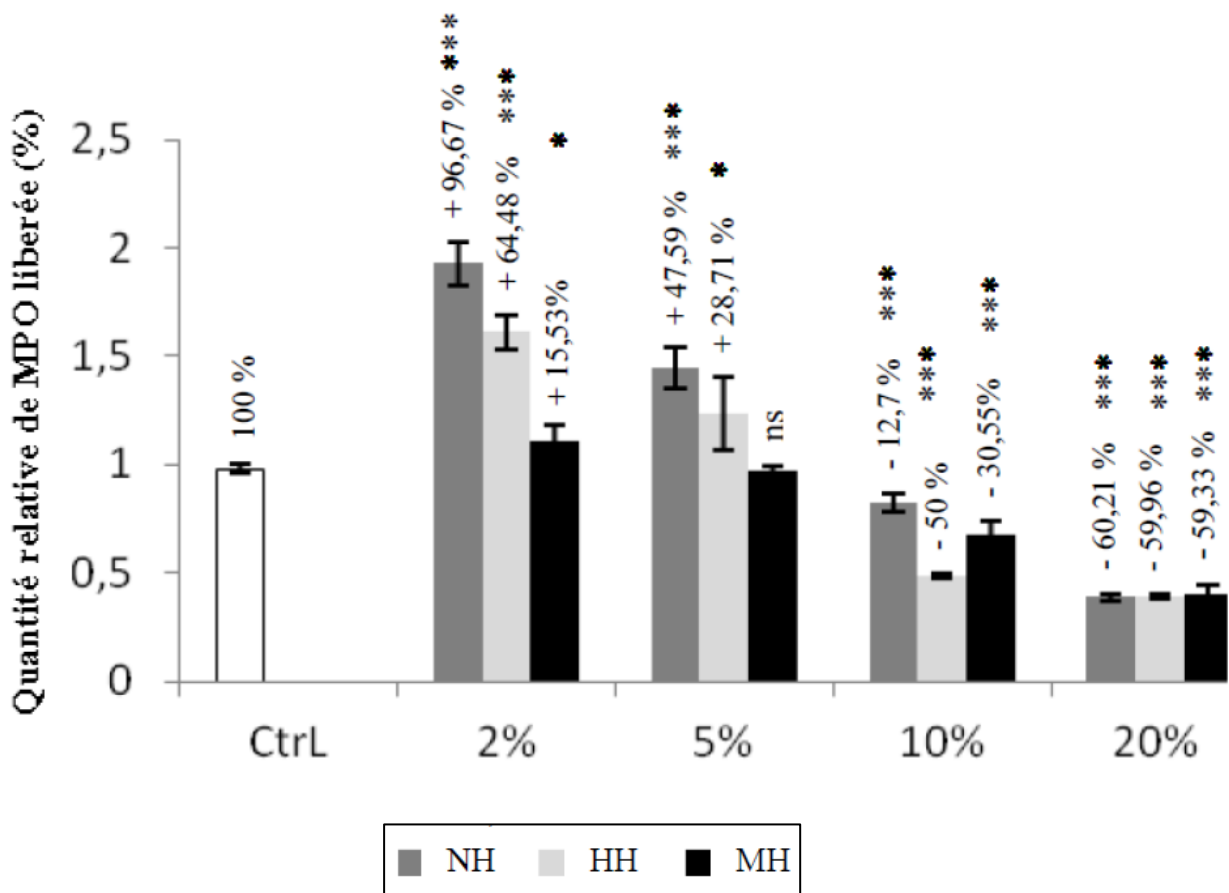
## 5. Effet du miel sur libération de la myéloperoxydase par les neutrophiles activés au PMA (MPO-ELISA Assay).

La libération de la MPO par les neutrophiles activés au PMA a été mesurée par un test ELISA de type « Sandwich ».

Le mélange réactionnel sans miel a été pris comme control positif (100%). L'addition des miels NH, HH et MH à la concentration final de 2% a résulté en une augmentation respective de 96,76%; 64,48% et 15,53% de la quantité de MPO libérée par les PMNs activés au PMA. L'addition des miels NH, HH à la concentration finale de 5% a donné lieu également à une augmentation

respective de la MPO libérée par les PMNs activés de 47,59% et 28,71%, Alors qu'aucun effet significatif n'a été observé avec le miel MH à cette même concentration.

Lors de l'addition des miels NH, HH et MH aux concentrations finales de 10% et 20% a donné respectivement lieu à une diminution de la MPO libérée de 12,7% ; 50%; 30,55% et 60.21%; 59.96%; 59.33%



**Figure 14 : effet du miel sur la quantité totale de la MPO libérée par les PMNs activés au PMA (MPO-ELISA Assay) :** Les colonnes et les barres représentent la moyenne  $\pm$  écart-type des résultats de cinq mesures.\* Différence significative (\* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001) par rapport au contrôle (CTRL). +: augmentation; - Inhibition; ns: non significatif.



## 6. Effet du miel sur l'activité de la MPO (technique SIEFED)

Le SIEFED (*Specic Immunological Extraction followed by Enzymatic Detection*) est une technique développée par Franck et al. (2006) pour mesurer spécifiquement l'activité de la MPO.  $\text{NO}_2^-$  est utilisé pour la première réduction du composé I en composé II (forme oxo-ferryle intermédiaire) de la MPO. Le composé II est réduit en l'enzyme native (forme ferrique,  $\text{Por-Fe}^{3+}$ ) en utilisant l'amplex red comme substrat fluorescent.

Comme le montre la figure 14, comparé au contrôle l'incubation des différents miels avec la MPO a entraîné différents effets. Comparativement au contrôle, globalement, une inhibition très significative ( $p < 0.0001$ ) a été observé avec tous les miels et à toutes les dilutions testées (2, 5, 10 20% en tampon PBS), excepté pour MH à 2%.

A la dilution de 20%, les miels clairs NH et MH ont pratiquement totalement inhibé l'activité de la MPO (99.04% and 99.32% respectivement). Pour le miel foncé HH on constate un effet bi-phasique, et cette inhibition est relativement moins marqué à cette concentration (49.98%).

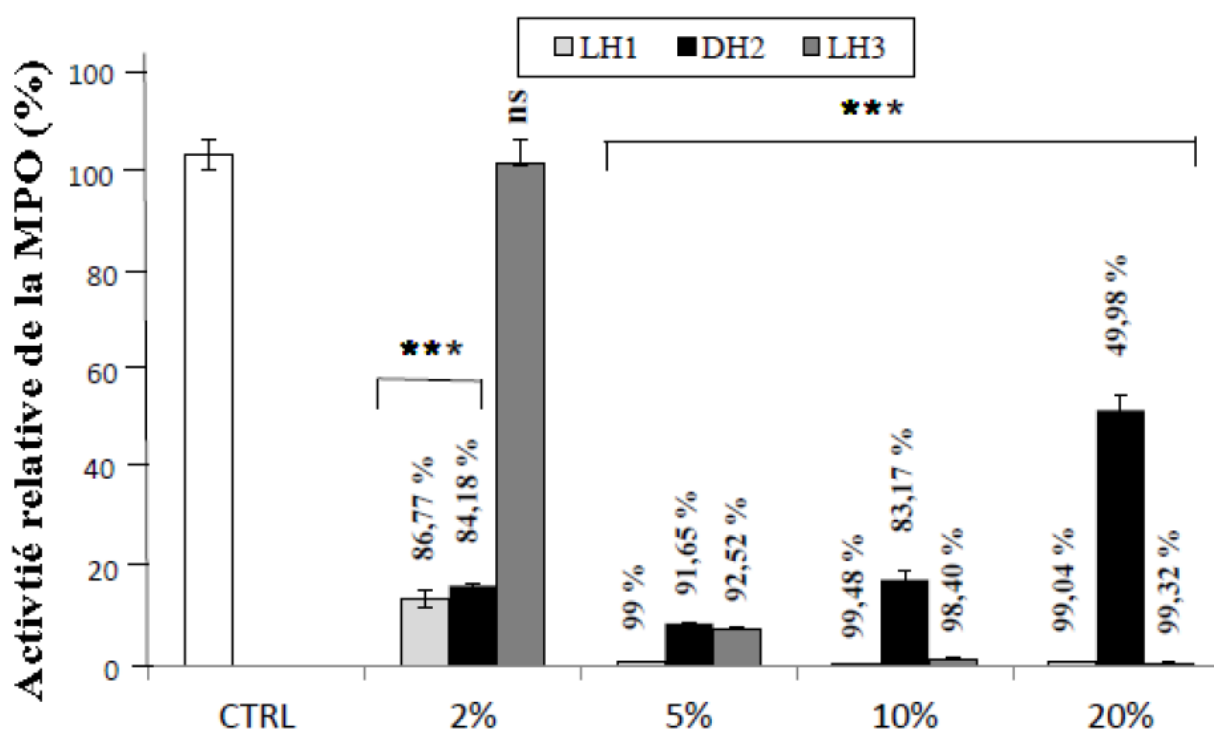


Figure15 : interaction du miel avec la MPO (technique SIEFED)

Activité de l'enzyme en absence de miel est prise comme contrôle (100%). \*\*\* $p < 0.0001$  pour tous les miels et à toutes les dilutions Vs. contrôle, excepté pour MH à 2%. Les résultats sont donnés en moyenne  $\pm$  écart type,  $n=12$ , ns= non significatif Vs. contrôle.

# **DISCUSSION**

---

## VI. Discussion

---

Il est bien établi que les miels provenant de diverses sources montrent une forte corrélation entre leur contenu en composés phénoliques et leurs propriétés anti-oxydantes et antibactériennes (Gheldof et al, 2002; Estevinho et al., 2008; Alvarez-Suarez et al, 2013 ),et que cette teneur pourrait être prédictive de l'activité anti-oxydante du miel.

Comme le résume le tableau 3, le miel de miellat (HH) jouit de la plus haute teneur en polyphénols et en flavonoïdes alors que le miel de nectar (NH) présente la plus faible teneur. Le contenu phénolique du miel dépend de l'origine géographique et botanique. Les Miels sombres contiennent une teneur plus élevée en polyphénols que les miels de couleur claire (Blasa et al, 2006 ; Bertonceli et al, 2007).En raison de ses qualités médicinales et nutritives différentes de celles du miel de nectar, le miel de miellat suscite un intérêt croissant (Castro-Vazquez et al., 2006 ; Madejczyk et Baralkiewicz, 2008).

Cependant si les polyphénols tiennent une large dans l'activité anti-oxydante du miel, ils n'en sont pas les seuls responsables, un large nombre de composés agissent en synergie (Gheldof et al, 2002 ; Nada, 2009 ; Muhammad et al., 2015).

Nos résultats sont conformes à ceux de Khallil et al. (2012) qui a révélé un niveau élevé de polyphénols et de flavonoïdes dans les miels algériens étudiés, ce qui indique en outre leur potentiel anti-oxydant élevé. En sus des composés phénoliques, la proline et la vit C ont également été détectées à des concentrations élevées dans l'ensemble des échantillons de miels Algériens testés. Les auteurs émirent l'hypothèse que la teneur en proline totale pourrait être un facteur critique responsable de l'activité anti-oxydante des miels algériens.

Au milieu des années 50, parmi les premiers, Gerschman montre que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme (Gerschman et al., 2001).

Inspiré par ces travaux, Harman propose la «free radical theory of ageing» (Harman, 1956), via la production de radicaux libres, l'oxygène est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire. En 1969, date clé dans l'histoire du stress oxydant, les Américains Mc Cord et Fridovich. (1969)

isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique anti-oxydant: la SOD qui élimine  $O_2^{\cdot-}$  produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que des radicaux libres sont produits dans notre organisme. Ceci est alors le point de départ d'un nombre farouche de recherches sur les sources de production de  $O_2^{\cdot-}$  et sur ses rôles pathologique et physiologique.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité anti-oxydante par piégeage de radicaux différents. Cependant compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des anti-oxydants, il n'y a pas de méthode standard par laquelle l'activité anti-oxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner des tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité anti-oxydante de l'échantillon à tester (Tabart et al., 2009 ; Hua Li et al., 2008).

Pendant très longtemps, des doutes ont été émis quant à l'existence réelle des radicaux libres et sur leurs effets *in vivo*. Tout au début des années 1990, cette incertitude est levée de façon irréfutable grâce à l'utilisation de la technique de la résonance paramagnétique électronique (RPE) associée au spin trapping ("piégeur de spin") dans des modèles de stress oxydant *in vivo*.

## **1. Etude par résonance paramagnétique électronique**

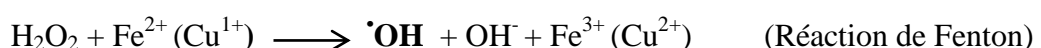
### **1.1. Effet des différents types de miels sur le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton**

A travers sa catalyse de la formation de radicaux libres à partir de  $H_2O_2$  via la réaction de Fenton, le fer en excès est estimé être à l'origine de stress oxydatif, ainsi que dans l'induction et l'amplification des réactions de peroxydation lipidiques, aboutissant à un dommage oxydatif étendu des biomolécules (Kakhlon et Cabantchik, 2002).

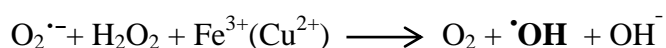
Chimiquement,  $\cdot OH$  peut être généré par la réaction entre le  $Fe^{2+}$  libre et le  $H_2O_2$ , c'est ce qu'on appelle la réaction de Fenton. En général, le fer est un métal essentiel nécessaire pour les fonctions biologiques des organismes vivants telles que l'activité enzymatique (Machlin et Bendich, 1987) et le système de transport d'électrons (Pietrangelo 2002). Chez les humains et les animaux, le fer est

responsable du transport de l'oxygène sous forme d'hémoglobine, de myoglobine et d'hémérythrine. Le fer possède une forte affinité pour les dérivés de l'oxygène (Aisen, 2007). Dans les environnements biologiques, les dérivés de l'O<sub>2</sub> existent sous diverses formes telles que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ce dernier produit dans les mitochondries (Lenaz et al., 2002) ou lors de la l'explosion oxydative (Gougerot-Pocidalò, 2002), et est connu comme un radical oxygéné faiblement réactif (Fridovich, 1995). D'autre part, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est également faiblement réactif, mais ayant la capacité de traverser les membranes cellulaires (Halliwell et al., 2000). Le fer a la capacité de convertir ces dérivées de l'O<sub>2</sub> en **•OH**, qui est connu comme étant le plus réactif des EROs. Sa rapidité d'action et sa réactivité non spécifique le rendent particulièrement dangereux. La réactivité des radicaux **•OH** est si grande que, s'ils sont formés dans les systèmes vivants, ils vont réagir immédiatement à tout ce qui est biomolécules dans leur voisinage, produisant des radicaux secondaires de réactivité variable (Halliwell et Gutteridge, 1992). Sa capacité à abstraire un atome d'hydrogène des lipides membranaires (Agil et al., 1995) peut causer des lésions aux cellules ou leur mort. **•OH** est considéré comme un agent étiologique de plusieurs maladies, telles que la maladie d'Alzheimer (Bartzokis et al., 2004), la maladie de Parkinson (Whitnall et Richardson, 2006), l'athérosclérose (De Valk et Marx, 1999), les maladies cardiovasculaires (Cai et Harrison, 2000) et le cancer (Halliwell, 2007). Il peut également être impliqué dans le vieillissement naturel (Altamura et Muckenthaler, 2009).

Dans la réaction de Fenton, La formation de **•OH** est régie uniquement par l'existence dans l'environnement cellulaire de fer libre en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Il est intéressant de noter que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lui-même ne provoque pas la peroxydation lipidique. Dans la réaction de Fenton, l'ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>) agit en tant que catalyseur.



La réaction Haber-Weiss est une autre source de la formation **•OH**.



Dans la réaction Haber-Weiss, les ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (la forme oxydée du fer formé dans la réaction de Fenton) sont réduits à nouveau en ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) qui réagissent ainsi avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour produire  $\cdot\text{OH}$  (réaction de Fenton). Ce recyclage du fer d'un état de valence à l'autre provoque la formation répétitive de  $\cdot\text{OH}$  (Kell, 2009).

L'état redox de la cellule est maintenu dans de strictes limites physiologiques (Prousek, 2007), de par la disponibilité négligeable du fer libre due à sa séquestration efficace par différentes protéines. Les protéines telles que la transferrine (protéine de transport du fer) et la ferritine (protéine de stockage du fer) sont importantes pour empêcher le fer de subir une réaction d'oxydo-réduction incontrôlée. Pour la prévention endogène de formation de radicaux libres, le corps a des enzymes telles que la catalase pour détruire  $\text{H}_2\text{O}_2$  et la SOD pour neutraliser  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Kakhlon et Cabantchik, 2002). Il y a plusieurs conditions où le statut du fer peut changer conduisant à la formation de radicaux libre à l'origine de dommages cellulaires.

Les maladies héréditaires telles que l'hémochromatose (le fer n'est pas lié à la transferrine dans le sérum) et la thalassémie (maladie associée à l'anomalie de l'hémoglobine, qui nécessite des transfusions sanguines régulières) ont été signalés à l'origine d'une accumulation de fer libre dans l'organisme. (Lim, 2000; Puntarulo, 2005; Van Campenhout et al., 2006).

La catalase peut être inhibée par  $\text{O}_2^{\cdot-}$  formé par la réaction de la xanthine oxydase (Kono et Fridovich, 1982). La xanthine oxydase est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Dans les deux étapes, l'oxygène moléculaire est réduit, formant  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dans la première étape et  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la seconde. Ce qui augmenterait la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et dans la cellule. Comme mentionné précédemment,  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut pénétrer les membranes cellulaires, ce qui le rend plus facilement accessibles dans les cellules, il peut donc libérer le fer en dégradant les protéines de l'hème (Gutteridge, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999b).

Le fer de la ferritine et de la transferrine peut être également libéré par  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Biemond et al., 1984; Thomas et al., 1985). Il a été rapporté que le NADH (un agent réducteur) pourrait aussi faciliter la libération du fer de la ferritine (Stohs et Bagchi, 1995).

les facteurs extrinsèques qui peuvent contribuer à la génération de radicaux libres chez l'homme en raison de la peroxydation des lipides tels que l'environnement pollué [Les émissions de dioxyde de carbone, les polluants industriels, la fumée de cigarette (fumeur passif) et l'exposition au rayonnement UV] (Dellinger et al., 2001), ainsi que mode de vie (stress, traumatismes, consommation excessive d'alcool et de viande rouge, les aliments frits, les aliments transformés fortifiés en fer et l'exercice excessif) (Powers et al., 2004).

Il est bien établi que le miel est un agent antibactérien efficace avec un large spectre d'action contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Lusby et al., 2002; Irish et al., 2011). En dépit de l'identification de bons nombres de composés du miel impliqués dans l'inhibition de la croissance bactérienne et l'action bactéricide, le mécanisme qui sous-tend ces activités reste encore irrésolu. La relation fonctionnelle existante entre l'activité antibactérienne du miel et le peroxyde d'hydrogène qui y est produit, laisse fortement entendre que ce dernier est le principal contributeur de cette activité (White et al., 1963; Bang et al., 2003; Brudzynski, 2006). Cependant, les récentes découvertes remettent en question ce point de vue.

Tout d'abord, le  $H_2O_2$  moléculaire est relativement un faible oxydant et n'exerce d'effet cytotoxique qu'à des concentrations élevées (Rutala et al, 2008; Finnegan et al, 2010). La teneur en  $H_2O_2$  dans les miels, est bien en-dessous de ses niveaux biocides. Pourtant, même à ces faibles concentrations de  $H_2O_2$ , le miel inhibe efficacement la croissance bactérienne et cause la rupture des brins d'ADN. Il est clair que le stress oxydatif du  $H_2O_2$  endogène est augmentée par l'action de composants inconnus du miel (Brudzynski et al., 2011).

Selon Mason et al. (1994), comme la réaction de Fenton nécessite du  $H_2O_2$  toute substance susceptible d'augmenter le  $H_2O_2$  dans la solution réactionnelle augmente le signal RPE. Cela ne semble pas être le cas du miel. En effet, selon Bang et al. (2003) le quantité de  $H_2O_2$  augmente avec la dilution du miel jusqu'à un maximum compris entre 30% et 50% puis décroît.

Enfin, il a été fourni la preuve que les miels de haute activité bactériostatique possèdent des niveaux significativement plus élevés de polyphénols avec un potentiel de piégeage des radicaux libres plus élevé que les miels à activité bactériostatique basse, suggérant ainsi l'implication des

polyphénols et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'inhibition de la croissance bactérienne (Brudzynski et al., 2012). Beaucoup d'auteurs s'accordent à dire que cette propriété serait le fait des espèces réactives de l'oxygène, et en particulier  $\cdot\text{OH}$  (McCarthy, 1995; Molan, 1992 ; Henriques et al., 2006), mais pour d'autres chercheurs, ce serait en partie largement due aux polyphénols (Russell et al., 1990 ; Weston et al., 2000 ; Isla., 2011). D'un autre côté, le miel est également connu pour ses propriétés oxydantes.

Le miel est naturellement enrichie en métaux de transition tels que Fe (II) ou Cu (II) et produit son propre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bogdanov et al., 2007), remplissant ainsi les conditions pour que la réaction de Fenton puisse se produire.

Quelques approches différentes ont été prises pour mesurer l'activité de fixation de du fer.

Toutefois, il convient de garder à l'esprit que toutes les substances fixant le fer ne donnent pas lieu à l'inhibition de la réaction de Fenton. En effet, certains chélateurs du fer après fixation de ce dernier, sont encore capables de catalyser la réaction de Fenton (Devanur et al., 2008).

La RPE est la seule méthode précise qui peut fournir une preuve directe de la présence d'un radical libre. En outre, l'analyse du spectre RPE permet généralement la détermination de l'identité du radical libre (Mason, 1994).

Nous avons produit le  $\cdot\text{OH}$  avec un système de Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / FeSO<sub>4</sub>) L'adduit DMPO-OH comporte un signal majoritaire sous forme de quadruplet d'intensité 1:2:2:1. Les paramètres des spectres RPE sont rapportés dans la figure 11.

Dans la figure 11 : 1a et 1 b spectre 1 montre le spectre RPE typique obtenu par piégeage de  $\cdot\text{OH}$  par le DMPO (témoin positif). Lors de l'ajout du miel mixte et du miel de nectar (2% p/v) à la réaction, les caractéristiques du spectre changent radicalement (fig 11 : le spectre 1 et 2), résultant en un spectre composite, où il est à noter en particulier, un bond dans l'amplitude du signal de  $\cdot\text{OH}$  (signet Ø) ainsi qu'à l'apparition d'un second signal (signet \*) dont nous discuterons en dernier. Très peu d'études ont été réalisées sur l'effet du miel sur  $\cdot\text{OH}$ . Nos résultats sont en accord avec ceux de Henriques et al (2006), Alvarez et al.(2010) ainsi que ceux de Brudzynski et Lannigan (2012), avec cependant un certain nombre de différences :



En utilisant le 3- (p-aminophényl) fluorescéine (APF)  $\cdot\text{OH}$  trap technique, Brudzynski et Lannigan (2012) ont montré que la génération de  $\cdot\text{OH}$  à partir du peroxyde d'hydrogène du miel provoque l'inhibition de la croissance des isolats cliniques de *S. aureus* résistants à la methicilline et d'entérocoques résistants à la vancomycine, ainsi que la croissance de bactéries standard telles que *E. coli*, et *B. subtilis*. Il serait important de préciser que dans cette dernière étude, il n'y a pas eu ajout de fer externe et il semblerait que le fer utilisé dans la réaction de Fenton soit le fer intrinsèque du miel. D'un autre côté, Henriques et al (2006), en utilisant la résonance paramagnétique électronique ont constaté que le fer du miel à lui seul est insuffisant pour générer  $\cdot\text{OH}$  et qu'un apport extérieur de fer est nécessaire. Cependant, il est également utile de noter que ces auteurs ont travaillé en cell free-system et qu'il n'y a pas eu d'ajout de bactéries. Cette différence serait-elle due à la différence des conditions expérimentales, à celle de l'origine botanique et géographique des miels utilisés, à une certaines interactions avec les composés bactériens ? A l'état actuel des connaissances on serait en mal de répondre à une telle question. Il serait utile de signaler que l'activité anti tumoral du miel serai due en partie à  $\cdot\text{OH}$  libéré par la réaction de Fenton (Lopez-Lazaro, 2007).

La figure 11 ; la spectre 2 montre que lors de l'incorporation de 5% (p/v) de NH dans la réaction de Fenton l'amplitude du signal de  $\cdot\text{OH}$  (signet  $\emptyset$ ) diminue très légèrement par rapport à celui, lors de l'incorporation de 2% (p/v) NH, quoique toujours plus élevé par rapport au témoin. Avec 10% (p/v) de NH cette amplitude diminue légèrement en deçà du témoin, mais avec une nette augmentation de l'amplitude du deuxième signal (signet :\*). Ces résultats sont en désaccord avec ceux de brudzinsky et lannigan (2012) qui ont trouvé qu'il y avait une relation linéaire entre la dilution du miel et l'augmentation des concentrations en  $\cdot\text{OH}$ .

L'addition de HH à la concentration de 2%, entraine l'apparition d'un spectre RPE complexe dans lequel le quadruplet du spectre RPE du DMPO-OH adduit était moins intense que dans la figure 11:1b spectre2. A des concentrations plus hautes de HH (5 and 10 % w/v), les lignes correspondant au adduit DMPO-OH ont été fortement réduites (figure 10 :1b : spectre 3), voire même quasi

totallement disparues à la concentration de 10% (p/v) (figure 11 :1b : spectre 4). En revanche, le second signal RPE augmente de façon spectaculaire.

Au vu des résultats de la réaction de fenton, l'explication la plus logique serait la suivante :

Selon (Mizrahi et Lensky, 1997; Koshio et al. 1988, Zhou et al., 2012 ; Habib et al., 2014) le miel aurait un effet chélateur et désactivateur du fer libre qui autrement catalyserait la formation de radicaux libres à partir du peroxyde d'hydrogène, et prévenant les dommages causés à l'ADN (Zhou et al., 2012 ; Habib et al., 2014).

Cet effet chélateur a été attribué aux polyphénols (Weston, 2000).L'augmentation des concentrations des différents miels testés va de pair avec celles en polyphénols dans le milieu en fonction de la teneur de chaque miel en ces derniers. Et comme le miel clair (NH) et celui de couleur intermédiaire MH contiennent moins de polyphénols que celui de miellat HH (tableau 3). Pour ce dernier le fer libre peut être chélaté par les polyphénols conduisant ainsi à l'interruption de la réaction de Fenton résultant ainsi en une diminution significative de l'intensité du signal RPE de DMPO-OH ( $\emptyset$ ) et une accumulation marquée du deuxième signal (signet :\*) par rapport à NH et MH comme le montre la fig 10 :1b. 1c (spectres 2 et 3 et 4). Branguolo et Molan. (2010) ont montré que le miel de miellat de hêtre avait une activité chélatrice du fer exceptionnellement élevée.

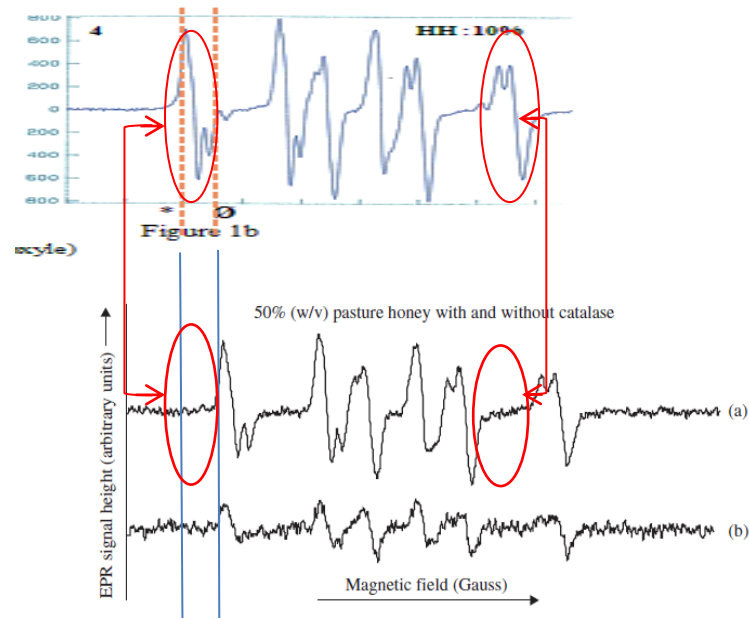
Selon Henriques et al (2006) et Alvarez et al.(2010),les espèces additionnelles non identifiées du spectre RPE pourraient résulter de réactions secondaires impliquant des radicaux libres et des composants organiques de miel. L'activité bactéricide du miel pourrait être due à  $\cdot\text{OH}$  et éventuellement, à ces radicaux organiques secondaires. les propriétés antibactériennes du miel résulteraient donc d'un équilibre entre deux activités opposées : la production de radicaux et leur piégeage (Henriques et al.,2006).

Cependant, examinons avec soin le spectre RPE reporté dur l'article de Henriqués et al (2006) et comparons le avec le nôtre :

Il faut noter que dans cet article :

- l'axe des abscisses n'est pas reporté sur le spectre donc on ne peut guère juger les raies en fonction du champ magnétique

- l'axe des ordonnées manque également donc on ne peut également juger de l'amplitude par rapport au témoin
- Il est à noter également la presque quasi similitude des spectres.



Vu la ressemblance avec notre spectre, on pense que le miel de pâturage « pasture honey » dont il est question dans l'article d'Henriques et al (2006) a également piégé le radical hydroxyle.

La différence de concentration HH (1%) Vs pasture honey (50%) pourrait être due au fait que notre miel de miellat est plus riche en polyphénols.

Nous avons l'intime conviction – quoiqu'une telle assertion mérite d'être vérifiée dans le futur- Que le deuxième signal offre les caractéristiques d'un spin adduit DMPO-OOH, reflétant la génération  $O_2^{\cdot-}$ . Donc les variations dans l'intensité des signaux RPE pourraient s'expliquer par le fait que nous serions en présence d'une réaction de Fenton catalysée par une réaction d'Haber-Weiss. Le deuxième signal (signet :\*) ne serait autre que  $O_2^{\cdot-}$ .

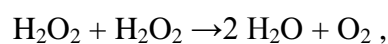
Mais comment  $O_2^{\cdot-}$  pourrait-il être généré en un simple cell free-system ? Bekairi et al (1994) ont obtenu la preuve que cela est possible en présence de glucose et de glucose oxydase et en fonction de leurs concentrations respectives. . En effet, il est bien établi depuis le début des années soixante que le miel contient l'enzyme glucose oxydase, qui catalyse la formation du peroxyde d'hydrogène suite à la dilution du miel. Le miel est également composé de 31% de glucose (White, 1975). En regard de cette production de  $O_2^{\cdot-}$ , nos résultats sont en accord avec ceux de Al-Bekairi et ses

collègues, même si Liochev et Fridovich, 1995) n'ont pas trouvé de quantité mesurable de  $O_2^{\cdot-}$ . Cette dernière conclusion est la plus vraisemblable, y a-t-il une contamination quelconque du cell-free system lors de l'étude de Bekairi et ses collègues ? Le miel étant un composé provenant en partie de l'abeille et en partie des plantes, pourrait-il offrir les conditions adéquates à la génération de  $O_2^{\cdot-}$  ? Ce point mériterait d'être creusé en profondeur. Si une telle supposition venait à se vérifier, cela pourrait expliquer certains mécanismes du mode d'action du miel encore restés dans l'ombre.

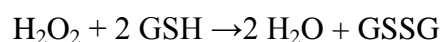
Quoi qu'il en soit, dans les conditions physiopathologiques et selon Kesić et al. (2014), le miel contenant du fer, du cuivre et de la vit C, offre toutes les conditions nécessaires pour que la réaction d'Haber-Weiss puisse s'y produire.

## 1.2. Effet du miel sur la déplétion du GSH

$H_2O_2$  est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau



Tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion par l'eau oxygénée



L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action de molécules dites anti-oxydantes. Celles-ci ont pour rôle d'empêcher les  $ERO_S$  d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique. Il est habituel de dire qu'un bon anti-oxydant est un bon « capteur » de radicaux libres. Toutefois, cette condition n'est pas suffisante ; il faut en outre que l'anti-oxydant soit régénéré (recyclé) *in vivo* de manière à jouer plusieurs fois son rôle. Parmi les anti-oxydants non enzymatiques se trouvent les thiols (fonction SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le GSH (Halliwell et Gutteridge, 1999)

Le GSH est un anti-oxydant intracellulaire qui représente plus de 90% des thiols intracellulaires non protéiques (Baruchel et al., 1994). Il est communément considéré comme un capteur universel de radicaux libres et principal anti-oxydant intracellulaire (Borisenko et al., 2004). Dans des études *in vivo*, il a été trouvé que le miel maintient ou améliore le niveau de substances sulfhydryles non protéiques comme le GSH (Al Swayeh et Ali, 1998) des observations similaires ont été faites par Korkmaz et al. (2009) et Galal et al. (2012). Selon Beretta et al. (2007), les composants du miel permettent d'épargner ou de régénérer le GSH de l'endothélium. En accord avec ce qui précède, il ressort de nos résultats que à 5% (p / v) les trois types de miel préviennent la déplétion du GSH (figure 12 : 2b).

Alors que des stratégies ont été développées pour augmenter les niveaux de glutathion afin d'augmenter les défenses cellulaires et leur résistance à la toxicité, des stratégies visant la déplétion du GSH ont été développées ayant pour but d'augmenter la sensibilité des tumeurs et certains parasites aux radiations, aux médicaments ou aux mécanismes endogènes de mise à mort (Ortega et al., 2011). L'apoptose est un processus homéostatique conservé critique pour la morphogenèse des organes et des tissus, le développement, et la sénescence. Cette forme de mort cellulaire programmée participe également à l'étiologie de plusieurs maladies humaines comme le cancer, les maladies neurodégénératives et les troubles auto-immuns. Bien que les études initiales aient suggéré que la diminution du glutathion n'était qu'un sous-produit du stress oxydatif généré lors de la mort cellulaire, des découvertes récentes suggèrent que la diminution du glutathion joue un rôle critique en tant que régulateur de l'apoptose (Franco et Cidlowski, 2009).

Selon Jaganathan et Mandal. (2010), le miel à une faible concentration (3% et 4% v / v) induit l'apoptose des cellules cancéreuses HCT-15 et HT-29 du cancer du côlon et les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) respectivement, en provoquant la déplétion des thiols non protéiques intracellulaires telles que le GSH, et en augmentant la génération des espèces réactives oxygénées (EROS). Conformément à ces résultats, nous avons également montré dans la présente étude que le miel à de faibles concentrations provoque une déplétion du GSH et augmente la génération des ERO<sub>s</sub> (fig12 : 2c).

## **2. Inhibition de la production du radical superoxyde par les neutrophiles stimulés avec le PMA**

Le site inflammatoire comprend de nombreuses cellules inflammatoires qui libèrent beaucoup de médiateurs chimiques, susceptibles d'être pro- ou anti- inflammatoires. Les EROS libérés par les neutrophiles et les monocytes au cours du métabolisme oxydant pour leur activité microbicide représentent l'un des médiateurs les plus importants impliqués dans l'inflammation (Russo-Marie et al., 1998). Lorsque la production des EROs est contrôlée, l'agent infectieux est détruit et l'intégrité cellulaire est préservée. Toutefois, lorsque cette production devient excessive, il s'ensuit une exacerbation des réactions d'oxydation qui peuvent devenir cytotoxiques pour les cellules productrices elles-mêmes et les cellules voisines (Russo-Marie et al., 1998). Les EROs sont à l'origine de plusieurs pathologies telles que le vieillissement, les cancers et les maladies inflammatoires chroniques (Parke et Parke, 1995 ; Wright et al., 2010).  $O_2^{\cdot-}$  est la première espèce réactive oxygénée formée par la NADPH-oxydase dans les systèmes biologiques ; il est à l'origine de la formation des autres espèces radicalaires et non radicalaires (Van Dyke et al., 2003).

Le PMA a été utilisé pour activer les neutrophile ; ce composé a été choisi sur la base des résultats d'études antérieures, portant sur la production des EROS et la dégranulation aussi bien par les neutrophiles humains qu'équins (Paula et al., 2009; Franck et al., 2009). Le PMA stimule la NADPH oxydase via une activation de la PKC qui est un récepteur des esters de phorbol alors que d'autres stimuli tels que le peptide bactérien N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) se fixent sur des récepteurs membranaires déclenchant des réponses intracellulaires qui impliquent des phospholipases et des kinases (Burg et Pilliger, 2001 ; Franck et al., 2009 ; Paula et al., 2009).

La production des EROs a été suivie par la chimiluminescence en présence de la lucigénine, composé connu pour interagir spécifiquement avec  $O_2^{\cdot-}$  (Van Dyke et al., 2003, Vladimirov et Proskurnina, 2009). Les résultats présentés sur la figure 13, montrent que les trois types de miels inhibent de manière dose-dépendante la production de  $O_2^{\cdot-}$ .

Nos résultats sont en accord avec ceux d'études antérieures. Leong et al. (2011) ont reporté que le miel montre une forte et dose dépendante inhibition de  $O_2^{\cdot-}$  produit in vitro par les PMNs humains

activés. En utilisant le système de xanthine-xanthine oxydase, D'autres groupes ont également décrit une activité scavenger du miel sur  $O_2^{\cdot-}$  (Henriques et al., 2006; Van den Berg et al., 2008).

Dans notre étude, Le meilleur effet inhibiteur observé avec le miel HH pourrait être corrélé avec sa forte teneur en composés polyphénoliques (Tableau 3). Il est généralement admis que les miels sombres possèdent un potentiel anti-oxydant supérieures à celui des miels clairs (Frankel et al., 1998;. Taormina et al, 2001;. Socha et al, 2009). Plus sombre est le miel, plus élevé est le contenu phénolique et son pouvoir anti-oxydant (Gheldof et al., 2002; Blasa et al., 2006; Bertonceli et al, 2007;. Vela et al, 2007). Il a également été montré que, miels de miellat possèdent des capacités anti-oxydantes plus élevés que ceux de nectar (Vela et al, 2007; Lachman et al., 2010).

Une activité antioxydante des miels a été attribué à l'inhibition de la formation des EROS, soit par inhibition de l'explosion oxydative des PMNs ou par piégeage direct des EROS (Henriques et al., 2006). Fait intéressant, une réduction dose-dépendante de la production de  $O_2^{\cdot-}$  par les neutrophiles humains par le miel n'a pas de corrélation avec les niveaux de composés phénoliques connus comme piègeurs de radicaux libres (Leong et al., 2012). Cette observation indique que l'activité antioxydante du miel est probablement causée par l'inhibition de l'explosion oxydative des PMNs (Majtan, 2014).

Quoique d'une façon générale le miel HH le plus riche en composés phénoliques (tableau 3) présente le meilleur effet sur l'inhibition de la libération l' $O_2^{\cdot-}$ , on constate d'après la figure13, que cette tendance tend à s'inverser. A la concentration de 20% malgré qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative on constate d'après les colonnes que le miel NH le moins doté en composés phénoliques a un effet légèrement supérieur. A la lumière de ce qui précède on pourrait formuler l'hypothèse que indépendamment de leurs teneurs en composés phénoliques, nos miel agiraient par inhibition de l'explosion oxydative des PMNs. La teneur en composés phénoliques présent dans le miels n'est pas toujours positivement proportionnelle à son activité antioxydante (gueldof et al., 2002; Al-Mamary et al., 2002; Küçük et al., 2007). Autre fait, mais peu probable, est que cet effet dépend de la nature des composés phénoliques de chaque miel.

D'autre part, nous savons que lors de l'activation des neutrophiles, il y a une subséquente libération de MPO. En présence de superoxyde dismutase (SOD) et de  $O_2^{\bullet-}$ , on obtient le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui est le substrat de la MPO. Comme nos échantillons de miel ont été efficaces envers la production de  $O_2^{\bullet-}$ , il nous est apparu donc intéressant d'évaluer leur effet supposé sur l'activité de l'enzyme MPO.

### **3. Effet du miel sur libération de la myéloperoxydase par les neutrophiles activés au PMA**

Le neutrophile, recruté sur le site inflammatoire, est un granulocyte caractérisé par la présence de nombreux granules regroupés en quatre types selon leur contenu. Les granules primaires, parmi les mieux caractérisés, contiennent spécifiquement des hydrolases acides, des protéases neutres comme l'élastase, de la MPO et des défensines (Russo-Marie et al., 1998 ; Abdel-Latif et al., 2005). Ces granules libèrent leur contenu essentiellement dans le phagolysosome pour détruire les particules phagocytées (Russo-Marie et al., 1998 ; Abdel-Latif et al., 2005 ; Cowburn et al., 2008). La libération importante de la MPO, hors du phagosome, est le signe d'une activation excessive ou la mort du neutrophile. Les neutrophiles hyperactivés sont impliqués dans le développement de plusieurs processus inflammatoires aigus et chroniques comme le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'asthme, l'artériosclérose et la polyarthrite rhumatoïde (Serteyn et al., 2003 ; Selloum et al., 2004 ; Abdel-Latif et al., 2005 ; Cowburn et al., 2008). Aussi, est-il nécessaire de trouver des molécules capables de moduler la dégranulation des neutrophiles. A cet effet, nous avons testé nos échantillons de miels sur la libération de la MPO en utilisant un test ELISA de type « sandwich ».

Le processus de dégranulation dépend de plusieurs facteurs comme le cytosquelette d'actine, le taux de calcium intracellulaire et la voie de signalisation de la PKC (Abdel-Latif et al., 2005 ; Jog et al., 2005). Des études antérieures ont montré qu'une désorganisation du réseau d'actine peut activer ou inhiber la dégranulation (Jog et al., 2005). Dans le cas des granules azurophiles, il a été montré que le cytosquelette d'actine inhibe la dégranulation en empêchant leur fusion avec la membrane plasmique aussi bien dans les conditions normales que de stimulation afin de prévenir la libération des enzymes destructrices comme la MPO (Jog et al., 2005). L'élévation du taux de calcium intracellulaire régule le processus de dégranulation dans lequel les granules azurophiles sont les



derniers excrétés (Borregaard et Cowland, 1997). Le calcium a de multiples sites d'action comme les protéines du réseau d'actine ou de la PKC (Russo-Marie et al., 1998).

Très peu d'études ont été menées sur l'effet du miel sur la MPO. Mais comme c'est le cas pour la déplétion du GSH, à notre connaissance, il n'existe pas de données publiées sur l'effet de miel sur la libération de MPO par les PMNs activés. De manière surprenante, à l'exception de MH à 5% les trois types de miel à 2% et 5% ont augmenté de manière significative la MPO totale libérée dans le milieu extracellulaire par les PMNs activés (figure 14). Cependant, il est à signaler que lors de sa sortie à partir de neutrophiles, l'enzyme devient inactive très fréquemment dans le microenvironnement tissulaire. Par conséquent, tant la MPO enzymatiquement active qu'enzymatiquement inactive MPO sont présentes sur les sites inflammatoires (Kumar, 2010)

Cependant, la MPO peut agir en tant que stimulateur autocrine ou paracrine des PMNs. Cette propriété est indépendante de son activité catalytique, et se produit par modulation des voies de signalisation intracellulaires des PMN par liaison aux intégrines CD11b\_CD18, provoquant ainsi la dégranulation, l'expression des intégrines, et une activation de la NADPH oxydase (Lau et al., 2005). Récemment il a été également mis en évidence, que la MPO indépendamment de son activité catalytique interviendrait dans le recrutement des PMNs par simple force électrostatique (Klinke et al., 2011).

Selon Miyagawa et al. (2010) et Fukuda et al. (2011), le miel à une concentration de 1% a une action chimiotactique sur les neutrophiles activés, cette action diminue avec des concentrations plus hautes.

Selon Papineni et Orton (2012) après administration intrapéritonéale d'une dose unique de miel 0,1 ml (50% v / v) à des souris nues athymiques, une augmentation significative de l'activité de la MPO a été observée dans les 3 heures - probablement après que le miel ait été très diluée par les fluides corporels - avec une sensible activation des PMN dans les différents ganglions lymphatiques.

Selon Lau et al. (2005) indépendamment de son action catalytique la MPO exerce une fonction d'activation des leucocytes, un événement qui rappelle d'autres cytokines pro-inflammatoires

dérivés des PMNs tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-8. De nombreuses données montrent que la dégranulation des neutrophiles et notamment la libération de la myéloperoxydase, la cathepsine G, ou LL37 active la phagocytose des macrophages et leur production de dérivés oxygénés (Silva, 2010; Soehnlein et al., 2009). En contrepartie, les macrophages allongent la durée de vie des neutrophiles recrutés via la sécrétion d'IL1 $\beta$ , de TNF $\alpha$  et de GM-CSF (Silva, 2010). Enfin, quelques données In vitro suggèrent également que les macrophages infectés par certains pathogènes voient leur capacité antimicrobienne augmentée lorsque la MPO des neutrophiles leur est fournie (Silva, 2010).

En 2004, l'équipe de Brinkmann et Zychlinsky, de l'Institut Max Planck de biologie des infections de Berlin, a découvert que les neutrophiles, en réponse à une variété de stimuli, émettent en outre dans le milieu extracellulaire des filaments composés d'ADN et d'histones (protéines associées à l'ADN dans le noyau cellulaire sous forme de chromatine). Ces filaments de 15 nanomètres de diamètre forment un filet, ou NET (*neutrophil extracellular trap*, net = filet en anglais), qui piège et détruit les microbes. Ces « filets » fournissent un squelette pour la fixation d'un réseau de protéines. La plupart de ces protéines proviennent de granules des neutrophiles et comprennent MPO, l'élastase, et des peptides antimicrobiens (Urban et al., 2009).

Ces filets ou NETs peuvent être induits par une variété de médiateurs inflammatoires, comprenant le PMA activateur de la PKC, l'IL8, le plasma de malades atteints de sepsie, les plaquettes activées par les endotoxines... (Fuchs et al., 2007; Brinkmann et al., 2004; Brinkmann et al., 2007; Kessenbrock et al., 2009), et les pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* (Urban et al., 2006; Fuchs et al., 2007, Ramos-Kichik et al., 2009; McCormick et al., 2010). Cependant, certaines bactéries contiennent des nucléases qui digèrent ces NETs, les rendant ainsi aptes à échapper à cet emprisonnement (Buchanan et al., 2006; Beiter et al., 2006; Walker et al., 2007; Walker et al., 2010). Donc les NETs apparaissent comme une seconde ligne de défense antimicrobienne des neutrophils supplémentant l'activité phagocytaire (Brinkmann, et Zychlinsky, 2007; Wartha et al 2007).

Cependant les NETs ne seraient pas toujours bénéfiques. Ils ont été détecté *in-vivo* dans bon nombre de maladies inflammatoires (Gupta et al., 2007 ), comprenant les sepsies (Clark et al., 2007), les maladies auto-immunes (Kessenbrock et al., 2009 ; Hakkim et al., 2010), les pneumonies (Narasaraju et al., 2011), et peuvent contribuer aux complications des maladies associées à un dérèglement immunitaire (Parker et al.,2012). A notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur l'effet du miel sur ces mécanismes de piégeage extracellulaire par les PMNs. Nous n'avons donc aucun critère pour postuler si cette libération de la MPO par le miel est due à une nécrose ou à une NETose

#### **4. Effet du miel sur l'activité de la MPO (technique SIEFED)**

Très peu d'études ont été réalisées en ce qui concerne l'effet du miel sur l'activité de la MPO Medhi et al. (2008) ont rapporté que le miel a la capacité de réduire le niveau de la MPO lors de colite ulcéraire induite chez des rats Il a été également montré que le miel diminuait la chemiluminescence due au luminol dans le sang total activé au zymosan ainsi que dans les leucocytes activés (Mesaik et al., 2008). Dans ces études MPO a été étudiée comme un marqueur de l'infiltration des neutrophiles ou leur stimulation.

Cependant, selon la bibliographie disponible, aucun travail n'a été effectué sur l'effet direct du miel sur l'activité de la MPO. On peut considérer que notre étude est la première du genre.

Le présent travail a porté sur l'effet du miel sur l'activité spécifique du MPO à travers son site actif. L'activité catalytique de la MPO est partagé entre l'halogénéation et la peroxydation via la compétition entre les substrats du cycle peroxydasique et les (pseudos) halogénures pour le composé I. Cette compétition est impliquée dans la modulation de l'activité enzymatique de la MPO (Davies, 2011). De plus, les variations dans la valeur du pH peuvent changer la priorité de l'enzyme par rapport à un substrat. A pH acide, la MPO va catalyser préférentiellement la formation du HOCl via son cycle de chloration, tandis qu'à pH neutre l'oxydation des substrats phénoliques peuvent être observés via le cycle peroxydasique de la MPO (Vlasova et al., 2006).

La technique SIEFED que nous avons utilisé permet l'étude du cycle peroxydasique de l'enzyme. Les anions chlorures sont absent de la solution de révélation, donc le HOCl ne peut être généré par

l'activité de la MPO, et donc ne peut réagir avec le miel. En outre, par l'immunocapture de la MPO, le SIEFED permet d'éliminer toutes substances interférentes non fixées par les anticorps avant la mesure de l'activité de la MPO.

Donc, la solution libre de miel, (composé(s) non fixé à la MPO), après l'incubation avec l'enzyme est éliminée avant la détection de l'activité de l'enzyme. Si une inhibition de l'enzyme est observée après l'élimination du miel, cela voudrait dire que certaine(s) molécule(s) est/sont fixée(s) sur la MPO et inhibe son activité peroxydasique.

Les trois miels aux trois dilutions testées ont entraîné une inhibition de l'activité de l'enzyme excepté pour MH à la plus basse dilution. Certaine(s) molécule(s) trouvée(s) dans les miels peuvent interagir avec ou se lier à la MPO et donc, soit modifier la structure de l'enzyme ou entraver l'accès du substrat au site actif et agissant comme substrat(s) compétitif(s).

Il a été montré que le site actif de l'enzyme est localisé à la base d'une poche hydrophobe, étroite et profonde, qui ne permet l'accès qu'aux substrats de faible poids moléculaire (Podrez et al., 2000 ; Fiedler et al., 2000). Les polyphénols ou d'autres composés de miel pourraient masquer ou bloquer l'accès à cette cavité.

Jiao et al. (2006) ont montré que les curcuminoïdes pourraient agir comme des chélateurs du fer, et nous ne pouvons pas exclure qu'une telle activité de chélation pourrait être également possible avec certains composants de miel. D'autres études sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Cependant, il a été montré que la deferoxamine, puissant chélateur du fer, On m'a montré que le chélateur de fer puissant, déféroxamine, ne réagit avec, ni n'élimine le fer de la MPO (Klebanoff et Waltersdorff, 1988).

Etonnement, le miel HH le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes, a montré à basse dilution une forte inhibition de la MPO, mais l'activité de l'enzyme augmente progressivement lorsque les concentrations de HH augmentent (fig15). Un tel effet pourrait dépendre du ratio/ concentration entre les antioxydants et la cible (Magalhães et al., 2008). Il semblerait de prime abord que le miel de miellat le plus sombre et le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes soit le moins en moins doté de capacité anti-oxydante avec l'augmentation de concentration .

Selon Papineni et Orton (2012), l'administration intrapéritonéale de miel dans un modèle de lapin améliorée de façon significative l'activité MPO – probablement après que le miel ait été fortement dilué par les fluides corporels- donnant à lieu une stimulation des neutrophiles. Cependant dans cette étude il n'a pas été fait mention de la couleur du miel ni de sa teneur en polyphénols

Nos résultats pourraient concorder avec des observations *in vitro* montrant que les composés phénoliques peuvent induire un effet pro-oxidant ou anti-oxydant en fonction de l'environnement chimique (Laranjinha et al., 1995; Chan et al., 2003). Le miel pourrait offrir un tel environnement.

La réaction des phénols / peroxydase a été généralement considérée comme un mécanisme par lequel l'activité pro-oxydant des polyphénols naturels est médiée dans les cellules animales (Galati et al., 2002). Cependant, il a été suggéré que la MPO pourrait être impliqué dans l'activité anti-oxydante des composés phénoliques dans des cellules endothéliales sous stress oxydatif (Lee et al., 2009).

Les polyphénols ont la capacité aussi bien de piéger que de générer les radicaux libres, et pourrait exercer leur effet par la combinaison des deux mécanismes (Tourinho et al., 2008). Plus leur efficacité comme anti-oxydants est grande et plus le sont leurs propriétés cytotoxiques et anti-prolifératives. Cela pourrait être dû à leur double effet anti-oxydant/pro-oxydant, ou mieux encore à leur capacité de piéger ou de générer les radicaux libres en fonction de leur environnement. La réaction entre les flavonols et le HOCl peut être plus complexe qu'une simple interaction oxydant-antioxydant, et les composés phénoliques peuvent réagir avec HOCl pour former des composants chlorés stables, chaque produit ayant potentiellement une réactivité unique (Boersma et al., 1999; Eiserich et al., 1998). Ces réactions peuvent créer de nouveaux pharmacophores sur le site de l'inflammation (Tracy D'Alessandro et al., 2003). Les dérivés chlorés de la quercétine présentent significativement une plus grande capacité anti-oxydante que la quercétine non modifiée. La chloration de la quercétine améliore l'inhibition de l'oxydation des LDL, augmente le potentiel anti-oxydant total et joue un rôle dans la cardioprotection (Binsack et al., 2001). La quercétine est parmi les plus polyphénols les représentatifs présents dans le miel (Tomás-Barberán et al., 2001; Soler et al., 1995; Michalkiewicz et al., 2008). Les Produits nitrés ne reflètent pas nécessairement un

effet nocif. Boersma et al (2003) ont rapporté que la formation d'isoflavones chlorés et nitrés avec de plus grandes capacités anti-oxydantes est renforcée par le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) par une voie dépendante de la MPO. Cependant le  $\text{NO}_2^-$  dans cette étude a été surajouté. Selon Beretta et al.(2010) tous les miels contiennent du  $\text{NO}_2^-$ .

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

## Conclusion et perspectives

---

Le concept "anti-oxydant" est généralement lié au piégeage des radicaux libres, et que les EROs sont essentiellement nuisibles et doivent être éliminées. Cependant, Il convient de préciser que le but du "réseau de défense anti-oxydant" n'est pas de supprimer toutes les EROs, mais de contrôler leurs niveaux de manière à permettre leurs fonctions utiles tout en minimisant les dommages oxydatifs (Pérez-Pérez et al., 2013).

Au vu de nos résultats, le miel semble jouir d'une dualité fonctionnelle « oxydants/anti-oxydants ». Lors de nos manipulations, il nous est paru de prime abord assez étonnant que de telles concentrations, les plus petites s'entend, donnent de tels effets. Cependant, en compulsant soigneusement les données bibliographiques, il nous est apparu qu'ils s'adaptent parfaitement à ceux mis en évidence dans un passé assez proche (voir synthèse bibliographiques) et qu'il pourraient même aider à expliquer certaines propriétés du miel encore restées dans l'ombre, ou du moins, contribuer à offrir une charpente à de nouveaux objectifs de recherches.

Nous avons montré par une technique très fiable - soit la résonance paramagnétique électronique- que le miel à très basses concentrations entraîne la génération de  $\cdot\text{OH}$ , et entraîne la déplétion du GSH et augmente la génération des EROs. Tous les miels testés ont montré un effet inhibiteur dose dépendant du radical superoxyde.

Nous avons également montré que tous nos miels à des concentrations très basses entraînent la dégranulation des PMNs et la libération de MPO ; et, en utilisant la méthode SIEFED -technique connue pour éviter tout effet artefactuel- que le miel en fonction de son origine- inhibe ou stimule l'activité peroxydasique de la MPO.

Tous ces résultats ne peuvent que mettre en relief l'activité immunomodulatrice du miel.

Le miel est un mélange très complexe contenant un certain nombre d'ingrédients impliqués dans les processus physiologiques "oxydant / antioxydant". Son activité multifactorielle en fait un remède de choix. En ce temps où beaucoup de médicaments ont plus d'effets secondaires que d'effets bénéfiques, et où l'ère des antibiotiques semble révolue. On se doit de chercher parmi les miels



Algériens ceux dotés de tel ou de tel effet thérapeutique, cela s'en ressentira par un meilleur effet sur la santé et sur l'économie.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## References bibliographiques

---

- Adams, CJ, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, et al (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr. Res.* 343:651–659.
- Agil A, Fuller C, & Jialal I (1995). Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction. *Clinical Chemistry.* 41(2): 220-225.
- Ahmad A, Khan RA, Mesaik MA (2009). Anti-inflammatory effect of natural honey on bovine thrombin-induced oxidative burst in phagocytes. *Phytother Res* 2009. 23: 801–8.
- Ahmed A, Khan RA, Azim MK, Saeed SA, Mesaik MA, Ahmed S, Imran I (2011). Effect of natural honey on human platelets and blood coagulation proteins. *Pak J Pharm Sci.* 24 (3):389-97.
- Ahmed AK, Hoekstra MJ, Hage JJ, Karim RB (2003). Honey-mediated dressing: transformation of an ancient remedy into modern therapy. *Ann Plast Surg.* 50:143-147.
- Aisen P (2007). Metal Ion Transport and Storage. In I. Bertini, H. B. Gray, E. I. Stiefel & J. S. Valentine (Eds.), *Biological Inorganic Chemistry :Structure and Reactivity* (pp. 139). California, USA: University ScienceBooks.
- Aissat S, Kesic A, Benbarek H, and Meslem A (2014). Honey-Based Formulations and Drug Purposes in Honey in Traditional and Modern, chap 14. CRC Press Taylor & Francis Boca Raton, FL 33487-2742.
- Akagawa M, Shigemitsu T, Suyama K (2003). Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67(12):2632-40.
- Akanmu MA, Echeverry ., Rivera F, and Dajas (2009). “Antioxidant and neuroprotective effects of Nigerian honey,” in *Proceedings of the Neuroscience Meeting Planner*, Washington, DC, USA.
- Al-Bekairi AMI, Nagi MN, Shoeb HA, al-Sawaf HA (1994). Evidence for superoxide radical production by a simple flavoprotein: glucose oxidase. *Biochem Mol Biol Int.* 34(2):233-8.
- Aljadi AM, Yusoff KM (2003). Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turk J Med Sci.* 33: 229–36.
- Aljadi AM. and Yusoff KM (2003). Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish J. Med. Sci.* 33: 229–236.
- Allen KL, Molan PC, and Reid GM (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm. Pharmacol.* 43: 817–822.
- Al-Malki AL and Sayed AAR (2013). Bees' Honey Attenuation of Metanil-Yellow-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Article ID 614580, 9 pp.
- Altamura S and Muckenthaler MU (2009). Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *Journal of Alzheimer's Disease.* 16(4): 879-895.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Diaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, et al (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical. *Food Chem Toxicol.* 48: 2490–9.

- Alvarez-Suarez, JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli, E, Battino M (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterr J Nutr Metab.* 3: 15–23.
- Al-Waili NS (2004a). 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.*7:100-107.
- Al-Waili NS (2004b). Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J Med Food.*7:210-222.
- Al-Waili NS, Boni NS (2003). Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J Med Food.* 6:129–133.
- Al-Waili NS, Haq A (2004). Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. *J Med Food.*7: 491-494.
- Amiot MJ, Aubert S, Gonnet M, and Tacchini M (1989). Les composés phénoliques des miels: Étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie* 20:115–125.
- Anderson JM (2001). Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research.* 31: 81-110.
- Anklam E (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry.* 63: 549–562.
- Aoshima H, Ayabe S (2007). Prevention of the deterioration of polyphenol-rich beverages. *Food Chem.* 100:350–355.
- Bachanova ., Klaudiny J, Kopernicky J, and Simuth J (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie.* 33: 259–269.
- Bahrami M, Ataie-Jafari A, Hosseini S, Forouzanfar M, Rahmani M, Pajouhi M (2008). Effects of natural honey consumption in diabetic patients: an 8-week randomized clinical trial. *Int J Food Sci Nutr.* 2:1-9.
- Ball DW (2007). The Chemical Composition of Honey. *Journal of Chemical Education.*84(10) :1643-1646.
- Bansal V, Medhi B, Pandhi P. Honey (2005).A remedy rediscovered and its therapeutic utility. *Kathmandu Univ Med J.*3:305-309.
- Barbehenn R, Cheek S, Gasperut A, Lister E, Maben R (2005a). Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 31:969–988.
- Barbehenn R1, Dodick T, Poopat U, Spencer B (2005b). Fenton-type reactions and iron concentrations in the midgut fluids of tree-feeding caterpillars. *Arch Insect Biochem Physiol.* 60(1):32-43
- Bartzokis G, Tishler TA, Shin IS, Lu PH & Cummings JL (2004).Brain ferritin iron as a risk factor for age at onset in neurodegenerative diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1012(1):224-236.
- Bartosz G (2006) Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta.* 368
- Baynes JW, Thorpe SR (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.*48: 1-9.

- Beaudeux JL (1999). Oxidative modification of lipoprotein (a): physical chemical aspects and biologic implications. *Ann Pharm Fr.*57:266–75.
- Beaudeux JL, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* 21 :144–150.
- Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 16:401–407.
- Beretta G, Gelmini F, Lodi V, Piazzalunga A, Maffei Facino R (2010). Profile of nitric oxide (NO) metabolites (nitrate, nitrite and N-nitroso groups) in honeys of different botanical origins: nitrate accumulation as index of origin, quality and of therapeutic opportunities. *J Pharm Biomed Anal.* 53(3):343-9.
- Beretta G1, Orioli M, Facino RM (2007). Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Med.* 73(11):1182-9.
- Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism.*49: 3-8.
- Beutler B, Cerami A (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem.* 57:505–518.
- Biamond P, van Eijk HG, Swaak AJ, & Koster JF.(1984). Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *The Journal of Clinical Investigation.* 73(6):1576-1579.
- Bilikova K, Hanes .A, Nordhoff E, Saenger W, Klaudiny J, & Simuth J (2002). Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.)royal jelly: Purification and molecular characterization. *FEBS Letters,* 528 :125–129.
- Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-Usmar Vet al (2001). Stephen Barnes, Fen Zhou, and Dale A. Parks. Enhanced Antioxidant Activity After Chlorination of Quercetin by Hypochlorous Acid *Alcohol Clin Exp Res.* 25(3):434–443.
- Boersma BJ, T D'alessandro, MR. Benton, M Kirk, LS. Wilson, J Prasain (2003). Neutrophil Myeloperoxidase chlorinates and nitrates soy isoflavones and enhances their antioxidant properties. *Free Radical Biology & Medicine.* 35(11):1417–1430.
- Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, Jackson PL, Muccio D, Darley-Usmar VM, Barnes S (1999). Chlorination and nitration of soy isoflavones. *Arch Biochem Biophys* 368:265–275.
- Bogdanov S (2011). The book of honey. Bee Product Science. [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008). Honey for nutrition and health: A Review. *J Am Coll Nutr.* 27:677–689.
- Bonnefont-Rousselot D (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*5: 561-8.
- Bonnefont-Rousselot D, Beaudeux JL, Théron P, Peynet J, Legrand A, Delattre J (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann Pharm Fr.* 62: 147-157.

Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC (1994). Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*.91:8292–6.

Bowling AC, Beal MF (1995). Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sciences*.56:1151–1171.

Bowling AC, Schultz JB, Brown RH, Beal MF (1993). Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*.61:2322–5.

Brands CM, Alink GM, van Boekel M, Jongen WMF (2000). Mutagenicity of heated sugar-casein systems: effect of the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem*.48: 2271-2275.

Brangoulo, H. L., & Molan, P. C. (2010). Assay of the antioxidant capacity of foods using an iron(II)-catalysed lipid peroxidation model for greater nutritional relevance. *Food Chemistry*, 125(3):1126-1130.

Brinkmann SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med*. 13: 463–469.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.

Brinkmann V, Zychlinsky A (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol*. 5: 577–582.

Brown RH (1996). Superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis: new insights into mechanisms and treatments. *Ann Neurol*.39:145–6.

Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetes complications. *Nature*. 414: 813-20.

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M (2006). DNase expression allows the pathogen group A streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol*. 16: 396–400.

Cai H and Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Research*. 87(10):840-844.

Cai M, Shin BY, Kim DH, Park SJ, Park CS, Won do H et al (2011).“Neuroprotective effects of a traditional herbal prescription on transient cerebral global ischemia in gerbils” *J Ethnopharmacol*. 38(3):723-30.

Candiracci M, Piatti E, Barragán MD, Antrás DGB, Morgado D, Ruano JF et al (2012). Antiinflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J Agric Food Chem*. 60:12304–12311.

Cantarelli MA, Pellerano RG, Marchevsky EJ, Camina (2008). Quality of honey from Argentina: study of chemical composition and trace elements. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. 96: 33–41.

Carter C and Thornburg RW (2004). Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends Plant Sci*. 9:320–324.

Casteels-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P, and Tempst P(1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem*. 269: 28569–28575.

- Castro-Vazquez L, Diaz-Maroto MC & Perez-Coello MS. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 4809–4813.
- Chaudhary A, Bag S, Mandal M, Krishna Karri SP, Barui A et al (2015). Modulating prime molecular expressions and in vitro wound healing rate in keratinocyte (HaCaT) population under characteristic honey dilutions. *J Ethnopharmacol*. 26:166:211-9.
- Chepulis LM (2007). The effect of honey compared to sucrose, mixed sugars, and a sugar-free diet on weight gain in young rats. *J Food Sci*. 72:S224-S229.
- Chepulis LM., Starkey NJ, Waas JR, and Molan PC (2009). The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. *Physiology and Behavior*. 97(3-4): 359–368.
- Christen Y (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 71 (suppl):621S–9S.
- Ciacci-Woolwine F, McDermott PF, Mizel SB (1999). Induction of cytokine synthesis by flagella from gram-negative bacteria may be dependent on the activation or differentiation state of human monocytes. *Infect Immun*. 67(10):5176-85.
- Clark SR., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M et al (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med*. 13: 463–469.
- Perron NR, Brumaghim JL (2009). Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys*. 53:75–100.
- Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF (2004). Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity . *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 378 (5): 1342-1350.
- Cookson MR, Shaw PJ (1999). Oxidative stress and motor neurone disease. *Brain Pathol*. 9:165–86.
- Cooper RA, Halas E, and Molan PC (2002). The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J. Burn Care Rehabil*. 23:366–370.
- Cooper RA, Molan PC, and Harding KG (2002). The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol*. 93: 857–863.
- Cunningham JM et Green IC (1994). Cytokines, nitric oxide and insulin secreting cells. *G Reg*. 4: 173-180.
- D'Alessandro T, Prasain J, Benton MR, Botting N, Moore R, Darley-Usmar V et al (2003). Polyphenols, Inflammatory Response, and Cancer Prevention: Chlorination of Isoflavones by Human Neutrophils. *J. Nutr*. 133:3773S-3777S.
- Das A, Mukherjee A, Dha P (2013). Characterization Of Antioxidants And Antioxidative Properties Of Various Unifloral Honeys Procured From West Bengal, India. *JESTFT*. 7(3) :56-63
- Davidson PM, Sofos JN, and Brenem AL (2005). *Antimicrobials in Foods*. 3rd ed. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 291–306.
- De Valk B and Marx JJM (1999). Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Archives of Internal Medicine*. 159(14):1542-1548.
- Delattre J, Bonnefont-Rousselot D, Bordas-Fonfrede M, Jaudon MC (1999). Diabète sucré et stress oxydant. *Ann Biol Clin*. 57 : 437-44.

- Dellinger B, Pryor WA, Cueto R, Squadrito GL, Hegde V et Deutsch WA (2001). Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chemical Research in Toxicology*. 14(10);1371-1377.
- Desport JC, Maillot F (2002). Nutrition et sclérose latérale amyotrophique (SLA). *Nutr Clin Métabol*.16:91–6.
- Detaille D, Guigas B, Leverve X, Wiernsperger NF, Devos P (2002). Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol*. 63: 1259-127.
- Devanur LD, Neubert H, & Hider RC (2008). The fenton activity of iron(III) in the presence of deferiprone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97(4), 1454-1467.
- Dunford C (2005). The use of honey-derived dressings to promote effective wound management. *Prof Nurse*. 20: 35–8.
- Dutta RC (2002). Peptide immunomodulators versus infections; an analysis. *Immunol Lett*. 83: 153–61.
- Ebenezer IO, Olubenga MT (2010). Pollen characterization of honey samples from North Central Nigeria. *Journal of Biological Sciences*. 10: 43–47.
- Efem SEE (1988). Clinical observations on the wound-healing properties of honey. *Br. J. Surg*. 75:679–681.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A (1998). Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 391:393-397.
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salzihan MS (2009). Effects of Malaysian tualang honey supplementation on glycemia, free radical scavenging enzymes and markers of oxidative stress in kidneys of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Cardiol*.37:S45.
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh M.S. Gurtu S(2010). Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Annales d'Endocrinologie*. 71: 291–296.
- Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol*.46: 3774–9.
- Truchado P, López-Gálvez F, Gil MI, et al.(2009) Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem*. 115:1337–44.
- Fox C (2002).Honey as a dressing for chronic wounds in adults. *Br J Community Nurs*. 7: 530–4.
- Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, and Tansey MG (2009). “Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?” *Molecular Neurodegeneration*.16(4):47.
- Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review in Biochemistry*. 64:97-112.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V et al (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol*. 176: 231–241.
- Fujiwara N, Kobayashi K (2005). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 4(3):281-6.



Fukuda M, Hirono Y, Miyagawa M, Ishida T, Ejiogu EC, Sawai M (2011). Jungle Honey Enhances Immune Function and Antitumor Activity. Evidence Based Complementary Alternative. 2011 (2011), Article ID 908743, 8 pp

Fukuda M, Kobayashi K, Hirono Y, Miyagawa M, Ishida T, Ejiogu EC, et al (2011). Jungle honey enhances immune function and antitumor activity. Evid Based Complement Alternat Med. Article ID 908743

Gallardo-Chacon JJ, Casellies M, Izquierdo-Pulido M, and Rius N(2008). Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. J Apicult. Res. 47:131–136.

Gannabathula S, Skinner MA, Rosendale D, Greenwood JM, Mutukumira AN, Steinhorn G, et al (2012). Arabinogalactan proteins contribute to the immunostimulatory properties of New Zealand honeys. Immunopharmacol Immunotoxicol.34: 598–607.

Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A. Witteman JC (2002). Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. Am. J. Clin. Nutr. 75: 880–886.

Gethin G, Cowman S (2008). Manuka honey vs. hydrogel, a prospective, open label, multicentre, randomised controlled trial to compare de-sloughing efficacy and healing outcomes in venous ulcers. J Clin Nurs. 18: 466–74.

Gillitzer R (2001). Inflammation in human skin: a model to study chemokine-mediated leukocyte migration in vivo. The Journal of Pathology. 194(4):393–394.

Golob T, Doberšek U, Kump P, and Nečemer M (2005). Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. Food Chemistry. 91: 593–600.

Gonzalez-Teuber M, Eilmus S, Muck A, Svatos A, and Heil M (2009). Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. Plant J. 58: 464–473.

Goranov NV (2007). Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. Veterinary Clinical Pathology. 36(2):192–195.

Gordillo GM, Sen CK (2003). Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. Am J Surg. 186: 259–63.

Gougerot-Pocidalo M.A (2002). Polynucléaires neutrophiles humains; *Revue Française des Laboratoires*. 341: 43-51

Graham, J. M (1992). *The Hive and the Honeybee*;., Ed.; Dadant Sons: Hamilton, IL, 1992.

Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB (1981). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem J. 199:393–8.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF et al (2004). IKK links inflammation and tumorigenesis in mouse model of colitis associated cancer. Cell. 118:285–296.

Grundman M (2000). Vitamine E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. Am J Clin Nutr. 71 (suppl):630S–6S.

Gupta A. K, Hasler P, Holzgreve W., Hahn S (2007). Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? Semin. Immunopathol. 29:163–167.

- Gutteridge JMC (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Letters*. 201(2): 291-295.
- Habib HM, Al Meqbali FT, Kamal H, Souka UD, Ibrahim WH (2014). Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chem*. 153: 28–34.
- Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol*.17(5):370-376.
- Hakim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V et al (2010) Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 9813–9818.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne O, Charlier C, Chapelle JP (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*. 62(10): 628-638.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1992). Biologically relevant metal iondependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS Letters*. 307(1):108-112.
- Halliwell B (2007). Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochemistry Journal*. 401:1-11.
- Halliwell B, & Gutteridge JM C (1999b). The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In B. Halliwell & J. M. C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed., pp. 3-104). New York: Oxford University Press.
- Halliwell B, Clement MV, & Long LH.(2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*. 486(1):10-13.
- Halliwell B, Rafter J, Jenner A (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr*. 81:268S-276S.
- Hamzaoglu I, Saribeyoglu K, Durak H et al (2000). Protective covering of surgical wounds with honey impedes tumor implantation. *Arch Surg*. 135–142
- Hansen LL, Ikeda Y, Olsen GS (1999). Insulin signalling is inhibited by micromolar concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*. 274: 25078-25084.
- Hassan MI, Zahran F.M, Shehata H H, Abdelhamid MS (2013). The inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory effects of bee honey on hepatocellular carcinoma cell line hepg2. *Int J Biol & Pharm R*. 4(9): 618-626.
- Heinecke JW(1997) Mechanism of oxidative damage of low-density lipoprotein in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*.8:268–74.
- Hillwig MS, Kanobe C, Thornburg RW, and MacIntosh GC (2011). Identification of S-RNase and peroxidase in petunia nectar. *J. Plant Physiol*. 168:734–738.
- Hillwig MS, Liu XT, Liu GY, Thornburg RW, and MacIntosh GC (2010). Petunia nectar proteins have ribonuclease activity. *J Exp. Botany*. 61:2951–2965.
- Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Häkkinen S, Albanes D, Virtamo J (2001). Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology*. 12(1):62-7.

- Huidobro JF, Sanchez MP, Muniategui S, and Sancho MT (2005). Precise method for the measurement of catalase activity in honey. *J. AOAC Int.* 88:800–804.
- Hume JR, Grant AO (2007). Agents used in cardiac arrhythmias. "In": Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*, 1, 10th ed. San Francisco: The McGraw-Hill companies.p. 211-216.
- Hussein SZ, Yusoff KM, Makpol S and YAM Yusof (2012). Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 109636, 13 pp.
- Hussein SZ, Yusoff MK, Makpol S, Yusof YA(2012). Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* (Article ID 109636): 1–12.
- Inhibitory Effects of Sodium Arsenite and Acacia Honey on Acetylcholinesterase in Rats. *J Alzheimers Dis.*15: 903603.7 pp
- Isla MI, Craig A, Ordonez R, Zampini C, Sayago J, et al (2011). Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT-Food Sci. Technol.* 44: 1922–1930.
- Isla MI, Craig A, Ordonez R, Zampini C, Sayago J, et al (2011). Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT-Food Sci. Technol.* 44: 1922-1930.
- Iurlina MO, Fritz R(2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology* .105: 297–304.
- Jenkins R, Burton N, Cooper R (2014). Proteomic and genomic analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated down regulation of virulence markers. *J Antimicrob Chemother.* 69: 603-615.
- Jenkins RE, Cooper R (2012). Synergy between oxacillin and manuka honey sensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Antimicrob Chemother.* 67 (6): 1405-1407.
- Jungbluth G (2008). Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine. Thèse Méd. Vét , Lyon, n°14.
- Kanner J, Lapidot T (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med.*31(11):1388-1395.
- Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, Mohd MA, Yusoff KM (2010). Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. *Nutr Res.* 30(9):650-9. .
- Kassim M, Mansor M, Suhaimi A, Ong G and Yusoff KM (2012). Gelam Honey Scavenges Peroxynitrite During the Immune Response. *Int. J. Mol. Sci.*13 :12113-12129.
- Kell DB (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Medical Genomics*, 2(1).
- Kesić A, Crnkić A, Ibršimović-Mehmedinović N, Šestan A, Čatović B (2014). Changes of antioxidant activity in honey as a result of Haber-Wais reaction. *American Journal of Applied Chemistry.* 2(6): 112-116
- Kessenbrock, K , Krumbholz, M, Schonermarck, U, Back, W, Gross W L, Werb Z et al (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15, 623–625.

- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schonermarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., Grone, H. J., Brinkmann, V., Jenne, D. E. (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15, 623–625.
- Khiati B, Bacha S, Ahmed M, Aissat S, Meslem A and Djebli N (2013). Wound Care with Euphorbia Honey after Nucleation: A Case Report. *Clin Microbiol.* 2:6
- Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V et al (2011). Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood.* 117(4):1350-8.
- Ko CH, Li K, Ng PC, Fung KP, Li CL, Wong RP et al (2006). Pro-oxidative effects of tea and polyphenols, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, on G6PD-deficient erythrocytes in vitro. *Int J Mol Med.* 18(5):987-994.
- Kolayli S, Yildiz O, Sahin H, and Aliyazicioglu R (2104). Biochemistry and hysicochemical Properties of Honey in Honey in Traditional and Modern Medicine . CRC Press Taylor & Francis Group
- Kono Y & Fridovich I (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry.* 257(10);5751-5754.
- Krippel-Drews P, Lang F, Haussinger D, Drews G (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B cells. *Pflugers Arch.* 426: 552-554.
- Kronka JM, Cooper RA, Maddocks SE (2013). Manuka honey inhibits siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 115 (1): 86-90.
- Kwakman PHS and Zaat SAJ (2012). Antibacterial Components of Honey: Critical review. *IUBMB Life.* 64(1): 48–55.
- Kwakman PHS, Te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls, CMJE et al. (2010). How honey kills bacteria. *FASEB J.* 24: 2576–2582.
- Kwakman PHS, Te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CMJE., and Zaat, S AJ. (2011). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS One.* 6(3), e17709.
- Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE (2000). Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 7: 457-64.
- Lambert JD, Sang S, Yang CS (2007). Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol.* 20(4):583-5.
- Lee HJ, Churey JJ, and Worobo RW (2008). Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 240–244.
- Lee JH, Park JH, Kim JA, Neupane GP, Cho MH, Lee CS et al. (2011). Low concentrations of honey reduce biofilm formation, quorum sensing, and virulence in *Escherichia coli* 0157:H7. *Biofouling.* 27 (10): 1095-1104.
- Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML et al (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 959(1), 199-213.
- Levi M, Poll TV and Büller HR (2004). Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation.* 109: 2698-2704.
- Levy SB and Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10:S122–S129.

- Liochev SII, Fridovich I (1995). Superoxide from glucose oxidase or from nitroblue tetrazolium? *Arch Biochem Biophys.* 318(2):408-10.
- Lopez-Lazaro M (2006). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.* 252:1–8.
- Lopez-Lazaro M(2007). Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters.* 252:1-8
- Machlin L & Bendich A (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1(6):441-5.
- Majczyk M & Baralkiewicz D (2008). Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/ AES. *Analytical Chimica Acta.* 617: 11–17.
- Majtan J, Bohova J, Garcia-Villalba R, Tomas-Barberan FA, Madakova Z, Majtan T, et al (2013). Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. *Arch Dermatol Res.*305: 619–27.
- Majtan J, Kovacova E, Bilikova K, Simuth J (2006). The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNF $\alpha$  release. *Int Immunopharmacol.* 6: 269–78.
- Majtan J, Kumar P, Majtan T, Walls AF, Klaudiny J (2010). Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Exp Dermatol.* 19: e73–e9.
- Majtan J, Kumar P, Majtan T, Walls AF, Klaudiny J(2010). Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Exp Dermatol* 19: e73–e9.
- Majtanova N, Vodrazkova E, Kurilova V, Horniackova M, Cernak M, Cernak A, Majtan J (2015). Complementary treatment of contact lens-induced corneal ulcer using honey: a case report. *Cont Lens Anterior Eye.*38(1):61-3
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*23: 549–55.
- Martos I, Cossentini M, Ferreres F, Tomas-Barberan FA (1997). Flavonoid composition of tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem.*45: 2824–9.
- Mason B.N,Califano,JP,Reinhart-King CA (2012). Matrix stiffness:a regulator of cellular behavior and tissue formation,In *Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine.* Springer, NewYork:19–37.
- Mavric E, Wittmann S, Barth G, and Henle T (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Food Res.* 52:483–489
- McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J et al (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 12 : 928–936.
- McLoone P, Warnock M, Fyfe L (2015). Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *J Microbiol Immunol Infect.*S1(15): 684-1182.
- Meda A, Lamien EC, Millogo J, Romito M, Nacoulma OG. Ethnopharmacological communication therapeutic uses of honey and honeybee lar (2004).vae in central Burkina Faso. *J Ethnopharmacol.*95:103-107.

- Michalkiewicz A, Biesaga M and Pyrzynska K (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*. 187(1-2): 18-24.
- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*. 36(11):1199-208.
- Mishra R. N (2011). "Rasayan-the ayurvedic perspective Research". *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2(4): 269–282.
- Miyagawa M, Fukuda M, Hirono Y, Kawazoe A, Shigeyoshi E, Sakura M et al (2010). Effect of Jungle honey on the chemotactic activity of neutrophils. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2 (4): 149 – 154.
- Mobarok Ali ATM, Al-Swayeh AO (1997). Natural honey prevents ethanol-induced increased vascular permeability changes in the rat stomach. *J Ethnopharmacol*. 55:231–239
- Moesby L, Jensen S, Hansen EW, Christensen JA (1999). A comparative study of Mono Mac 6 cells, isolated mononuclear cells and *Limulus* amoebocyte lysate assay in pyrogen testing. *Int J*
- Molan PC (1992). The antibacterial activity of honey .1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. 73: 5–28.
- Molan PC (1992). The antibacterial activity of honey .1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. 73:5–28.
- Molan PC (2002). Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers-theory and practice. *Ostomy. Wound Manage*. 48: 28-40.
- Molan PC (2011). The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing. *Wound Pract Res*. 19: 204–20.
- Molan PC, Betts JA (2004). Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *J Wound Care*. 13: 353–6.
- Montagnier L, Olivier R, Pasquier C (1997). *Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases*. CRC Press, 6 oct. 1997 - 576 p ISBN-13: 978-0824798628.
- Muhammad A, Odunola OA, Gbadegesin MA, Sallau AB, Ndidi US, and Ibrahim MA (2015).
- Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, and MA (2002). Mittleman, "Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*. 105(21): 2476–2481.
- Muller P, Alber DG, Turnbull L, Schlothauer RC, Carter DA, and Whitchurch CB et al. Synergism between medihoney and rifampicin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One* 2013. 8 (2): e57679.
- Mundo MA, Padilla-Zakour OI, and Worobo RW (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int. J. Food Microbiol*. 97: 1–8.
- Mundo MA, Padilla-Zakour OI, and Worobo RW (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int. J. Food Microbiol*. 97:1–8.
- Nada O (2009). Bee honey and cancer. *J ApiProduct ApiMedical Sci*.1(4): 93-103
- Nagai T, Tanoue Y, Kai N, Suz N (2011). Functional Property of Honey from *Echium vulgare*. *Food and Nutrition Sciences*. 3: 614-620

- Najafi M, Eteraf-Oskouei T, Rafie F, Mahdizadeh-Aghdam E (2008). Effects of pharmacologic preconditioning by natural honey on arrhythmias and infarct size in isolated heart. *Pharm Sci J.*08(4):1-11.
- Najafi M, Shaseb E, Ghaffary S, Fakhru A, Eteraf-Oskouei T (2011). Effects of chronic oral administration of natural honey on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Iran J Basic Med Sci.*14:75-81.
- Narasaraju, T, Yang, E, Samy RP., Ng, H, Poh, W. P., Liew, A. A et al (2011). Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am. J. Pathol.* 179, 199–210.
- Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences.*7 (3):159-165.
- Omafuvbe BO, Akanbi OO (2009). Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research.*3: 891–896.
- Orsolich N, Basic I (2004). Honey as a cancer-preventive agent. *Periodicum Biolog.* 106:397–401.
- Oyefuga OH, Ajani EO, Salau BA, Agboola F, and Adebawo OO (2012). Honey consumption and its anti-ageing potency in white Wister albino rats. *Scholarly Journal of Biological Science.*1(2):15–19.
- Palmer HJ, Paulson KE (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev.*55:353–61.
- Parker H, Albrett AM, Kettle AJ, and Winterbourn CC (2012). Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *Journal of Leukocyte Biology.* 91:369-376.
- Perez RA, Iglesias MT, Pueyo E, Gonzalez M, De Lorenzo C (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of agricultural and food chemistry.*55 (2): 360-365.
- Perron NR ; Brumaghim JL (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol  
*Pharm.* 191: 141–149.
- Pietrangolo A (2002). Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* 282(3): G403-G414.
- Pincemail J, Defraigne JO, Meurisse M, Limet R (1998). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires, 1<sup>ère</sup> partie: la vitamine C. *Medi-Sphere.* 83: 23-27.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeur, Poumons.* 4(4).4 pp.
- Pisani A, Protano G, and Riccobono F(2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry.* 107: 1553–1560.
- Poulsen, H.E., Prieme, H., and Loft, S (1998). Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur, J. Cancer Prev.* 7: 9–16.
- Powers SK, Deruisseau KC, Quindry J, & Hamilton KL (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences.* 22(1), 81-94.
- Przedborski S, Donaldson D, Jakowec M, Kish S, Guttman M, Rosoklija G, et al (1996). Brain superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.*39:158–65.

- Rakha MK, Nabil ZI, Hussein AA (2008). Cardioactive and vasoactive effects of natural wild honey against cardiac malperformance induced by hyperadrenergic activity. *J Med Food*. 11:91-98.
- Ramos-Kichik V, Mondragon-Flores R, Mondragon-Castelan M, Gonzalez-Pozos S, Muniz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O et al (2009). Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 89: 29–37.
- Reutersward A L (1987). Mutagenicity of pan-fried bovine tissues in relation to their content of creatine, creatinine, monosaccharides and free amino acids. *Food Chem Toxic*. 25: 755-762.
- Rice-Evans C (Ed.), *Wake Up to Flavonoids*, Royal Society of Medicine Press, London, 2000, pp. 13–23.
- Robson V, Dodd S, Thomas S (2009). Standardized antibacterial honey (Medihoney) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial. *J Adv Nurs*. 65: 565–75.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*. 17: 189-212.
- Russell KM, Molan PC, Wilkins AL, and Holland PT. (1990). Identification of some antibacterial constituents of New-Zealand Manuka honey. *J. Agric. Food Chem*. 38:10–13.
- Sang S, Lee MJ, Hou Z, Ho CT, Yang CS (2005). Stability of Tea Polyphenol (–)- Epigallocatechin-3-gallate and Formation of Dimers and Epimers under Common Experimental Conditions. *J Agric Food Chem*. 53:9478–9484.
- Sang S, Yang I, Buckley B, Ho C, Yang CS (2007). Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic. Biol. Med*. 43: 362–371
- Savagner, P (2009). La plasticité cellulaire: de l'embryon à la fibrose et au cancer. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*. 193(9): 1981-1992.
- Schepartz AI (1966). Honey catalase: occurrence and some kinetic properties. *J. Apic. Res*. 5: 167–176.
- Schmitzova J, Klaudiny J, Albert S, Schroder W, Schrockengost W, Hanes J, et al (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol Life Sci*. 54: 1020–1030.
- Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Cardetti M, Keen CL (2003). Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J Agric Food Chem*. 51:1732-1735.
- Selwyn AP, Braunwald E (2004). Ischemic heart diseases. In: Kasper LD, Fauci SA. editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York: The McGraw-Hill companies. p.1434- 1444.
- Sereia MJ, Alves EM, de Toledo VAA, LC Marchini, Faquinello P, Sekine ES, Wielewski P (2011). Microbial flora in organic honey samples of Africanized honeybees from Parana River islands. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 31(2): 462-466.
- Shenoy R, Bialasiewicz A, Khandekar R, Al Barwani B, Al Belushi H (2009). Traditional medicine in Oman: its role in ophthalmology. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 16:92–96.
- Shirai M1, Kawai Y, Yamanishi R, Kinoshita T, Chuman H, Terao J (2006). Effect of a conjugated quercetin metabolite, quercetin 3-glucuronide, on lipid hydroperoxide-dependent formation of reactive oxygen species in differentiated PC-12 cells. *Free Radic Res*. 40(10):1047-1053.



- Silici S, Sagdic O, Ekici L (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chem.* 121: 238–43.
- Silva MM, Santos MR, Caroço G, Rocha R, Justino G, Mira L (2002). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic Res.*36(11):1219-27.
- Simpson RG, Buchanan AJ, Chhatwal JT, Kotb GS, Nizet, V(2007). DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nat. Med.* 13: 981–985.
- Simuth J, Bíliková K, Kováčová E, Kuzmova Z, Schroder W (2004).Immunochemical approach to detection of adulteration in honey:physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha is a regular component of honey. *J Agric Food Chem.* 52:2154–8.
- Skog K, Augustsson K, Steineck G, Stenberg M, Jägerstad M (1997). Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food Chem Toxicol.* 35:555-565.
- Snowdon JA, Cliver DO (1996). Microorganisms in honey. *Int J Food Microbiol.*31(1-3):1-26.
- Sobel BE (2002).Effects of glycemic control and other determinants on vascular disease in type 2 diabetes. *Am. J. Med.*113: 12-22.
- Sobota R, Szwed M, Kasza A, Bugno M, Kordula T (2000).Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem Biophys Res Commun.* 267: 329–33.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002).Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 33(5):575-86.
- Soler C, Gil MI, García-Viguera C, Tomás-Barberán FA (1995). Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin.*Apidologie.*26: 53-60
- Spee B, Arends B, van den Ingh T S G A M, Penning LC and Rothuizen J (2006). Copper Metabolism and Oxidative Stress in Chronic Inflammatory and Cholestatic Liver Diseases in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*20(5) :1085–1092.
- Steffen Y, Schewe T, Sies H (2006). Myeloperoxidase-mediated LDL oxidation and endothelial cell toxicity of oxidized LDL: attenuation by (–)-epicatechin. *Free Radic Res.* 40: 1076–1085.
- Stohs SJ & Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine.* 18(2): 321-336.
- Stroncek JD, Reichert WM (2008). Overview of Wound Healing in Different Tissue Types . Editors In: Reichert WM, editor.*Source Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment.* Boca Raton (FL): CRC Press; 2008. Chapter I. Taylor & Francis Group, LLC
- Subrahmanyam M (2007).Topical application of honeyfor burn wound treatment – an overview.*Ann.Burns Fire Disasters.*20, 137. 908743.
- Sugimura T (1985). Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat Res.*150:33-41.
- Sugimura T, Sato A (1983). Mutagens and carcinogens in food. *Cancer Res.* 43: 2415s-2421s.
- Swapna Gannabathula, Krissansen GW, Skinner M , Steinhorn G,Schlothauer R (2015). Honeybee apisimin and plant arabinogalactans in honey costimulate monocytes. *Food Chemistry.* 168 (2015) 34–40

- Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M et al (2003). Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *Int J Urol.* 10:213–219.
- Tamura S, Amano S, Kono T, Kondoh J, Yamaguchi K, Kobayashi S, et al. (2009). Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics.*9: 5534–5543.
- Thomas CE, Morehouse LA et Aust SD (1985). Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry.* 260(6): 3275-3280.
- Timm M, Bartelt S, Hansen EW (2008). Immunomodulatory effects of honey cannot be distinguished from endotoxin. *Cytokine.*42: 113–20.
- Tomás-Barberán FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 81:485-496.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C and Brown RA(2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 3(5): 349-363.
- Tonks A, Cooper RA, Price AJ, Molan PC, Jones KP (2001). Stimulation of TNF- $\alpha$  release in monocytes by honey. *Cytokine.* 14: 240–2.
- Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine.* 21: 242–7.
- Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, Parton J, Brazier J, Smith EL, et al (2007). A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *J Leukoc Biol.* 82: 1147–55.
- Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M, Torreilles J (1999). Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Rev.*30:153–63.
- Toullec A, Gerald D, Despouy G, Bourachot B, Cardon M, Lefort S et al (2010). Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Molecular Medicine.* 2(6):211-230.
- Touriño S, Lizárraga D, Carreras A, Matito C, Ugartondo V, Mitjans M, et al (2008). Antioxidant/prooxidant effects of bioactive polyphenolics. *EJEAFChe.* 7 (8):3348-3352.
- Truchado P, Lopez-Galvez F, Gil MI, Tomas-Barberan FA, Allende A (2009). Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.* 115 (4): 1337–1344
- Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, Kodama M (2001). Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappa B in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J Surg Res.*100: 127–34.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W et al (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639.
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8: 668–676.
- Van Lenten B, Navab M, Shah D, Fogelman AM, Lusis AJ(2001). The role of high density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 11:155–61.
- Vanhanen LP, Emmert A, and Savage G.P(2011). Savage mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chemistry.* 128: 236–240.

- Venitt S, Phillips DH (1995). The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germline mutation. In *Environmental Mutagenesis*; Phillips, D., Venitt, S., Eds.; BIOS Scientific Publishers Ltd.: Oxford, UK, 1995; 1-20.
- Vladimirov YA, Proskurnina EV (2009). Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc)*. 74:1545–1566.
- Wakabayashi K, Nagao M, Esumi H, Sugimura T (1992). Food derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res*. 52: 2092s-2098s.
- Walker ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet, V, von Kockritz-Blickwede M. (2010) Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun*. 2: 576–586.
- Walsh C (2003). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.
- Wang XH, Andrae L, Engeseth NJ (2002). Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *J Agric Food Chem*. 50:6923–6928
- Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol*. 10: 52–56.
- Weston RJ, Brocklebank LK, and Lu YR (2000). Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem*. 70: 427–435.
- Weston RJ, Brocklebank LK, and Lu YR (2000). Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem*. 70:427–435.
- White J W Jr (1992). Honey. In *The Hive and the Honeybee*; Graham, J. M., Ed.; Dadant & Sons: Hamilton, IL: p 869–925.
- White JW (1975). Physical characteristics of honey. In Crane, E (ed) *Honey: a comprehensive survey*. Heinemann; London, UK: 207-239.
- Whitnall M & Richardson DR (2006). Iron: A new target for pharmacological intervention in neurodegenerative diseases. *Seminars in Pediatric Neurology*. 13(3):186-197.
- Witztum JL, Steinberg D (2001). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med*. 11: 93–102.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, et al (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* .14:1105–16.
- Wu W, Yao DF, Qiu LW, Sai WL and Shen JJ (2009). Characteristics of hepatic nuclear-transcription factor-kappa B expression and quantitative analysis in rat hepatocarcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int*. 8: 504-509.
- Yaghoobi N, Al-Waili N, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh SMR, Abasalti Z, Yaghoobi Z, et al (2008). Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP and body weight compared with sucrose. *Sci World J*. 8:463–469.
- Yamaizumi Z, Shiomi T, Kasai H, Nishimura S, Takahashi Y, Nagao M, Sugimura T (1980). Detection of potent mutagens, Trp-p1 and Trp-p2, in broiled fish. *Cancer Lett*. 9: 75-83.

Yao L, Jiang Y, D'Arcy B, Singanusong R, Datta N, Caffin N, et al (2004). Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian Eucalyptus honeys. *J Agric Food Chem.* 52: 210–4.

Zàrraga-Galindo N, Vergara-Aragon P, Rosales-Meléndez S, Ibarra-Guerrero P, Domínguez-Marrufo LE, Oviedo-García RE et al(2011). Effects of bee products on pentylenetetrazole-induced seizures in the rat. *Proceedings of the Western Pharmacological Society.*54: 32–39.

Zhou J, Li P, Cheng N, Gao H, Wang B, Wei, Y, & Cao W(2012). Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Food and Chemical Toxicology.* 50(8): 2766-2773.

# **PUBLICATIONS**

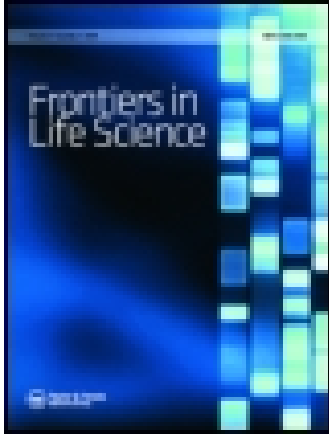
---

This article was downloaded by: [CERIST]

On: 09 June 2015, At: 13:48

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



[Click for updates](#)

## Frontiers in Life Science

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.tandfonline.com/loi/tfls20>

### Effect of honey on purified equine myeloperoxidase activity and superoxide radical production in activated Polymorphonuclear neutrophils

Saad Aissat<sup>a</sup>, Hama Benbarek<sup>b</sup>, Thierry Franck<sup>cd</sup>, Stephan Kohnen<sup>e</sup>, Ginette Deby-Dupont<sup>c</sup>, Didier Serteyn<sup>cd</sup>, Moussa Ahmed<sup>a</sup> & Ange Mouithys-Mickalad<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Veterinary Sciences, Ibn Khaldoun University, Tiaret 14000, Algeria

<sup>b</sup> Faculty of Sciences of Nature and Life, Mascara University, Mascara 29000, Algeria

<sup>c</sup> Centre for Oxygen, Research and Development (CORD), Institute of Chemistry B6a, University of Liège, Sart Tilman, 4000 Liège 1, Belgium

<sup>d</sup> Department of Clinical Sciences, Large Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, B41, University of Liège, Sart Tilman, 4000 Liège 1, Belgium

<sup>e</sup> Celabor, Centre de Services scientifique et technique aux Entreprises, Zoning Industriel de Petit-Rechain, Avenue du Parc 38, 4650 Herve, Belgium

Published online: 08 Jun 2015.

To cite this article: Saad Aissat, Hama Benbarek, Thierry Franck, Stephan Kohnen, Ginette Deby-Dupont, Didier Serteyn, Moussa Ahmed & Ange Mouithys-Mickalad (2015): Effect of honey on purified equine myeloperoxidase activity and superoxide radical production in activated Polymorphonuclear neutrophils, *Frontiers in Life Science*, DOI: [10.1080/21553769.2015.1044131](https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1044131)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/21553769.2015.1044131>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

## Effect of honey on purified equine myeloperoxidase activity and superoxide radical production in activated Polymorphonuclear neutrophils

Saad Aissat<sup>a</sup>, Hama Benbarek<sup>b</sup>, Thierry Franck<sup>c,d</sup>, Stephan Kohnen<sup>e</sup>, Ginette Deby-Dupont<sup>e</sup>, Didier Serteyn<sup>c,d</sup>,  
Moussa Ahmed<sup>a\*</sup> and Ange Mouithys-Mickalad<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Institute of Veterinary Sciences, Ibn Khaldoun University, Tiaret 14000, Algeria; <sup>b</sup>Faculty of Sciences of Nature and Life, Mascara University, Mascara 29000, Algeria; <sup>c</sup>Centre for Oxygen, Research and Development (CORD), Institute of Chemistry B6a, University of Liège, Sart Tilman, 4000 Liège 1, Belgium; <sup>d</sup>Department of Clinical Sciences, Large Animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, B41, University of Liège, Sart Tilman, 4000 Liège 1, Belgium; <sup>e</sup>Celabor, Centre de Services scientifique et technique aux Entreprises, Zoning Industriel de Petit-Rechain, Avenue du Parc 38, 4650 Herve, Belgium

(Received 17 November 2014; accepted 20 April 2015)

Three Algerian honey samples (nectar honey, mixed honey and honeydew honey) were analysed for their total phenolic content (TPC) using the Folin–Ciocalteu reagent and total flavonoid content (TFC) by the aluminium chloride method. The antioxidant activity was tested both against reactive oxygen species (ROS) produced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated equine polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and on purified equine myeloperoxidase (MPO) enzyme activity. The ROS production by stimulated PMNs was measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence. Specific immunological extraction followed by enzymatic detection (SIEFED) was used to measure specifically the activity of equine MPO. Nectar honey, mixed honey and honeydew honey had TPCs of  $59.52 \pm 1.31$ ,  $68.36 \pm 1.20$  and  $122.76 \pm 4.20$  mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g honey, respectively (mean  $\pm$  SD). As for the TPC, the highest TFC was observed for honeydew honey [ $20.55 \pm 0.72$  mg catechine equivalents (CE)/100 mg honey], followed by mixed honey ( $7.47 \pm 0.07$  CE/100 mg honey) and nectar honey ( $4.80 \pm 0.08$  CE/100 mg honey). All the tested honeys displayed a dose-dependent inhibitory effect on the oxidant activities of PMNs. By the SIEFED technique, it was shown that most of the honeys interact directly with MPO: the light honeys (nectar honey and mixed honey) were inhibitors of MPO activity, while the dark honey had less inhibiting effect and even behaved as an enhancer of MPO activity at high concentrations.

**Keywords:** honey; antioxidant; chemiluminescence; MPO activity; neutrophil

### Introduction

The stimulation of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) results, in addition to the release of cytokines, in both intracellular and extracellular generation of reactive oxygen species (ROS). Inside the PMN, the combined action of ROS and proteolytic enzymes kills ingested bacteria and prevents infection. Outside the PMN, the excessive generation of ROS and enzyme release could have detrimental effects on surrounding tissues (Hampton et al. 1998). The superoxide radical, produced by the activity of NADPH oxidase of PMNs, is known to be a harmful oxygen species, as it is also the precursor of other ROS such as hydrogen peroxide (Halliwell & Gutteridge 2007). PMN stimulation and phagocytosis are generally accompanied by the degranulation and extracellular release of myeloperoxidase (MPO). Although the beneficial role of MPO during the immune response is to kill pathogens, excessive and uncontrolled release can lead to secondary tissue damage (Davies 2011). Several publications have shown that high MPO levels are connected to increased levels of

free radical production (Eiserich et al. 1998; Arnhold & Flemmig 2010). However, it has been suggested that the pro-oxidant activity of peroxidases can be modulated by the *in vivo* environment (Laranjinha et al. 1995; Chan et al. 2003). It is widely accepted that honey is beneficial for health, but its mode of action has not been fully elucidated and is probably multifactorial (Kwakman et al. 2010; Fauzi et al. 2011).

The antioxidant properties of honey have been extensively studied, but there are important discrepancies in the published data. Indeed, honey is a very complex mixture, containing a number of ingredients that are involved in oxidant/antioxidant physiological processes, such as hydrogen peroxide, nitrite, nitrate, glucose, glucose oxidase, iron, copper, chlorine, iodine, catalase, tyrosine, tryptophan, arginine, flavonoids and phenolic acids (Ahmed et al. 2012). According to Gheldof et al. (2002), the antioxidant activity of honey is due to the combined activities of enzymes including glucose oxidase, catalase and peroxidase. Several studies show that darker honeys

\*Corresponding author. Email: [moussa7014@yahoo.fr](mailto:moussa7014@yahoo.fr)

possess higher antioxidant activities than lighter honeys (Taormina et al. 2001; Socha et al. 2009). In honeys from various floral sources, studies have demonstrated a strong correlation between their content of phenolic compounds and their antioxidant and antibacterial activities (Gheldof et al. 2002; Escuredo et al. 2012; Alvarez-Suarez et al. 2013). Various antioxidant activity methods have been used to measure and compare the antioxidant activity of honey. Assay methods differ from one another in terms of reaction mechanisms, oxidant species, reaction conditions and the way in which the final results are expressed (Moniruzzaman et al. 2012). So far, there is no standardized method to assess the antioxidant properties of honey (Ahmed et al. 2012) and few models have been used to evaluate its anti-inflammatory properties. The aim of this work was to evaluate *in vitro* the antioxidant and anti-inflammatory activities of three types of raw Algerian honey using PMNs as a cellular model and MPO as an enzymatic model, involving both ROS production and the inflammatory response.

## Materials and methods

### Reagents

Folin–Ciocalteu reagents, sodium carbonate solution, gallic acid, aluminium chloride and catechin were all purchased from Sigma (represented by the Algerian Chemical Society, Algeria). Analytical grade sodium and potassium salts, calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), bovine serum albumin (BSA), dimethylsulfoxide (DMSO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% w/v) were from Merck (VWRI, Belgium). Protein A Sepharose was from Amersham Bioscience Benelux (The Netherlands). Trypan Blue was from ICN Biomedicals (Solon, OH, USA). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), lucigenin (*bis-N*-methylacridinium nitrate), Percoll and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Microtitration plates (Cliniplate EB) and White Combiplates were from Fisher Scientific (Aalst, Belgium). Amplex<sup>®</sup> Red substrate was purchased from Molecular Probes (The Netherlands).

### Honey samples

Three samples of Algerian honey: honeydew honey (DH2: darker honey), mixed honey (LH3) and nectar honey (LH1: lighter honey) were obtained directly from beekeepers, belonging to different geographical regions. Raw honeys used in this study were not submitted to thermal treatments or pasteurization, or any other operation able to alter natural composition. Honey samples were stored at 4°C in the dark until further analysis. The botanical origin, colour and accordance with international standards of the three varieties of honey were confirmed by a specialist laboratory (CARI ABSL Laboratory, Louvain La Neuve, Belgium).

### Total phenolic content

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin–Ciocalteu method (Singleton et al. 1999). Thirty microlitres of honey solution (0.1 g/ml) was mixed with 2.37 ml of Milli-Q<sup>®</sup> water and 150 µl of Folin–Ciocalteu reagent (0.2 N). The solution was thoroughly mixed by vortexing and incubated for 2 min at room temperature. A volume of 450 µl sodium carbonate solution (0.2 g/ml) was added to the reaction mixture and further incubated for 2 h at room temperature. The absorbance was measured at 765 nm. The total phenolic content was determined by comparison with a standard curve prepared using gallic acid (0–200 µg/l). The mean of at least three readings was calculated and expressed as milligrams of gallic acid equivalents (mg GAE)/100 g of honey.

### Total flavonoid content

Total flavonoid content (TFC) was determined using the aluminium chloride assay, according to Amaral et al. (2009). A 10 µl volume of a 10% (w/v) honey solution was added to the wells of a 96-well microtitre plate, and then 30 µl of a 2.5% sodium nitrite solution, 20 µl of a 2.5% aluminium chloride solution and 100 µl of a 2% sodium hydroxide solution were sequentially added. The samples were mixed and the absorbance at 450 nm was measured. TFC was expressed as milligrams of catechin equivalents (mg CE)/100 g of honey.

### Blood collection and isolation of neutrophils

Blood samples were drawn from healthy horses by jugular venepuncture in 9 ml Vacutainer<sup>®</sup> tubes with EDTA (1.6 mg/ml blood) as anticoagulant. The horses were clinically healthy: they were fed, bred and housed under identical conditions and were not under medical treatment (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). PMNs were isolated according to the technique previously described by Pycock et al. (1987) on a discontinuous density gradient of Percoll in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffer formed by a 85% solution, overlaid by a 70% solution. The anticoagulated whole blood, laid on the top of the gradient, was centrifuged at 400 × *g* for 20 min at 20°C. The PMNs were collected at the interface between the two gradient layers and washed in two volumes of physiological saline solution. The cell pellets were suspended in 20 mM phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl. The cell preparation was ≥ 96% neutrophils, with a cell viability of 97% as measured by the Trypan Blue exclusion test. Each batch of neutrophils was obtained from 60 ml blood drawn from one horse, the cells were used immediately after isolation, the experiment was completed within 5 h and each assay was performed in triplicate. Each experiment was repeated at least twice with different cell batches.



### ***Chemiluminescence measurement of reactive oxygen species produced by PMA-stimulated neutrophils***

Superoxide radical ( $O_2^-$ ) production by activated neutrophils was followed by chemiluminescence, according to the method described by Benbarek et al. (1996). Neutrophil suspensions ( $10^6$  cells/200  $\mu$ l PBS) were distributed in the wells of a 96-well microtitre plate (White Combiplate 8; Fisher Scientific) and incubated for 10 min at 37°C with honey at final concentrations of 2%, 5%, 10% or 20%. After the incubation, 25  $\mu$ l  $CaCl_2$  (1.1 mg/ml) and 2  $\mu$ l lucigenin (2.5 mg/ml) were added. Just before the chemiluminescence measurement, 10  $\mu$ l of  $6.10^{-5}$  M PMA was added to the neutrophil suspension. The chemiluminescence response of stimulated neutrophils was monitored for 30 min using a Multiscan reader (Multiscan Ascent; Fisher Scientific). A control assay, performed with PMA-stimulated PMNs in the presence of PBS without honey, was taken as 100% chemiluminescence response.

### ***Purification of equine myeloperoxidase and polyclonal antibodies against equine myeloperoxidase***

The purification of equine MPO and the preparation of the anti-MPO antibodies used in the immunological techniques were previously described in detail (Franck et al. 2005). In brief, MPO was extracted from isolated equine neutrophils and purified by two chromatographic steps (ion exchange and gel filtration) to reach a purity of > 98% (as established by electrophoresis with enzymatic detection on electrophoretic bands). Antisera were obtained from rabbits and guinea pigs after their immunization against the purified enzyme. The polyclonal antibodies (immunoglobulin G) were isolated from antisera by affinity chromatography on Protein A Sepharose®.

### ***Measurement of peroxidasic activity of myeloperoxidase by specific immunological extraction followed by enzymatic detection***

The specific immunological extraction followed by enzymatic detection (SIEFED) technique was used as previously described by Franck et al. (2006). The first step, immunoextraction, captures MPO from a solution or biological sample using specific immobilized antibodies. The second step consists of washing to eliminate all the compounds or the potential interfering substances of the sample that are not bound to the antibodies. The third step is the *in situ* detection of MPO enzymatic activity (revelation step) using  $H_2O_2$ , a fluorogenic substrate (Amplex Red) and  $NaNO_2$  as the enhancer of the reaction. The peroxidase activity of MPO oxidized Amplex Red into a fluorescent compound. The diluted honey samples at final concentrations of 2%, 5%, 10% and 20% (w/v) were incubated for 10 min with equine MPO (20 ng/ml) before the immunoextraction step. The MPO solution (20 ng/ml) used for

SIEFED was prepared with purified equine MPO diluted in PBS buffer at pH 7.4 with 5 g/l BSA and 0.1% Tween 20. The mixture was then loaded on to a microplate coated with rabbit polyclonal antibodies (3  $\mu$ g/ml) against equine MPO and incubated for 2 h at 37°C to allow the capture of MPO by the antibodies. Afterwards, the samples were eliminated and the wells of the microtitre plate were washed four times with PBS buffer at pH 7.4 containing 0.1% Tween 20. The washing step allows the removal of the excess honey and all the molecules not bound to the antibodies or to MPO, to reveal the enzyme activity. The activity of the enzyme captured by the antibodies was measured by adding  $H_2O_2$  (10  $\mu$ M), nitrite anions ( $NO_2^-$ , 10 mM) and Amplex Red (40  $\mu$ M) as the fluorogenic substrate. The oxidation of Amplex Red into the fluorescent adduct resorufin ( $\lambda_{excitation} = 544$  nm;  $\lambda_{emission} = 590$  nm) was monitored for 30 min at 37°C with a fluorescent plate reader (Fluoroskan Ascent; Fisher Scientific). A control assay set as 100% MPO activity was performed with purified MPO and with the honey solution replaced by distilled water.

### ***Statistical analysis***

TPC and TFC values were determined in triplicate. In terms of the cellular and enzymatic models, within an experiment, each point was repeated three times and each experiment was repeated two to four times with cell batches from different horses, so that the *n* value of one experimental point ranged from 6 to 12. Data are given as mean  $\pm$  SD and statistical analysis was performed with GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A *p* value < 0.05 was considered significant.

## **Results**




### ***Total polyphenol and flavonoid contents***

Table 1 shows the TPC (mg GAE/100 g of honey) and TFC (mg CE/100 g of honey) values determined using the colorimetric Folin–Ciocalteu method. In this reaction, the oxidant probe is reduced by electron transfer from the antioxidants present in honey samples, resulting in a blue colour complex formed with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagent (Folin–Ciocalteu reagent) with a maximum absorbance between 745 and 765 nm.

The colorimetric study indicates that the TPC was  $59.52 \pm 1.31$ ,  $68.36 \pm 1.20$  and  $122.76 \pm 4.20$  mg GAE/100 g honey for LH1, LH3 and DH2, respectively (Table 1) using the standard curve with gallic acid ( $R^2 = 0.9990$ ).

Similarly, according to the standard curve generated by catechin ( $R^2 = 0.9997$ ), the TFC of honey samples was in the same order as observed for polyphenols, with the highest level for DH1 ( $20.55 \pm 0.72$  mg CE/100 mg honey) and the lowest level for LH1 ( $4.80 \pm 0.08$  mg CE/100 mg honey) (Table 1).

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of the three honey samples.

Honey sample	Colour (PMS) <sup>a</sup>	Total phenolic content (mg GAE/100 g honey)	Total flavonoid content(mg CE/100 g honey)
Nectar honey LH1	PMS 128 	59.52 ± 1.31	4.80 ± 0.08
Mixed honey LH3	PMS 129 	68.36 ± 1.20	7.47 ± 0.07
Honeydew honey DH2	PMS 145 	122.76 ± 4.20	20.55 ± 0.72

Note: <sup>a</sup>Colour was classified according to visual analysis and the Pantone Matching System (PMS). GAE = gallic acid equivalents; CE = catechine equivalents.

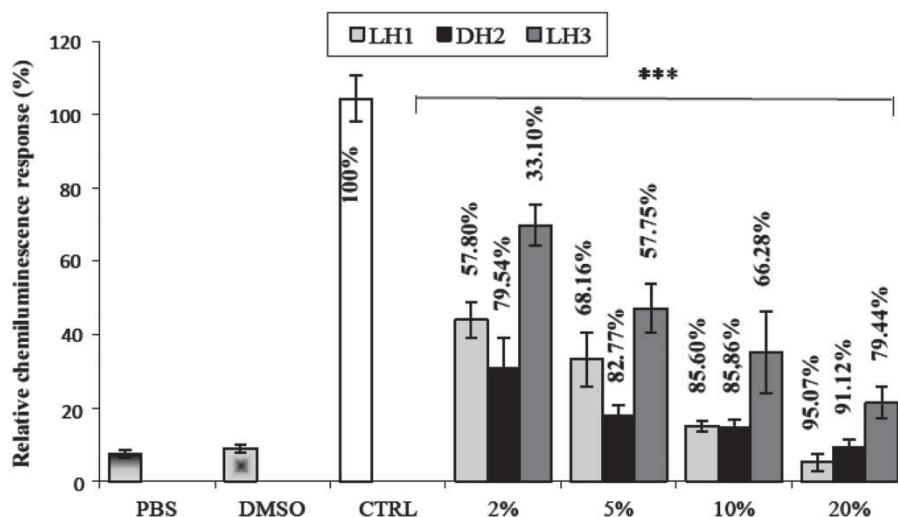


Figure 1. Effect of various concentrations of honey on lucigenin-dependent chemiluminescence. The percentage of inhibition of the chemiluminescence of each honey sample was compared to the control (CTRL), taken as 100% (assay performed without honey). Chemiluminescence values were obtained for unstimulated polymorphonuclear neutrophils in phosphate-buffered saline (PBS) or with the addition of dimethylsulfoxide (DMSO; vehicle of phorbol 12-myristate 13-acetate). Data are shown as mean ± SD ( $n = 9$ ).

\*\*\* $p < 0.0001$  for all honey samples compared to control.

#### ***Effect of various concentrations of honey on production of reactive oxygen species by PMA-stimulated equine neutrophils***

The effect of honey on the ROS production of PMA-activated equine neutrophils was studied by the chemiluminescence technique using lucigenin as a luminescent probe. Before starting the chemiluminescence measurements, neutrophils ( $10^6$  cells/ml PBS) were incubated with diluted honey samples (2%, 5%, 10% and 20%), and the cell viability was estimated by the Trypan Blue exclusion test to check for possible cytotoxicity of the honey sample. The cell viability was  $\geq 96\%$  (data not shown). Figure 1 shows that in the absence of honey samples, the chemiluminescence emission was high (control) compared to the two other controls (non-activated neutrophils with DMSO or PBS). By contrast, when the honey sample was added, at different final concentrations of 2%, 5%, 10% and 20% in the neutrophil suspension, a dose-dependent inhibition of the chemiluminescence was observed (Figure 1). Comparison of the three honey samples indicated that both

DH2 and LH1 samples exerted more pronounced effects than LH3. However, the three samples showed very significant dose-dependent inhibition (Figure 1), which reached 95.07% for LH1, 91.12% for DH2 and 79.44% LH3 at the highest concentration of 20%. The following order of efficiency was observed: DH2 > LH1 > LH3. (The effect of honey observed by chemiluminescence showed a real inhibitory effect on superoxide production and no toxic effect on equine neutrophils. This remains a subject for discussion.)

#### ***Interaction of honey content with the myeloperoxidase active site studied by specific immunological extraction followed by enzymatic detection***

The SIEFED technique is a licensed method developed by Franck et al. (2006) for the specific detection of equine MPO by its peroxidasic activity.  $\text{NO}_2^-$  is used for the first reduction of the compound I (CpI) to the intermediate oxo-ferryl form II (CpII) of MPO. Then, CpII is reduced to the

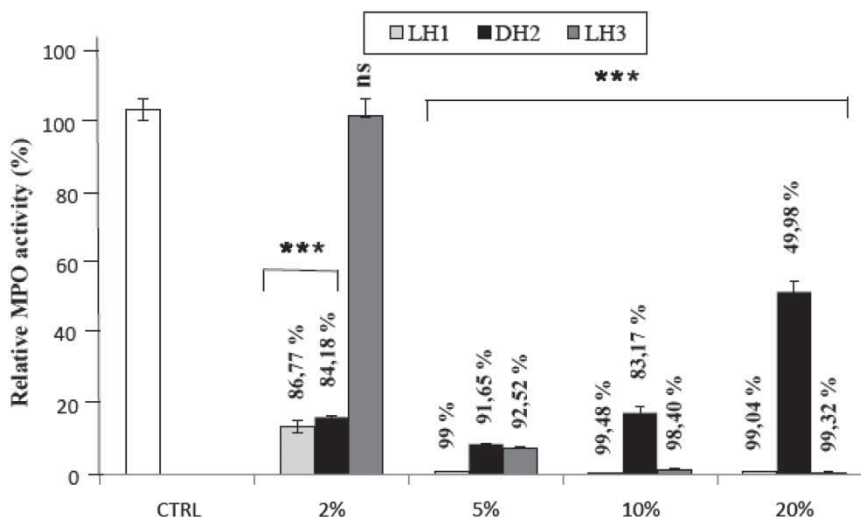


Figure 2. Interaction of honey with myeloperoxidase (MPO) studied by the specific immunological extraction followed by enzymatic detection (SIEFED) technique. Control (CTRL): activity of the enzyme in the absence of honey, taken as 100%. Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 12$ ).

\*\*\* $p < 0.0001$  for all samples and at all concentrations versus CTRL, except for LH3 at 2% concentration; ns = not significant vs control.

ferric form (native enzyme,  $\text{Por-Fe}^{3+}$ ) using Amplex Red as a fluorogenic substrate.

As shown in Figure 2, the enzyme activity in the absence of any honey sample remained very high, while the incubation of honey samples with the MPO enzyme led to different effects on the activity. Overall, a strong significant inhibition ( $p < 0.0001$ ) was observed for all types of honey at all dilutions tested (2%, 5%, 10% and 20% in PBS buffer), except for LH3 at 2%, in comparison to the MPO control with PBS, which was set as 100% activity. When honeys were diluted at 20%, the activity of MPO was inhibited by 99.04% and 99.32% with LH1 and LH3, respectively, while the inhibitory effect of DH2 reached a value of 49.98%.

## Discussion

From the literature, it is known that the antioxidant activity of honeys can be associated with their combined activities with enzymes, oxidases, etc. (Gheldof et al. 2002). Also, it is established that honeys from various sources exhibit a strong correlation between their content of phenolic compounds and their antioxidant and antibacterial activities (Gheldof et al. 2002; Alvarez-Suarez et al. 2013). As summarized in Table 1, honeydew honey (DH2) has the highest levels of polyphenols and flavonoids while nectar honey (LH1) has the lowest levels of polyphenols and flavonoids. The phenolic content of honey depends on the geographical and botanical origin. Darker honeys have a higher content of polyphenols than light-coloured honeys (Blasa et al. 2006; Bertoneceli et al. 2007). The results herein are in accordance with those of Khallil et al. (2012), who found a high level of polyphenols and flavonoids in

the studied Algerian honeys, which further indicates their high antioxidant potential. Proline was also detected in high concentrations (1692–2712 mg/kg) in all of the Algerian honey samples tested. The authors concluded that the total proline content may be a critical factor responsible for the antioxidant activity of Algerian honey.

Numerous tests have been developed for measuring the antioxidant capacity of food and biological samples. However, there is no universal method that can measure the antioxidant capacity of all samples accurately and quantitatively. The antioxidant capacity depends on the assay method and the radical source used (Prior et al. 2005).

In the present study, *in vitro* cellular and enzymatic models were used to represent biological conditions. A lucigenin-enhanced chemiluminescence assay was used because lucigenin is a good luminescent probe to measure the extracellular  $\text{O}_2^-$  by stimulated neutrophils (Vladimirov & Proskurnina 2009). All the honeys tested induced dose-dependent inhibition of the  $\text{O}_2^-$  production by stimulated neutrophils. These results are in agreement with those obtained by previous studies. Leong et al. (2011) reported that honey exhibited potent and dose-dependent reduction of human neutrophil superoxide anion production *in vitro*. Other groups also described a scavenger activity of honey on  $\text{O}_2^-$  using the xanthine-xanthine oxidase system (Henriques et al. 2006; Van den Berg et al. 2008). Honey was also found to decrease the luminol-enhanced chemiluminescence in opsonized zymosan-stimulated whole blood and isolated leucocytes (Mesaik et al. 2008). In the present study, the dark honey (DH2) had the greatest effect on the oxidant response of neutrophils, and this can be explained by its higher content of polyphenol and flavonoids. It is generally found

that darker honeys possess stronger antioxidant activities than lighter ones (Frankel et al. 1998; Taormina et al. 2001; Socha et al. 2009). The darker the honey, the higher its phenolic content and its antioxidative power (Gheldof et al. 2002; Blasa et al. 2006; Bertonceli et al. 2007; Vela et al. 2007; Marghitas et al. 2009). It has also been shown that honeydew honeys possess higher antioxidant capacities than nectar ones (Vela et al. 2007; Lachman et al. 2010). On the other hand, during the activation of neutrophils, there is a subsequent release of MPO which, in combination with ROS production, can make MPO functional. Indeed, in the presence of superoxide dismutase,  $O_2^-$  yields  $H_2O_2$ , which is the substrate of MPO. As honey samples were efficient towards ROS production, it appeared interesting to evaluate their putative effect on the activity of the MPO enzyme.

Very few studies have investigated the effects of honey on the activity of MPO. Medhi et al. (2008) reported that manuka honey has the ability to reduce the MPO level in rats induced with ulcerative colitis. According to Papineni and Orton (2012), intraperitoneal administration of honey in a rabbit model significantly enhanced the MPO activity, resulting in neutrophil stimulation. In these studies, MPO was investigated as a marker of neutrophil infiltration or stimulation. This work focused on the effect of honey content on the specific activity of MPO through its active site. The catalytic activity of MPO is partitioned between halogenation and peroxidation *via* competition between peroxidase substrates and (pseudo)halides for compound I. Such competition is involved in the modulation of the enzyme activity (Davies 2011). In addition, variations in the pH value may change the priority of the enzyme with respect to a substrate. At acidic pH values, MPO will catalyse preferably the formation of HOCl *via* its chlorination cycle, whereas at neutral pH values the oxidation of phenolic substrates can be observed *via* the peroxidase cycle of MPO (Vlasova et al. 2006).

The SIEFED technique used in this study allows the peroxidase cycle of the enzyme to be examined. No chloride anions are added to the revelation solution, so that HOCl cannot be generated by MPO activity and thus cannot react directly with honey. Moreover, by the immunocapture of MPO, SIEFED allows the removal of all interfering substances not bound by the antibodies before measurement of the enzyme activity. Thus, the free honey solutions, after incubation with MPO, were removed before the detection of MPO activity. If inhibition of the enzyme is observed after the elimination of honey, it means that some molecules from honey are bound to the enzyme and inhibit its peroxidase activity.

All the honeys inhibited the MPO activity at all dilutions tested (2–20% in PBS buffer), except for LH3 at the lowest dilution (2%). Some molecules found in the honeys can interact with or bind to MPO, and either modify the enzyme structure or hinder the access of the substrate into the active site, thus acting as competitive substrates.

The active site of human MPO is located in a hydrophobic cavity with a narrow, oval-shaped opening (Fiedler et al. 2000). It can be expected that polyphenols or other honey compounds could hinder or block the entry of this cavity. Jiao et al. (2006) showed that curcuminoids could act as iron chelators, and it cannot be excluded that such a chelating activity could also be possible with some honey components. Further studies are needed to confirm this hypothesis. The potent iron chelator deferoxamine neither reacts with nor removes the iron of MPO (Klebanoff & Waltersdorff 1988).

Surprisingly, the honey DH2, at low concentration, inhibited strongly the activity of MPO but the activity increased progressively when the concentration increased. Such an effect could depend on the concentration ratio between antioxidants and the target (Magalhães et al. 2008). This notion is consistent with *in vitro* observations showing that phenolic compounds can induce pro-oxidant or antioxidant activity depending on the chemical environment (Laranjinha et al. 1995; Chan et al. 2003). The phenol/peroxidase reaction has been generally regarded as a mechanism by which the pro-oxidant activity of natural polyphenols is mediated in animal cells (Galati et al. 2002). However, it has been suggested that MPO may be involved in the antioxidant activity of phenolic compounds in endothelial cells under oxidative stress (Lee et al. 2009). Therefore, one must be aware that honey is a very complex mixture containing numerous phenolic components that could modulate the activity of MPO. Further studies are needed to determine whether these honey compounds could have a synergistic or a competitive effect in their binding to MPO.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs Ariane Niesten and Jennifer Romainville for their technical assistance.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by Centre for Oxygen, Research and Development (CORD), University of Liege, funded by the National Fund for Scientific Research (NFSR) Belgium.

### References

- Ahmed M, Aissat S, Djebli N. 2012. How honey acts as an antioxidant? *Medicinal Aromatic Plants*. 1:1–2.
- Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Battino M. 2013. Honey as a source of dietary antioxidants: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr Med Chem*. 20:621–638.
- Amaral S, Mira L, Nogueira JM, Da Silva AP, Florêncio HM. 2009. Plant extracts with anti-inflammatory properties –A

- new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure–antioxidant activity relationships. *Bioorg Med Chem*. 17:1876–1883.
- Arnhold J, Flemmig J. 2010. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch Biochem Biophys*. 500:92–106.
- Benbarek H, Deby-Dupont G, Deby C, Caudron I, Mathy-Hartert M, Lamy M, Sertheyn D. 1996. Experimental model for the study by chemiluminescence of the activation of isolated equine leucocytes. *Res Vet Sci*. 61:59–64.
- Bertonceli J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem*. 105:822–828.
- Blasa M, Candiracci M, Accorsi A, Piacentini MP, Albertini MC, Piatti E. 2006. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem*. 97:217–222.
- Chan TS, Galati G, Pannala AS, Rice-Evans C, O'Brien PJ. 2003. Simultaneous detection of the antioxidant and pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system. *Free Radic Res*. 37:87–94.
- Davies MJ. 2011. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr*. 48:8–19.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. 1998. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 391:393–397.
- Escuredo O, Silva LR, Valentão P, Seijo MC, Andrade PB. 2012. Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chem*. 130:671–678.
- Fauzi AN, Norazmi MN, Yaacob NS. 2011. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food Chem Toxicol*. 49:871–878.
- Fiedler TJ, Davey CA, Fenna RE. 2000. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8Å resolution. *J Biol Chem*. 275:11964–11971.
- Franck T, Grulke S, Deby-Dupont G, Deby C, Duvivier H, Peters F, Sertheyn D. 2005. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood. *J Vet Diagn Invest*. 17:412–419.
- Franck T, Kohnen S, Deby-Dupont G, Grulke S, Deby C, Sertheyn D. 2006. A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in *in vitro* tests. *J Vet Diagn Invest*. 18:326–334.
- Frankel S, Robinson GE, Berenbaum MR. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of fourteen unifloral honey. *J Apic Res*. 37:27–31.
- Galati G, Sabzevari O, Wilson JXO, O'Brien PJ. 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177:91–104.
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem*. 50:5870–5877.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 92:3007–3017.
- Henriques A, Jackson S, Cooper R, Burton N. 2006. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *J Antimicrob Chemother*. 58:773–777.
- Jiao Y, Wilkinson JIV, Pietsch EC, Buss JL, Wang W, Planalp R, Torti FM, Torti SV. 2006. Iron chelation in the biological activity of curcumin. *Free Radic Biol Med*. 40:1152–1160.
- Khallil MI, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam A, Islam N, Sulaiman SA, Gan SH. 2012. Physicochemical and antioxidant properties of algerian honey. *Molecules*. 17:11199–11215.
- Klebanoff SJ, Waltersdorff AM. 1988. Inhibition of peroxidase-catalyzed reactions by deferoxamine. *Arch Biochem Biophys*. 264:600–606.
- Kwakman PH, te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CM, Zaat SA. 2010 Jul. How honey kills bacteria. *FASEB J*. 24(7):2576–82.
- Lachman J, Orsák M, Alena H0, Eva K. 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honey. *LWT-Food Sci Technol*. 43:52–58.
- Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. 1995. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Arch Biochem Biophys*. 323:373–381.
- Lee SJ, Mun GI, An SM, Boo YC. 2009. Antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose plus arachidonic acid. *BMB reports* 561.
- Leong AG, Herst PM, Harper JL. 2011. Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple antiinflammatory activities. *Innate Immun*. 18:459–466.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL. 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analyt Chim Acta*. 613:1–19.
- Medhi B, Prakash A, Avti PK, Saikia UN, Pandhi P, Khanduja KL. 2008. Effect of manuka honey and sulfasalazine in combination to promote antioxidant defense system in experimentally induced ulcerative colitis model in rat. *Indian J Exp Biol*. 46:583–590.
- Mesaik MA, Azim MK, Mohiuddin S. 2008. Honey modulates oxidative burst of professional phagocytes. *Phytother Res*. 22:1404–1408.
- Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA, Gan SH. 2012. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant. *J Tradit Complement Altern Med*. 9(36):42.
- Papineni RVL, Orton S. 2012. Intraperitoneal Administration of Honey Elicit Robust Luminescence Signals from Myelo, peroxidase Activation. Presentation at World Molecular Imaging Congress Dublin, Ireland September 5–8. 2012. <http://fr.scribd.com/doc/100813301/Honey-Medicinal-Value-and-Mechanism-Dr-Rao-Papineni>.
- Prior RL, Wu XL, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 53:4290–4302.
- Pycock JF, Allen WE, Morris TH. 1987. Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous Percoll density gradient. *Res Vet Sci*. 42:411–412.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299:152–178.
- Socha R, Juszczak L, Pietrzyk S, Fortuna T. 2009. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chem*. 113:568–574.
- Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microbiol*. 69:217–225.

- Van den Berg AJ, van den Worm E, van Ufford HC, Halkes SB, Hoekstra MJ, Beukelman CJ. 2008. An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *J Wound Care*. 17:172–4–176–8.
- Vela L, De Lorenzo C, Pérez RA. 2007. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *J Sci Food Agric*. 87:1069–1075.
- Vladimirov YuA, Proskurnina EV. 2009. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc)*. 74:1545–1566.
- Vlasova II, Arnhold J, Osipov AN, Panasenko OM. 2006. pH-Dependent regulation of activity of myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)*. 71:667–677.
- Zuckerman ZH, Bryan N. 1996. Inhibition of LDL oxidation and myeloperoxidase dependent tyrosyl radical formation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene (LY139481 HCL). *Atherosclerosis*. 126:65–75.

## Effect of Honey on Hydroxyl Radical Generation, Glutathione Depletion And on Myeloperoxidase Released in the Extra-Cellular Milieu by Activated Neutrophils

<sup>1</sup>Saad Aissat, <sup>2</sup>Hama Benbarek, <sup>3,4</sup>Thierry Franck, <sup>3</sup>Ginette Deby-Dupont,  
<sup>3,4</sup>Didier Serteyn and <sup>3</sup>Ange Mouithys-Mickalad

<sup>1</sup>Institute of Veterinary Sciences, Ibn Khaldoun University, Tiaret 14000, Algeria.

<sup>2</sup>Faculty of Sciences of Nature and Life, Mascara University, Mascara 29000, Algeria

<sup>3</sup>Centre for Oxygen, Research and Development (CORD),

Institute of Chemistry B6a, University of Liège, Sart Tilman, 4000 Liège 1, Belgium

<sup>4</sup>Department of Clinical Sciences, Large Animal Surgery,

Faculty of Veterinary Medicine, B41, University of Liège, Sart Tilman, 4000 Liège 1, Belgium

**Abstract:** Using Electron spin resonance we have shown that (1): nectar honey (NH) and mixed honey (MH) at 2% and 5% (w/v) generate the hydroxyl radical (OH) via Fenton-like reactions and noticed a partial quenching of this radical at 10% (w/v). Honeydew honey (HH) produced partial quenching at 2%, strong quenching of OH at 5% (w/v) and complete quenching at 10% (w/v). (2): the three honey types honey exhibited a biphasic activity on glutathione (GSH) depletion, as they lead to GSH depletion and increase reactive oxygen species (ROS) generation at low concentrations, but prevent this depletion at higher concentrations. The present study investigates also the effects of honey on the release of myeloperoxidase (MPO) by equine neutrophils (PMNs) activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), we noticed also a biphasic effect. At low concentration the three honeys increased significantly the total MPO released in the extra-cellular milieu by activated PMNs but decreased it significantly at higher concentrations. Honey is a very complex mixture containing a number of ingredients involved in "oxidant/antioxidant" physiological processes, bifunctional activities may occur at different dosages.

**Key words:** Honey • Hydroxyl Radical • Myeloperoxidase • Neutrophils

### INTRODUCTION

Although the basal production of ROS can be beneficial to maintain the redox homeostasis, still the excessive production of ROS, followed by a depletion of endogenous antioxidant enzymes, remains responsible for the disruption of the redox state balance named "oxidant stress". Among these species,  $\bullet\text{OH}$  a potent oxidizing agent capable of reacting with a wide variety of targets over very short distances has been implicated in different models of neutrophil-mediated tissue injury.  $\bullet\text{OH}$  cytotoxic effects have been shown for both prokaryotic and eukaryotic cells; bacteria, yeast and human cells [1-3]. For example,  $\bullet\text{OH}$  production from  $\text{H}_2\text{O}_2$  by neutrophil granules is a first line of defense against bacteria during

acute inflammation. Similarly, the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced injury in *Escherichia coli* appears to be mediated by  $\bullet\text{OH}$  via Fenton reaction [2,4].  $\bullet\text{OH}$  reacts indiscriminately with most metabolites and macromolecules, in many cases generating other radicals in the process [1].

During the inflammatory process, phagocytosis by PMNs is highly correlated with the respiratory burst and often accompanied by neutrophils degranulation and the extracellular release of enzymes such as MPO. MPO is also found to a much lesser extent in monocytes and some macrophages [5]. MPO has long been considered a key constituent of the neutrophil's cytotoxic armament by catalyzing the formation of hypochlorous acid, a potent oxidant that displays bactericidal activity *in vitro* [6]. Although the generation of oxidants by MPO is beneficial

in terms of the immune response to invading pathogens, inappropriate stimulation of oxidant formation by this enzyme (wrong place, wrong time, excessive levels) can result in host tissue damage [7].

Most of publications the higher level of MPO was connected to enhanced free radicals productions. However, some observations expand this view and show that MPO-derived oxidants are critically involved in a more subtle modulation of signaling pathways [8]. It has been also suggested that MPO might be involved in the antioxidant, not pro-oxidant, activity of phenolic compounds in endothelial Cells under oxidative stress [9]. Peroxidases mediate *in vitro* the pro-oxidant or antioxidant activity of phenolic compounds, depending on the chemical environment [10].

Reduced GSH, a thiol-containing tripeptide, is a significant contributor for maintaining the intracellular redox state and, as such, is an important component of the overall cellular defensive mechanisms against ROS. An important function of this intracellular antioxidant is to scavenge ROS produced during normal aerobic cellular respiration; if left unchecked, such ROS could oxidize and, thereby, damage nucleic acids, proteins and lipids [11]. Several studies have noted greater depletions of intracellular GSH in cancer, than in normal, cells upon their exposures to polyphenols. Normal cells maintain a proper intracellular redox status with their antioxidant enzymes and their sufficient supply of reduced GSH and thus are less susceptible to cytotoxic damage by pro-oxidant polyphenols [12].

It is widely accepted that honey is beneficial to health, thanks to its antioxidant properties among all of its beneficial aspects. Explanation(s) remain obscure and the mechanism by which it acts also so far remains to be elucidated. The antioxidant activity of honey has been extensively studied, but there are remarkable discrepancies in the published data. The main cause and far from being negligible is that honey is a very complex mixture containing a number of ingredients involved in "oxidant/antioxidant" physiological processes [13]. Besides the direct antimicrobial effects of honey [14], research has also focused on identification of the substances responsible for its anti-inflammatory [15-16] and immunomodulatory effects [17-19]. It has been proposed that the antioxidant capacity of honey is due mainly to the phenolic compounds and flavonoids they contain and there is a high correlation between polyphenols and honey antioxidant capacity, if possible a synergistic effect is observed on honey polyphenols and the more than 181 compounds that form part of honey [20].

The concept "antioxidant" is usually linked to free radical scavenging and that ROS are essentially harmful and should be eliminated. However, the purpose of the "antioxidant defense network" is not to remove all ROS, but to control their levels so as to allow useful functions whilst minimising oxidative damage [21]. Honey seems to either reduce or activate the production of reactive oxygen species from neutrophils. Honey and its components are able to either stimulate or inhibit the release of certain cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6) from human monocytes and macrophages. Honey seems also, to either reduce or activate the production of reactive oxygen species from neutrophils. Similarly, human keratinocytes, fibroblasts and endothelial cell responses (e.g., cell migration and proliferation, collagen matrix production, chemotaxis) are positively affected in the presence of honey. However, the immunomodulatory activity of honey is highly complex because of the involvement of multiple quantitatively variable compounds among honeys of different origins [22].

The aim of this work was to evaluate the effect of three types of raw Algerian honey on hydroxyl radical produced by the Fenton reaction and glutathione depletion by using Electron Spin Resonance-spin trapping and on MPO Released in the Extra-Cellular Milieu by Activated Neutrophils (MPO-ELISA Assay). At the best of our knowledge the two latter studies have never been achieved so far in the case of honey.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents:** 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), parantitrophenyl phosphate, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Percoll were purchased from Sigma (Bornem, Belgium), FeSO<sub>4</sub> was purchased from Merck. Horseradish peroxidase (HRP), diethylenetetramine penta acetic acid (DTPA) were purchased from Boehringer Mannheim, Trypan blue was from ICN Biomedicals, Inc (Ohio, USA). Analytical-grad NaCl, KCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, were supplied by Merck (VWRI, Leuven, Belgium). all aqueous solutions were prepared with water previously purified in a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA)

**Honey Samples:** Three samples of Algerian honey, honeydew honey (HH), mixed honey (MH1) and nectar honey (NH), were directly obtained from beekeepers, belonging to different geographical regions. Raw honeys used in this study were not submitted to thermal



treatments or to pasteurization or any other operation able to alter natural composition. Honey samples were stored at 4°C in the dark until further analysis. The three varieties of honey are in accordance with international standards (CARI ABSL, Belgium, which performed the analysis).

**Blood Collection and Isolation of PMNs:** Blood samples were drawn from healthy horses by jugular venipuncture in 9 ml vacutainer tubes with EDTA (1.6 mg/ml blood) as anticoagulant. The horses were clinically normal; they were fed, bred and housed under identical conditions and not under medical treatment (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). PMNs were isolated following the technique of Pycocock *et al.* [23] on a discontinuous density gradient of Percoll formed by a 1.108 g/ml solution, overlaid with a 1.1087 g/ml solution. The anticoagulated whole blood, laid on the top of the gradient, was centrifuged at 400g for 20 min at 20°C. The PMNs were collected at the interface between the 2 gradient layers and washed in 2 volumes of physiological saline solution. The cell pellets were suspended in 20 mM phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl. The cell preparation was =96% neutrophils with a viability of 97% as measured by the trypan blue exclusion test. Each batch of neutrophils was obtained from 60 ml blood drawn from one horse, the cells were used immediately after isolation, the experiment was completed within 5 hours and each assay was performed in triplicate. Each experiment was repeated at least twice with different cell batches.

Before the experiments, neutrophils ( $10^6$  cells/ml PBS) were incubated with diluted honey samples (2, 5, 10 and 20%) and the cell viability was estimated by the trypan blue exclusion test in order to exclude a cytotoxicity of the honey.

**Electron Spin Resonance (ESR)-spin Trapping Experiments:** Electron spin (or electron paramagnetic) resonance (ESR) is a spectroscopic technique that detects unpaired electrons present within the sample. As such, ESR is the only accurate approach that can provide direct evidence for the presence of a free radical. In addition, the analysis of the ESR spectrum generally enables the determination of the identity of the free radical [24]. Because of their short lifetime, the detection of such free radicals is very difficult in biological samples and therefore, spin trap agents (nitrones) are used to form adducts with a higher lifetime.

Effect of honey on hydroxyl radical produced by the Fenton reaction.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µl, 10<sup>-3</sup> M) in the presence of FeSO<sub>4</sub> (25 µl, 10<sup>-4</sup> M), DTPA (25 µl, 10<sup>-4</sup> M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 µl, 10<sup>-3</sup> M) and DMPO (50 µl, 100 mM) were added to each honey sample at the final concentration of 2, 5 or 10% (w/v). The reaction mixtures were immediately transferred into the flat cell in the TM cavity of the spectrometer. ESR spectra were recorded at room temperature on a Bruker spectrometer (Bruker ESP300E, Bruker, Kalsruhe, Germany) operating at X-band frequency (9.8 GHz) and at non-saturating microwave power (20 mW). The instrumental settings were the following: 100 KHz modulation frequency, 1.012 G modulation amplitude, 3480 G magnetic field center and receiver gain was 2.10<sup>4</sup>. The sweep width was 100 G and the total number of scans was 6. The hyperfine splitting constants were measured from the experimental spectra by means of a Bruker Win-Simfonia program running under Microsoft Windows. The Fenton reaction in the absence of honey sample was considered as a positive control (Ctrl) for DMPO-OH adducts and the signal height of its ESR spectrum was taken as 100%.

**EPR Spin Trapping Investigation of the Effect of Honey on the Thiyl Radical Generation:** The reaction mixtures 25mg/mL HRP, 10mM GSH, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 100 mM DMPO in phosphate buffer (pH 7, 5) were added to each honey sample at final concentrations of 2% and 10% and immediately transferred into the flat cell in the TM cavity of the spectrometer. ESR spectra were recorded at room temperature on a Bruker spectrometer (Bruker ESP300E, Bruker, Kalsruhe, Germany) operating at X-band frequency (9.8 GHz) and at non-saturating microwave power (20 mW). The instrumental conditions were as follows: microwave power, 20 mW; receiver gain, 2x 10<sup>4</sup>; time constant, 164 ms; time conversion, 40,96 ms; center field, 3480± 50 G and number of scan, 2. The hyperfine splitting constants were measured from the experimental spectra by means of a Bruker Win-Simfonia program running under Microsoft Windows. The EPR signal, corresponding to the spin adduct of DMPO/thiyl (GS●) resulted from the reaction of DMPO with the GS● radicals produced by the HRP enzymatic activity on GSH. The EPR signal obtained in the absence of honey was taken as the control spectrum (Ctrl).

**Effect of honey on Total MPO Released in the Extra-Cellular Milieu by Neutrophils Activated with PMA (MPO-ELISA Assay):** The neutrophil suspensions ( $10^6$  cells/mL) were incubated for 10 min at 37 °C in

darkness with honey at final concentrations of 2, 5, 10 and 20% (w/v) for each honey sample and then activated for 30 min at 37 °C once again in darkness with PMA at the final concentration of 0.8 μM. After activation, the cell suspensions were centrifuged for 10 min (450 g) and the supernatants were collected. To measure the total MPO released by activated neutrophils in the extra-cellular milieu, an original Equine MPO ELISA assay designed by Franck *et al.* [25] was performed, using a specific kit provided by BiopTis (Liège, Belgium). Briefly, polyclonal antibodies against equine MPO were obtained in rabbit and coated on 96 wells-microtiter plates. The supernatants, which contained MPO released by the cells, were diluted 200-fold with PBS, loaded into the wells and incubated at 4 °C overnight. After washing, a second polyclonal antibody against equine MPO, raised in guinea pigs and labeled with alkaline phosphatase, was loaded into the wells and incubated for 2 h in darkness. After an ultimate washing, the wells were loaded with a solution of paranitrophenyl phosphate for the measurement of phosphatase activity and incubated for 30 min at 37 °C in darkness. The absorbance (405 nm) proportional to the content of MPO in the wells was read with Multiscan Ascent (Thermo Scientific). The control was performed with neutrophils activated with PMA in presence of PBS instead of honey and was taken as 100% MPO release to compare with the effects of honey.

**Statistical Analysis:** Determination the effect of honey on total MPO released by PMA-activated PMNs was done in triplicate. The n value of one experimental point was 5. Data are given as mean ± SD and statistical analysis was performed with Graph PadInStat 3.05 (Graph Pad Software, San Diego California, USA). A p value < 0.05 was considered as significant.

## RESULTS

**Effect of Various Types of Honey on Hydroxyl Radical Produced by the Fenton Reaction:** The Fenton reaction is based on the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by an electron donated by metal ions to produce hydroxyl radical (\*OH). Iron is used as an electron donor. We used the spin trap 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), which reacts with \*OH to form a relatively stable paramagnetic species, the DMPO-OH spin adduct with a characteristic four-line ESR spectrum (quartet with 1:2:2:1 intensities) [24]. Figure 1a and 1b spectrum 1 shows the ESR spectra obtained from the trapping of hydroxyl radicals (\*OH) by DMPO in the absence of honey samples (Ctrl). The addition to the complete system of 2% (w/v) of NH resulted in more

complex spectra with an increased intensity of the four-line ESR signal attributed to the DMPO-OH adducts (sign Ø spectrum 2 in Fig. 1b) and a new signal (sign \* spectrum 2 in Fig 1b). Similar data were obtained with MH, but are not presented here. When, 5% of NH (w/v) were added to the complete system, there was no real modification of the shape of the ESR signal intensity attributed to DMPO-OH adducts and the new signal as shown in Fig. 1a spectrum 3. Upon addition of 10% of NH we noticed a decrease of the height of the spectrum VsCtrl. In contrast, the lines attributed to the unidentified species were enhanced (Fig 1a spectrum 4). The addition of HH at 2 % (w/v) already resulted in a slight decrease of the 4-line ESR spectrum of DMPO-OH adduct (sign Ø in Fig 1b spectrum 2), the new signal was also present. When high concentrations of HH (5 and 10% w/v) were added to the mixture, the lines corresponding to DMPO-OH adducts were strongly reduced and even totally disappeared for the highest concentration of 10 %. In contrast, the second ESR signal (\*) enhanced dramatically (Fig. 1b spectra 3 and 4).

**EPR Spin Trapping Investigation of the Effect of Honey on the Thiyl Radical Generation:** The peroxidase-catalysed oxidation system allowed investigation of the formation of the thiyl (GS●) radical intermediate triggered by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of a peroxidase (HRP). This system was designed to assess the capability of honey to protect glutathione from the oxidant attack by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP couple (Fig 2). Fig (2a) shows EPR spectrum characteristic of the thiyl radical produced by the enzymatic system HRP/GSH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of DMPO (control). The addition to the complete system of 2% (w/v) of HH and NH resulted in an increased intensity of the four-line ESR signal attributed to the thiyl radical adduct, MH being slightly active (Fig 2b). The four-line EPR spectrum was totally abolished when HH, NH and MH at final concentration of 5% was added to the reaction mixture (Fig 2c).

**Effect of Honey on Total MPO Released in the Extra-Cellular Milieu by Neutrophils Activated with PMA (MPO-ELISA Assay):** The MPO amount released by activated PMNs (Ctrl PBS), in which PBS was used instead of honey, was set as 100% MPO release (Ctrl). The addition of NH, HH and MH honey at the final concentration of 2% increased respectively the MPO release by 96,76%;64,48% and 15,53%. The addition of NH and HH honey at the final concentration of 5% also increased respectively the MPO release by 47, 59% and 28,71%, while no significant effect was observed for

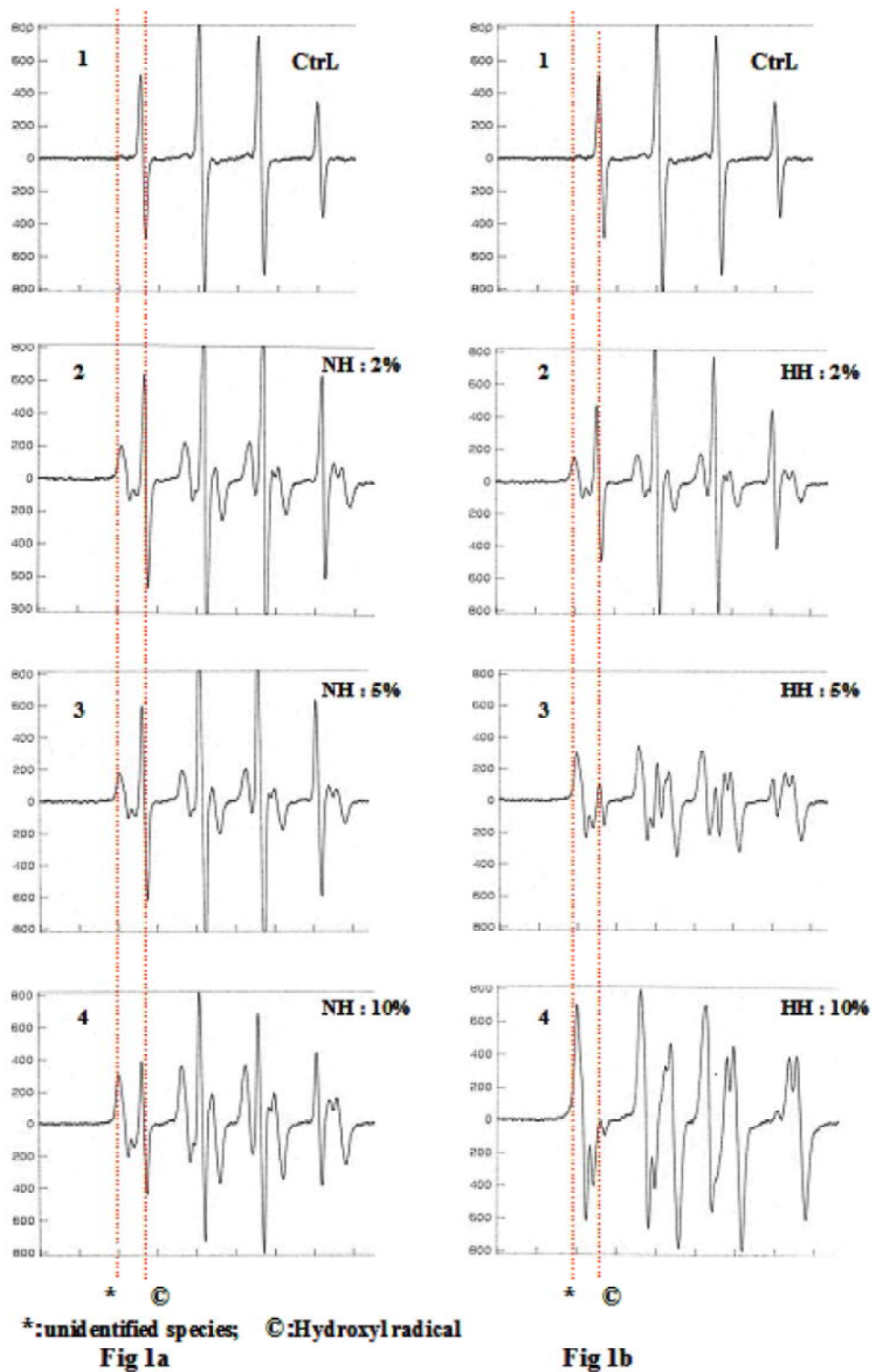


Fig. 1: Hydroxyl radical (OH) by fenton reaction ( $Fe^{2+}/DTPA/H_2O_2$ ) and effects of honey (Fig 1a) ESR spectra obtained from the trapping of hydroxyl radicals ( $\bullet OH$ ) by DMPO in the absence of honey samples (Ctrl). (1b): same as (1a) but with addition of honey at final concentration of 2% (w/v). (1c): same as (1a) but with addition of honey at final concentration of 5% (w/v). (1d): same as (1a) but with addition of honey at final concentration of 10% (w/v). The instrument settings are listed in material and methods

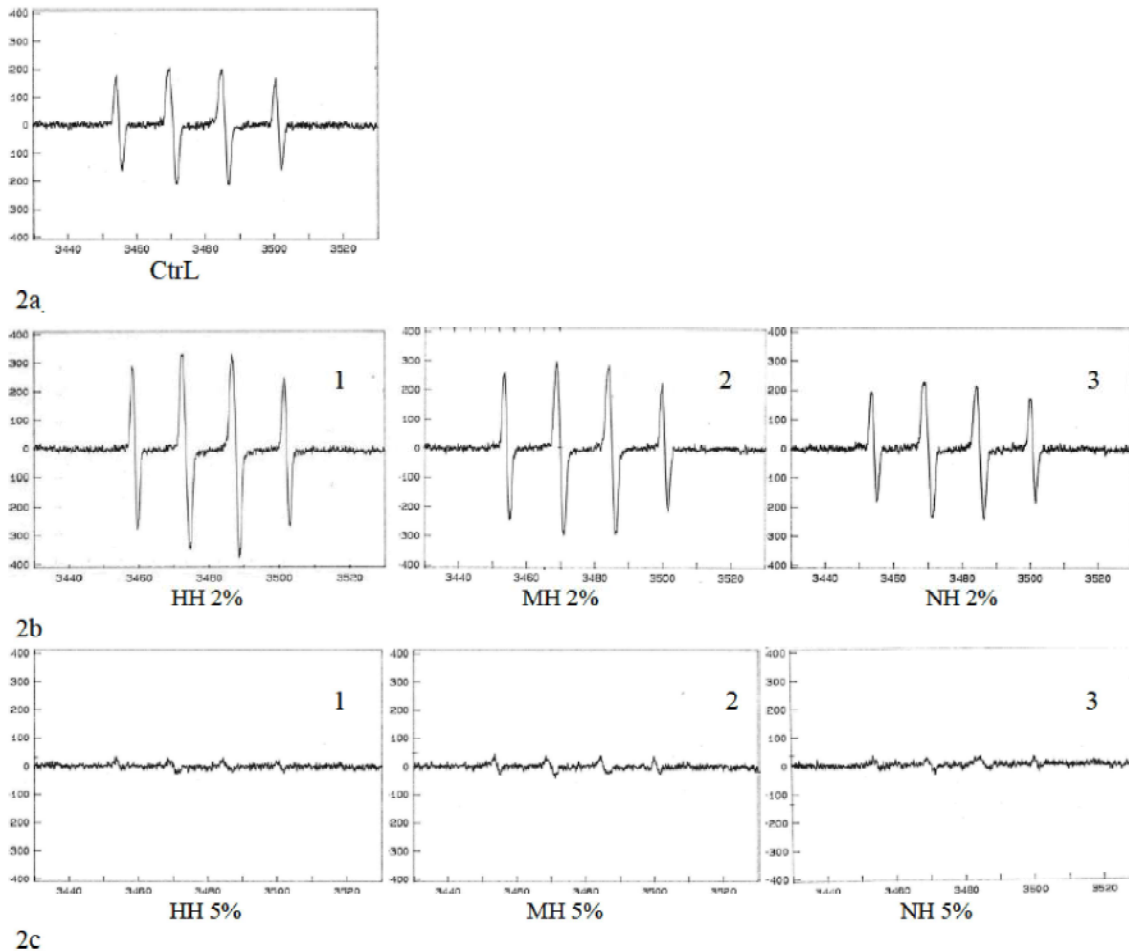


Fig. 2: Thiyl (GS•) radical produced by the enzymatic system (HRP/GSH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and effects of honey. (2a): Complete system.HRP/GSH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DMPO. (2b): same as (2a) but with addition of honey at final concentration of 2% (w/v).(2c): same as ( 2a) but with addition of honey at final concentration of 5% (w/v).The instrument settings are listed in materiel and methods.

MH at the same concentration. Meanwhile the addition of NH, HH and MH honey at the final concentration of 10% and 20% decreased respectively the MPO release by 12,7% ; 50%; 30,55% and 60.21; 59.96; 59.33.

### DISCUSSION

In the present work we found that NH and MH honeys at 2% and 5% (w/v) generate •OH via Fenton-like reactions with generation of unidentified species Fig 1a spectrum 2 and 3). In1994, Mason *et al.* [24] ascertained that since the Fenton reaction requires hydrogen peroxide, a substance that catalyzes hydrogen peroxide formation would increase the signal. It is well established that honeys contain glucose oxidase enzyme which catalyses the formation of hydrogen peroxide, after honey

dilution[26]. Since the rates of hydrogen peroxide production increase with honey concentrations until the optimal dilution at which honey produces the maximal amounts of hydrogen peroxide (which is between 40 and 60%) [26],and since •OH generation increases with honey dilution [27],it would thus be expected an increase of the DMPO-OH signal intensity when the concentrations of honey increased.

Therefore, 10 % NH (w/v) were added to the complete system and the shape of the ESR spectrum was monitored. In contrary, we noticed a partial quenching of •OH, but the lines attributed to the unidentified species were enhanced (Fig 1a spectrum 4).

Addition of HH produced partial quenching at 2%, strong quenching of OH at 5% (w/v) and complete quenching at 10% (w/v), the signal attributed to the new

species enhanced dramatically. The other radical species observed could not be unequivocally identified Fig 1b spectra 2, 3 and 4).

Alvarez-Suarez *et al.* [28] previously noticed that all Cuban honeys studied generated  $\bullet\text{OH}$  to varying extents via the Fenton reaction. While in another study carried out by the same authors, it was found on the contrary that all the studied Cuban honeys scavenged the  $\bullet\text{OH}$  generated via the Fenton reaction [29]. In a similar study Henriques *et al.* [30], studying three types of honey (Manuka honey, pasture honey P59 and artificial honey), reported that only pasture honey P59 was able to generate free radicals. These authors concluded that additional unidentified species might arise from secondary reactions involving free radicals and the organic components of honey. It must be noticed that these authors used only a single dilution. Honeys were shown to cause oxidative damage that restricted bacterial growth and caused cytotoxic degradation of DNA due to the formation of  $\bullet\text{OH}$  and appear to involve some components in honey that have not yet been identified [27,31].

As, the other radical species observed could not be unequivocally identified, we cannot state here if the quenching of  $\bullet\text{OH}$  may represent an antioxidant or prooxidant effect of honey. Honey's therapeutic properties are largely attributed to its antimicrobial and anti-oxidant activities. Bactericidal activity could be due to  $\bullet\text{OH}$  and possibly to these secondary organic radicals. Any antibacterial properties of honey will thus be a balance between the opposing activities of radical generation and quenching [30].

GSH is an intracellular antioxidant which accounts for over 90% of the intracellular non-protein thiols [32]. It is commonly viewed as an universal free radical scavenger and major intracellular antioxidant [33]. In *in vivo* studies, honey was found to maintain or enhance the level of non-protein sulfhydryl substances (such as GSH) [34]. Similar observation was made by Korkmaz *et al.* [35]) and Galal *et al.* [36]. In agreement with what precedes, it appears from our results that at 5% (w/v) the three honey types prevent GSH depletion (Fig 2b).

While strategies for increasing GSH levels were developed to increase cellular defenses and resist toxicity, strategies for depleting GSH were developed to increase the sensitivity of tumors and certain parasites to radiation, drugs or endogenous killing mechanisms [37]. Apoptosis is a conserved homeostatic process critical for organ and tissue morphogenesis, development and senescence. This form of programmed cell death also participates in the etiology of several human diseases including cancer, neurodegenerative and autoimmune disorders Although

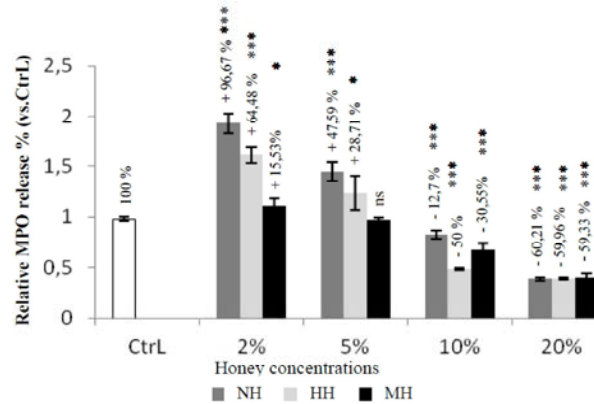


Fig. 3: Effect of honey on Total MPO Released in the Extra-Cellular Milieu by Neutrophils Activated with PMA (MPO-ELISA Assay). Columns and bars represent mean  $\pm$  standard deviation of the results of five measurements. \*Significant difference (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P<0.001) vs. Ctrl. +: enhancement;-inhibition; ns: no significant

initial studies suggested that GSH depletion was only a byproduct of oxidative stress generated during cell death, recent discoveries suggest that GSH depletion plays a critical as regulator of apoptosis [38].

According to Jaganathan and Mandal. [39], honey at low concentration (3% v/v) induced apoptosis of the HCT-15 and HT-29 colon cancer cells by causing the depletion of intracellular non-protein thiols and increasing the reactive oxygen species (ROS) generation. In line with these findings, we have also shown in the present study that honey at low concentrations causes a depletion of GSH and increase ROS generation (Fig 2c).

Compared to Ctrl, the three honey samples at 10% and 20% (w/v) decreased significantly the total MPO released in the extra-cellular milieu by activated PMNs (Fig 3).

Very few studies reported the effect of honey on MPO even though Medhi *et al.* [40] reported that Manuka Honey reduced the MPO level in rats induced ulcerative colitis. Honey was also found to decrease the luminol-enhanced chemiluminescence in opsonised zymosan-stimulated whole blood and isolated leukocytes [41]. But, as was the case for GSH depletion, at the best of our knowledge there is not available published data on the effect of honey on the release of MPO from activated PMNs.

Surprisingly, except for MH at 5% the three honey types at 2% and 5% increased significantly the total MPO released in the extra-cellular milieu by activated PMNs (Fig 3).

However, upon its release from neutrophils, the enzyme becomes inactive very frequently in tissue microenvironment. Therefore, both enzymatically active MPO and enzymatically inactive MPO are present at inflammatory sites [42].

According to Papineni and Orton [43] after, intraperitoneal administration of a single dose honey 0,1 ml (50% v/v) in athymic nude mice, significant enhancement in MPO activity was observed within 3 hrs-probably after that honey has been over diluted by corporal fluids-with robust PMNs activation at different lymph nodes. According to Lau *et al.* [8] independently of his catalytic action MPO exerts leukocyte-activating functions, an event reminiscent of other PMN-derived potent pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-8.

Which should attract attention in this study is that the honey presents a “pro-oxidant” effect at such low concentration. In another context, it has been shown previously that honey at 1% (w/v) significantly enhanced the expression of MMP-9 mRNA in primary cultures of human keratinocytes [17] and stimulate human monocytic cells to produce inflammatory cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ) important in resolution of infection and tissue repair [44].

Similarly, it has been shown that honey at low concentration stimulates the immune system; in particular, the multiplication of  $\beta$ -lymphocytes and T-lymphocytes [45], increases phagocytic activity [45-46] and induces the chemotactic activity of isolated neutrophils [47] The stimulatory activity of honey at low concentration is probably due to a low level of an inflammatory/stimulatory mediator is honey [17, 45].

Virtually no research has been conducted on the biphasic effect of honey except that it has been shown by Tsiapara *et al.* [48] that honey exhibited a biphasic activity in breast cancer MCF-7 cells depending on the concentration-an antiestrogenic effect at low concentrations and an estrogenic effect at high concentrations.

## CONCLUSION

The present findings suggest that honey exhibit a biphasic activity on hydroxyl radical generation, glutathione depletion and MPO release by activated neutrophils. Being “pro-oxidant” at low concentration and “antioxidant” at high concentration in a variable extent depending on honey type. Thus, by acting as an antioxidant and pro-oxidant, honey may produce both

beneficial and adverse effects important in the prevention and pathogenesis of disease.. The mechanisms by which honey affects the release of MPO and the GSH depletion need to be clarified. However, our results herein may represent framework for further studies. Nevertheless, the immunomodulatory activity of honey is highly complex because of the involvement of multiple quantitatively variable compounds among honeys of different origins.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mrs Ariane Niesten and Jennifer Romainville for their technical assistance. This work was supported by Centre for Oxygen, Research and Development (CORD), University of Liège, funded by the NFSR (National Fund for Scientific Research) Belgium.

## REFERENCES

1. Halliwell, B., 1995. The biological significant of oxygen-derived species. J.S. Valentine, C.S. Foote, A. Greenberg and J.F. Liebman (Eds.), Active Oxygen in Biochemistry, Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp: 313-335.
2. Imlay, J.A. and S. Linn, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science, 240: 1302-1309.
3. Perrone, G.G., S.X. Tan and I.W. Dawes, 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. Biochim. Biophys. Acta, 1783: 1354-1368.
4. Imlay, J.A., S.M. Chin and S. Linn, 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. Science, 240: 640-642.
5. Davies, M.J., C.L. Hawkins, D.I. Pattison and M.D. Rees, 2008. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. Antioxid Redox Signal, 10(7): 1199-1234.
6. Winterbourn, C.C., 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid Toxicology, pp: 181-182, 223-227.
7. Michael, J., 2011. Davies. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. J Clin Biochem Nutr. Jan; 48(1): 8-19.
8. Denise Lau, Hanke Mollnau, Jason P. Eiserich, Bruce A. Freeman, Andreas Daiber, Ursula M. Gehling, Jens Brümmer, Volker Rudolph, Thomas Münzel, Thomas Heitzer, Thomas Meinertz and Stephan Baldus, 2005. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b\_CD18 integrins. PNAS, 102(2): 431-436

9. Lee, S.J., G.I. Mun, S.M. An and Y.C. Boo, 2009. Antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose plus arachidonic acid BMB reports, pp: 561.
10. Chan, T.S., G. Galati, A.S. Pannala, C. Rice-Evans and P.J. O'Brien, 2003. Simultaneous detection of the antioxidant And pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidise system. Free Radic. Res., 37: 87-794.
11. Moskaug, J.O., H. Carlsen, M.C. Myhrstad and R. Blomhoff, 2005. "Polyphenols and glutathione synthesis regulation," The American Journal of Clinical Nutrition, 71: 16985-17025, View at Scopus.
12. Harvey Babich, Alyssa G. Schuck, Jeffrey H. Weisburg and Harriet L. Zuckerbraun, 2011. Research Strategies in the Study of the Pro-Oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals. Journal of Toxicology.
13. Ahmed, M., S. Aissat and N. Djebli, 2012. How Honey Acts as an Antioxidant? Medicinal Aromatic Plants, 1: 1-2.
14. Kwakman, P.H., A.A. teVelde, L. De Boer, D. Speijer, C.M. Vandenbroucke-Grauls and S.A. Zaat, 2010. How honey kills bacteria. FASEB J., 24: 2576-2582.
15. Kassim, M., M. Achoui, M. Mansor and K.M. Yusoff, 2010. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E(2) in inflammatory tissues. Fitoterapia, 81: 1196-1201.
16. Van den Berg, A.J., E. van den Worm, H.C. van Ufford, M.J. Halkes, M.J. Hoekstra and C.J. Beukelman, 2008. An *in vitro* examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. J. Wound Care, 17: 172-178.
17. Majtan, J., P. Kumar, T. Majtan, A.F. Walls and J. Kludiny, 2010. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. Exp. Dermatol., 19: e73-e9.
18. Ranzato, E., S. Martinotti and B. Burlando, 2012. Epithelial mesenchymal transition traits in honey-driven keratinocyte wound healing: comparison among different honeys. Wound Repair Regen, 20: 778-785.
19. Tonks, A.J., R.A. Cooper, K.P. Jones, S. Blair, J. Parton and A. Tonks, 2003. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. Cytokine, 21: 242-247.
20. Elizabeth Pérez-Pérez, Patricia Vit and FazlulHuq, 2013. Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. Int. J. Med. Plant Altern. Med., 1(4): 063-072, April 2013.
21. Halliwell, B., 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? Archives of Biochemistry and Biophysics, 476: 107-112.
22. Juraj Majtan, Honey, 2014. An immunomodulator in wound healing. Wound Rep Reg., 22: 187-192.
23. Pycocock, J.F., W.E. Allen and T.H. Morris, 1987. Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous Percoll density gradient. Res. Vet. Sci., 42: 411-412.
24. Mason, R.R., P.M. Hanna, M.J. Burkitt and M.B. Kadiiska, 1994. Detection of Oxygen-derived Radicals in Biological Systems Using Electron Spin Resonance. Environ Health Perspect, 102(S 10): 33-36.
25. Franck, T., S. Grulke, G. Deby-Dupont, C. Deby, H. Duvivier, F. Peters and D. Serteyn, 2005. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood. J. Vet. Diagn. Invest, 17: 412-419.
26. Bang, L.M., C. Bunting and P.C. et Molan, 2003. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. J. Altern. Compl. Med., 9: 267-73.
27. Brudzynski, K. and R. Lannigan, 2012. Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. Front Microbiol., 3: 36.
28. Alvarez-Suarez, J.M., S. Tulipani, D. Díaz, Y. Estevez, S. Romandini, F. Giampieri, E. Damiani, P. Astolfi, S. Bompadre and M. et Battin, 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food Chem. Toxicol., 48: 2490-2499.
29. José, M., 2012. Alvarez-Suarez and Francesca Giampieri and Elisabetta Damiani and Paola Astolfi and Daniele Fattorini and Francesco Regoli and José L. Quiles and Maurizio Battino. Radical-scavenging Activity, Protective Effect Against Lipid Peroxidation and Mineral Contents of Monofloral Cuban Honeys. Plant Foods Hum Nutr., 67: 31-38.
30. Henriques, A., S. Jackson, R. Cooper and N. Burton, 2006. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58: 773-777.

31. Brudzynski, K., K. Abubaker, L. St-Martin and A. Castle, 2011. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front Microbiol.*, 2: 213.
32. Baruchel, S., G. Bounous and P. Gold, 1994. Place for an antioxidant therapy in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *J. Nutr.*, 112: 1747-1755.
33. Grigory, G. Borisenko, Ian Martin, Qing Zhao, Andrew A. Amoscatto, Yulia Y. Tyurina and Valerian E. Kagan, 2004. Glutathione Propagates Oxidative Stress Triggered by Myeloperoxidase in HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 23453-23462.
34. Al Swayeh, O.A. and A.T.M.M. Ali, 1998. Effect of ablation of capsaicin sensitive neurons on gastric protection by honey and sucralfate. *Hepato-Gastroenterol.*, 45: 297-302.
35. Asli Korkmaz and Dürdane Kolankaya, 2009. Anzer honey prevents N-ethylmaleimide-induced liver damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61: 333-337.
36. Reem, M. Gallal, Hala F. Zaki, Mona M. Seif El-Nasr and M. Azza, 2012. Agha. Potential Protective Effect of Honey Against Paracetamol-induced Hepatotoxicity. *Archives of Iranian Medicine*, 15: 11.
37. Angel, L., 2011. Ortega, Salvador Mena and Jose M. Estrela. Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers*, 3: 1285-1310; doi: 10.3390/cancers3011285.
38. Franco, R. and J.A. Cidlowski, 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*, 16: 1303-1314.
39. Jaganathan and Mandal, 2010. Saravana Kumar Jaganathan and MahitoshMandal. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2009, Article ID 830616, pp: 13.
40. Medhi, B., A. Prakash, K. AvtiP, N. SaikiaU, P. Pandhi and K.L. Khanduja, 2008. Effect of Manuka honey and sulfasalazine in combination to promote antioxidant defense system in experimentally induced ulcerative colitis model in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46: 583-590.
41. Mesaik, M.A., M.K. Azim and S. Mohiuddin, 2008. Honey modulates oxidative burst of professional phagocytes. *Phytotherapy Research*, 22(10): 1404-1408.
42. Kumar, A.V., 2010. Sharma. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*, 10: 1325-1334.
43. Papineni, R.V.L. and S. Orton, 2012. Intraperitoneal Administration of Honey Elicit Robust Luminescence Signals from Myelo,peroxidase Activation. Presentation at World Molecular Imaging Congress Dublin, Ireland September 5-8, 2012[http://fr.scribd.com/doc/100813301/ Honey-Medicinal-Value-and-Mechanism-Dr-Rao-Papineni](http://fr.scribd.com/doc/100813301/Honey-Medicinal-Value-and-Mechanism-Dr-Rao-Papineni).
44. Tonks, A.J., E. Dudley, N.G. Porter, J. Parton, J. Brazier, E.L. Smith and A. Tonks, 2007. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *J. Leukoc Biol.*, 82(5): 1147-55.
45. Nizar Abuharfeil, Rateb Al-ORan and Mahmoud Abo-Shehada, 1999. The Effect of Bee Honey on the Proliferative Activity of Human B-and T-Lymphocytes and the Activity of Phagocytes. *Food and Agricultural Immunology*, 11(2): 169-177.
46. Shehab Ahmed Lafi, Huda R. Sabar Al-Dulaimy and Muntaha M. Al-Aloosi, 2012. Honey depots phagocytosis *in vitro* *Anb. Med. J.*, 10(1): 13-17.
47. MayukoMiyagawa, Miki Fukuda, Yuriko Hirono, Ayaka Kawazoe, Eri Shigeyoshi, Masaaki Sakura, Toru Takeuchi, Osamu Mazda, Kent E. Pinkerton and Minoru Takeuchi, 2010. Effect of Jungle honey on the chemotactic activity of neutrophils. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(4): 149-154.
48. Tsiapara, A.V., M. Jaakkola, I. Chinou, K. Graikou, T. Tolonen, V. Virtanen and P. Moutsatsou, 2009. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chem.*, 116: 702-708.



# **ANNEXES**

---

## **Solutions et réactifs**

### **1/ Isolement des neutrophiles équins**

#### **➤ Solution tamponnée PBS (Phosphate Buffer Saline)**

-Composition d'une solution tampon PBS cinq fois concentrée (PBS 5X) : Dans un litre d'eau distillé dissoudre : NaCl (40g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>anhydre (5,75g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g), KCl (1g). Amener le PBS à pH : 7,4 avec de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré avant d'ajuster le volume à un litre. A partir du PBS 5X, préparer du PBS 1X en ajoutant 4 volumes d'eau distillée à 1 volume de PBS 5X.

#### **➤ Solution tamponnée HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)**

- Composition d'une solution dix fois concentrée (HBSS 10X) : Pour un litre d'eau distillé dissoudre : NaCl (80g), KCl (4g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>anhydre (0,48g), NaHCO<sub>3</sub> (0,6g). Amener le HBSS à pH : 7,4 avec de l'Hydroxyde de sodium (NaOH) avant d'ajuster le volume à un litre. A partir du HBSS 10X, préparer une solution d'HBSS 1X en ajoutant 9 volumes d'eau distillée à 1 volume d'HBSS 10X.

#### **➤ Solution de Percoll**

Le Percoll est un milieu constitué de microbilles de silice enrobées de polyvinylpyrrolidone qui permet la séparation des cellules sanguines en fonction de leur densité. En optant pour un gradient discontinu de Percoll à deux concentrations différentes (70% et 85%), les neutrophiles sont isolés au niveau de la deuxième couronne de cellules formées à partir de la surface de Percoll.

Au départ d'une solution commerciale de Percoll (densité 1,128kg/l, Sigma), préparer une solution stock concentrée à 90% en ajoutant 9 volumes de Percoll commercial à 1 volume d'HBSS 10X. A partir de cette solution stock de Percoll (90%) et du tampon HBSS 1X réaliser :

-Une solution stock de Percoll à 70% : pour 7 volumes de solution stock rajouter 3 volumes d'HBSS 1X. et une solution de Percoll à 85% : pour 8,5 volumes de solution stock rajouter 1,5 volume d'HBSS 1X.

➤ **Solution d'éclatement des globules rouges (Hémolyse)**

Pour un litre d'eau distillée : NaCl (8020mg soit 0,15mM), EDTA (37mg soit 0,10mM), NaHCO<sub>3</sub> (840mg soit 10mM). Amener le pH de la solution d'éclatement des globules rouges à 7,4 avec du NaOH 1M avant d'ajuster le volume à un litre.

**2/Détection de la chimiluminescence des EROs produites par les PMNs**

**Réactifs** : DMSO (Dimethyl sulfoxyde) ; CaCl<sub>2</sub> :1,1 mg pour 1 ml d'eau ;Lucigénine : 2,5 mg pour 1 ml d'eau distillée ; PMA (phorbol myristate acétate) : ajouter 990 µl d'eau distillée à un aliquote de 10µl de PMA solubilisé dans le DMSO et stocké à -20°C de manière à obtenir une solution de PMA à  $1,6 \times 10^{-5}$  M.

**3/ Dosage ELISA de la MPO totale dégranulée par les PMNs activés.**

- **Tampon de coatage** : Composition par litre d'eau distillée : NaCl :08 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O : 1,42 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,2 g, KCl : 0,2 g. La solution finale doit être à pH 7,4. A cette fin, si le pH est supérieur à 7,4 ajouter du HCl, si le pH est inférieur à 7,4, ajouter du NaOH.
- **Tampon de blocage** : 50 mg BSA (Sérum Albumine Bovine),10 ml de tampon coatage
- **Solution de lavage (tampon PBS/tween)** : Composition pour 1 litre d'eau : Tampon PBS IX (pH 7,4),NaCl :8 g,KCl : 0,2 g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhydre : 1,15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,2 g, Tween 20 : 1 ml.

#### **4/ Dosage SIEFED**

Tampon de coatage, tampon de blocage, solution de lavage (idem que ce qui précède)  
et tampon de dilution de la MPO (cf annexes).

##### **➤ -Tampon phosphate**

Composition pour un litre d'eau :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 6,8 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 8,9 g. Amener le pH à 7,4  
s'il ne l'est pas.

-Solution de nitrite de sodium : Nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) : 34,5 g, Eau distillée : 10 ml.

-Solution de peroxyde d'hydrogène

Préparer des solutions successives à partir d'une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30%.

- S1 : à 990  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée ajouter 10  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30% afin d'obtenir une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,3%.

##### **➤ Solution d'amplex red**

Solution stock d'amplex red : 20  $\mu\text{l}$  (aliquote contenant 5 mg d'Amplex red par ml de DMSO ; Tampon phosphate à pH 7,4 : 998 ml ; 100  $\mu\text{l}$  de la solution S2 d' $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

# INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 4011210

Vos références: 4

Interprétation des résultats : HD-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES	INFORMATIONS CONSOMMATEURS
Humidité : Humidité normale HMF :  Enzymes : Teneur en saccharase normale Commentaire : Miel présentant un flore du bassin méditerranéen Myrthacées = Eucalyptus	<b>Type de miel : Citrus dominant</b> Origine botanique : Citrus, brassicacées, rosacées, apiacées ...  Origine géographique : Condition pour une conservation optimale à moins de 20°C À consommer de préférence avant fin juin 2011 Période de récolte: de l'année
<b>ODEURS</b> <span style="float: right;">Intensité</span>	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> chimique* <input type="checkbox"/> exogène <input checked="" type="checkbox"/> flor./fruit. <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input type="checkbox"/> fraîche <input type="checkbox"/> avancée*	Intensité des odeurs <b>discrète</b>
<b>ARÔMES</b> <span style="float: right;">Intensité</span>	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ doux ⇒ sirop de sucre <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input checked="" type="checkbox"/> Frais ⇒ rafraîchissant <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input type="checkbox"/> Chimique* <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ végétal sec <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input type="checkbox"/> Avancé*	Intensité des arômes <b>discrète</b> Saveurs et arômes : <b>Miel très doux aux notes florales et végétales</b>
<b>SAVEURS ET SENSATIONS</b> <span style="float: right;">Intensité</span>	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input checked="" type="checkbox"/> Acide <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <span style="float: right;">■ ■ ■</span> <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante	Intensité des saveurs et sensations <b>moyenne</b>
<b>ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES</b> ⇒ Néant	<b>L'échantillon analysé répond aux normes légales et aux critères de qualité conseillés</b>
<b>PERSISTANCE</b>	
<span style="float: right;">■ ■ ■</span>	

## b) Essai non accrédité

Miel n° 4011210

### ● Sucres (% matière fraîche)

#### Monosaccharides

Fructose	<b>40,10</b> ± 3,32
Glucose	<b>35,43</b> ± 2,14
Fructose/Glucose	<b>1,13</b>

#### Disaccharides

Maltose + indét.	<b>2,27</b> ± 1,32
Turanose + indét.	<b>0,19</b> ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	<b>0,21</b> ± 0,38
Saccharose	<b>1,65</b> ± 0,10
Tréhalose	<b>0,00</b> ± 0,10
Gentiobiose	<b>0,00</b>
Palatinose	<b>0,00</b> ± 0,08

#### Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 13/07/2010

#### Trisaccharides

Raffinose	<b>0,22</b> ± 0,12
Erlose	<b>0,64</b> ± 0,16
Mélézitose	<b>0,00</b> ± 0,40
Maltotriose	<b>0,00</b> ± 0,32
Panose	<b>0,00</b> ± 0,59
Isomaltotriose	<b>0,00</b> ± 0,09

## 2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 15/07/2010

### ● Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	<b>Apiacées (11%), Rosacées (26%), Brassicacées (35%)</b>
Pollens isolés (<10%)	<b>Acacia, Myrthacées, Pissenlit, Saule, Renoncule, Astéracées, Lamiacées, Trèfle, Cistacée, Ronces</b>
Pollens isolés significatifs	Citrus (8%)
Elements figurés	

## 3. Examen organoleptique (non accrédité)

### 3.1. Présentation

Examen visuel	Homogène
<u>Couleur:</u> miel liquide (Pfund)	
miel cristallisé (Pantone)	128 Jaune Pâle

<u>Consistance de l'échantillon:</u>	
à son entrée au laboratoire	Tartinable
à sa sortie	Tartinable
Cristallisation	Fine
Sablage	

### 3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

<u>ODEURS</u>		<u>type d'odeurs</u>
Intensité	discrète	Chaude Flor./fruit. Boisée

<u>ARÔMES</u>		<u>type d'arôme, évoquant</u>
Intensité	discrète	
Chaud	3	⇒ Doux ⇒ sirop de sucre
Floral/fruity	2	⇒ Floral
Frais	1	⇒ Rafraîchissant
Chimique*		
Boisé	2	⇒ Végétal sec
Avancé*		

<u>SAVEURS ET SENSATIONS</u>		
SAVEURS	Intensité	moyenne
	Sucrée	2
	Acide	1
SENSATIONS	Amère	
	Astringente	1
	Froid	
	Piquante	

#### ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE 1

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.



# Rapport d'essai



Accrédité selon la norme  
ISO 17025  
Certificat n°312-TEST

## CARI ASBL

4, Place Croix du Sud  
B - 1348 Louvain-la-Neuve  
BELGIQUE  
Tél. : +32 (0)10/47 34 16  
Fax. : +32 (0)10/47 34 94  
e-mail : info@cari.be  
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 22/07/2010

ULG

SERTEYN Didier  
Boulevard de Colonster, 20-B41

4000 liege

## Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 4

Période de récolte: de l'année

## Informations du laboratoire:

Miel n° 4011210

Reçu au laboratoire le 09/07/2010

## 1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue  
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats HD

### a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

● Humidité(%) **17,11** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 13/07/2010

Seuil conseillé ≤ 18 %  
Norme légale ≤ 20 %

● pH et acidité

pH **3,9** ± 0,2  
pH au point d'équivalence **6,5** ± 0,3  
Acidité libre (AL) (méq/kg) **12,1** ± 1,05 (si AL < 40)  
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

Acidité libre :

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Norme légale ≤ 50

Analysé le 15/07/2010

● Conductivité(mS/cm) **0,29** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 20/07/2010

Norme légale  
Miel de miellat ≥ 0,8

● Indice de saccharose

**10,6** ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

Seuil conseillé

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

IS > 10

Analysé le 16/07/2010

et si IS < 10,  
ID/IS ≤ 2,5

○ HMF(mg/kg) ± 1,9

Méthode de Winkler

"non détecté" : HMF ≤ 1,2

Norme légale

"non quantifié" : 1,2 < HMF ≤ 3,5

HMF ≤ 40

miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

Norme légale

ID > 8

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

ou miel d'agrumes...

ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.



**CARI ASBL**  
4, Place Croix du Sud  
B - 1348 Louvain-la-Neuve  
BELGIQUE  
Tél. : +32 (0)10/47 34 16  
Fax. : +32 (0)10/47 34 94  
e-mail : info@cari.be  
http://www.cari.be

## Rapport d'essai Humidité



Accrédité selon la norme  
ISO 17025  
Certificat n°312-TEST

Louvain-la-Neuve, le 13/07/2010

**ULG**

SERTEYN Didier  
Boulevard de Colonster, 20-B41

4000 liege

---

### Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 4

Période de récolte: de l'année

### Informations du laboratoire:

**Miel n° 4011210**

Reçu au laboratoire le 09/07/2010

---

### EXAMEN DE L'HUMIDITÉ

TENEUR EN EAU en % : **17,11** ± 0,2

**Mesuré par réfractométrie à 20°C**

Analysé le 13/07/10

*Intervalle rencontré: 13,5 - 23 %*

*Seuil conseillé ≤ 18 %*

*Norme légale (AR relatif au miel du 19/03/2004) ≤ 20%*

Bandes APAQ-W demandées :

Bandes APAQ-W délivrées :

---

N° de début de série

N° de fin de série

Validation des résultats HD

**Vos autres essais et/ou étiquettes suivront accompagnées de la facturation.**



# INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 3011209

Vos références: 3

Interprétation des résultats : HD-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES	INFORMATIONS CONSOMMATEURS
<p>Humidité : Miel très sec</p> <p>HMF :</p> <p>Enzymes : Miel assez riche en saccharase</p> <p>Commentaire : Miel présentant un flore du bassin méditerranéen Myrthacées = Eucalyptus</p>	<p><b>Type de miel : Nectar &amp; Miellat</b></p> <p>Origine botanique : Rhamnacées, brassicacées, astéracées, miellat ...</p> <p>Origine géographique :</p> <p>Condition pour une conservation optimale à moins de 20°C</p> <p>À consommer de préférence avant fin juin 2011</p> <p>Période de récolte: de l'année</p>
<p><b>ODEURS</b> <span style="float: right;">Intensité</span></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> chimique* <input type="checkbox"/> exogène  <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input checked="" type="checkbox"/> boisée  <input type="checkbox"/> fraîche <input checked="" type="checkbox"/> avancée*</p>	<p>Intensité des odeurs <b>moyenne</b></p>
<p><b>ARÔMES</b> <span style="float: right;">Intensité</span></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ caramélisés <span style="float: right;">■ ■ ■</span>  <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ floral <span style="float: right;">■ □ □</span>  <input checked="" type="checkbox"/> Frais ⇒ rafraîchissant ⇒ anis <span style="float: right;">■ □ □</span>  <input type="checkbox"/> Chimique*  <input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné <span style="float: right;">■ ■ □</span>  <input type="checkbox"/> Avancé*</p> <p><small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small></p>	<p>Intensité des arômes <b>moyenne</b></p> <p>Saveurs et arômes : <b>Miel caramélisé aux notes résinées</b></p>
<p><b>SAVEURS ET SENSATIONS</b> <span style="float: right;">Intensité</span></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <span style="float: right;">■ ■ ■</span>  <input checked="" type="checkbox"/> Acide <span style="float: right;">■ ■ □</span>  <input checked="" type="checkbox"/> Amère <span style="float: right;">■ □ □</span>  <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <span style="float: right;">■ □ □</span>  <input type="checkbox"/> Froid  <input type="checkbox"/> Piquante</p>	<p>Intensité des saveurs et sensations <b>moyenne</b></p>
<p><b>ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES</b></p> <p>⇒ Néant</p> <p><b>PERSISTANCE</b></p> <p style="text-align: right;">■ ■ □</p>	<p><b>L'échantillon analysé répond aux normes légales et aux critères de qualité conseillés</b></p>

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.

## b) Essai non accrédité

Miel n° 3011209

### ● Sucres (% matière fraîche)

#### Monosaccharides

Fructose	<b>36,65</b> ± 3,32
Glucose	<b>26,36</b> ± 2,14
Fructose/Glucose	<b>1,39</b>

#### Disaccharides

Maltose + indét.	<b>5,95</b> ± 1,32
Turanose + indét.	<b>4,09</b> ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	<b>1,66</b> ± 0,38
Saccharose	<b>1,73</b> ± 0,10
Tréhalose	<b>0,00</b> ± 0,10
Gentiobiose	<b>0,00</b>
Palatinose	<b>0,00</b> ± 0,08

Chromatographie en phase gazeuse  
Analysé le 13/07/2010

#### Trisaccharides

Raffinose	<b>0,15</b> ± 0,12
Erlose	<b>3,67</b> ± 0,16
Mélézitose	<b>0,14</b> ± 0,40
Maltotriose	<b>0,00</b> ± 0,32
Panose	<b>0,00</b> ± 0,59
Isomaltotriose	<b>0,00</b> ± 0,09

## 2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.  
Munksgaard, Copenhagen, 486 p.  
Analysé le 14/07/2010

### ● Analyse pollinique

Densité générale	Moyenne
Pollens dominants	Rhamnacées (91%)
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	
Pollens isolés (<10%)	Citrus, Fruitiers, Pissenlit, Rosacées, Trèfle, Apiacées, Chénopodiacées, Ronces, Astéracées, Brassicacées
Pollens isolés significatifs	
Elements figurés	

## 3. Examen organoleptique (non accrédité)

### 3.1. Présentation

Examen visuel	Homogène
Couleur:	
miel liquide (Pfund)	
miel cristallisé (Pantone)	<b>129 Orange Clair</b>

Consistance de l'échantillon:	
à son entrée au laboratoire	<b>Tartinable</b>
à sa sortie	<b>Tartinable</b>
Cristallisation	<b>Très Fine</b>
Sablage	

### 3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

<u>ODEURS</u>		<u>type d'odeurs</u>	
Intensité	<b>moyenne</b>	Chaude	
		Boisée	
		Avancée*	

<u>ARÔMES</u>		<u>type d'arôme, évoquant</u>	
Intensité	<b>moyenne</b>		
Chaud	<b>3</b>	⇒ Caramélisés	
Floral/fruity	<b>1</b>	⇒ Floral	
Frais	<b>1</b>	⇒ Rafraîchissant	⇒ anis
Chimique*			
Boisé	<b>2</b>	⇒ Résiné	
Avancé*			

<u>SAVEURS ET SENSATIONS</u>		
SAVEURS	Intensité	<b>moyenne</b>
	Sucrée	<b>3</b>
	Acide	<b>2</b>
	Amère	<b>1</b>
SENSATIONS	Astringente	<b>1</b>
	Froid	
	Piquante	

#### ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

PERSISTANCE **2**

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.



# Rapport d'essai



Accrédité selon la norme  
ISO 17025  
Certificat n°312-TEST

## CARI ASBL

4, Place Croix du Sud  
B - 1348 Louvain-la-Neuve  
BELGIQUE

Tél. : +32 (0)10/47 34 16  
Fax. : +32 (0)10/47 34 94  
e-mail : info@cari.be  
http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 22/07/2010

ULG

SERTEYN Didier  
Boulevard de Colonster, 20-B41

4000 liege

## Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 3

Période de récolte: de l'année

## Informations du laboratoire:

Miel n° 3011209

Reçu au laboratoire le 09/07/2010

## 1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue  
Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats HD

### a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

● **Humidité (%)** **14,37** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 13/07/2010

Seuil conseillé ≤ 18 %  
Norme légale ≤ 20 %

● **pH et acidité**

pH **5,8** ± 0,2

pH au point d'équivalence ± 0,3

Acidité libre (AL) (méq/kg) **non** ± 1,05 (si AL < 40)  
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

Acidité libre :

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Norme légale ≤ 10

Analysé le 15/07/2010

● **Conductivité (mS/cm)** **0,68** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 20/07/2010

Norme légale  
Miel de miellat ≥ 0,8

● **Indice de saccharose**

**20,1** ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

Seuil conseillé

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

IS > 10

Analysé le 16/07/2010

et si IS < 10,  
ID/IS ≤ 2,5

○ **HMF (mg/kg)** ± 1,9

Méthode de Winkler

"non détecté" : HMF ≤ 1,2

Norme légale

"non quantifié" : 1,2 < HMF ≤ 3,5

HMF ≤ 40

miels tropicaux ≤ 80

○ **Indice diastasique** (échelle de Schade)

± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

Norme légale

ID > 8

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

ou miel d'agrumes...

ID > 3 si HMF < 15 mg/kg

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.



**CARI ASBL**  
4, Place Croix du Sud  
B - 1348 Louvain-la-Neuve  
BELGIQUE  
Tél. : +32 (0)10/47 34 16  
Fax. : +32 (0)10/47 34 94  
e-mail : info@cari.be  
http://www.cari.be

## Rapport d'essai Humidité



Accrédité selon la norme  
ISO 17025  
Certificat n°312-TEST

Louvain-la-Neuve, le 13/07/2010

**ULG**

SERTEYN Didier  
Boulevard de Colonster, 20-B41

4000 liege

---

### Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 3

Période de récolte: de l'année

### Informations du laboratoire:

**Miel n° 1011209**

Reçu au laboratoire le 09/07/2010

---

### EXAMEN DE L'HUMIDITÉ

TENEUR EN EAU en % : **14,37** ± 0,2

**Mesuré par réfractométrie à 20°C**

Analysé le 13/07/10

*Intervalle rencontré: 13,5 - 23 %*

*Seuil conseillé ≤ 18 %*

*Norme légale (AR relatif au miel du 19/03/2004) ≤ 20%*

Bandes APAQ-W demandées :

Bandes APAQ-W délivrées :

N° de début de série \_\_\_\_\_

N° de fin de série \_\_\_\_\_

Validation des résultats HD

**Vos autres essais et/ou étiquettes suivront accompagnés de la facturation.**

*Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.*

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS D'ESSAIS

Nous avons interprété les résultats des essais réalisés sur votre miel, ce qui nous a permis de déterminer son origine et de vous conseiller pour sa conservation.

Miel n° 2011208

Vos références: 2

Interprétation des résultats : HD-EB

INFORMATIONS TECHNIQUES		INFORMATIONS CONSOMMATEURS	
<p>Humidité : Miel légèrement humide</p> <p>HMF :</p> <p>Enzymes : Miel très riche en saccharase</p> <p>Commentaire :</p> <p>Miel présentant un flore du bassin méditerranéen</p> <p>Myrthacées = Eucalyptus</p>		<p><b>Type de miel : Miellat</b></p> <p>Origine botanique : Miellat, myrthacées, apiacées ...</p> <p>Origine géographique :</p> <p>Condition pour une conservation optimale à moins de 15°C</p> <p>À consommer de préférence avant fin juin 2011</p> <p>Période de récolte: de l'année</p>	
<b>ODEURS</b>		<b>Intensité</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> chaude <input type="checkbox"/> flor./fruit. <input type="checkbox"/> fraîche	<input type="checkbox"/> chimique* <input checked="" type="checkbox"/> boisée <input checked="" type="checkbox"/> avancée*	<input type="checkbox"/> exogène	Intensité des odeurs <b>moyenne</b>
<b>ARÔMES</b>		<b>Intensité</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Chaud ⇒ fruits cuits <input checked="" type="checkbox"/> Floral/Fruité ⇒ fruité <input type="checkbox"/> Frais <input type="checkbox"/> Chimique*	<input checked="" type="checkbox"/> Boisé ⇒ résiné et épicé <input type="checkbox"/> Avancé*		Intensité des arômes <b>moyenne</b> Saveurs et arômes : <b>Miel aux notes de fruits cuits</b>
<small>* Les notes "chimiques" ou "avancées" sont liées à la flore butinée par les abeilles, mais ne résultent en aucun cas d'une contamination exogène</small>			
<b>SAVEURS ET SENSATIONS</b>		<b>Intensité</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Sucrée <input checked="" type="checkbox"/> Acide <input type="checkbox"/> Amère <input checked="" type="checkbox"/> Astringente <input type="checkbox"/> Froid <input type="checkbox"/> Piquante			Intensité des saveurs et sensations <b>moyenne</b>
<b>ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES</b>			
⇒ Néant			
<b>PERSISTANCE</b>			

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.

## b) Essai non accrédité

Miel n° 2011208

### ● Sucres (% matière fraîche)

#### Monosaccharides

Fructose	<b>38,75</b> ± 3,32
Glucose	<b>27,25</b> ± 2,14
Fructose/Glucose	<b>1,42</b>

#### Disaccharides

Maltose + indét.	<b>6,42</b> ± 1,32
Turanose + indét.	<b>3,33</b> ± 0,64
Mélibiose et isomaltose	<b>1,75</b> ± 0,38
Saccharose	<b>0,00</b> ± 0,10
Tréhalose	<b>0,00</b> ± 0,10
Gentiobiose	<b>0,00</b>
Palatinose	<b>0,00</b> ± 0,08

#### Chromatographie en phase gazeuse

Analysé le 13/07/2010

#### Trisaccharides

Raffinose	<b>0,16</b> ± 0,12
Erllose	<b>0,00</b> ± 0,16
Mélézitose	<b>0,00</b> ± 0,40
Maltotriose	<b>0,00</b> ± 0,32
Panose	<b>0,00</b> ± 0,59
Isomaltotriose	<b>0,00</b> ± 0,09

## 2. Examen pollinique (non accrédité)

Acétolyse selon Erdtman G. 1969. Handbook of Palynology.

Munksgaard, Copenhagen, 486 p.

Analysé le 14/07/2010

### ● Analyse pollinique

Densité générale	<b>Forte</b>
Pollens dominants	<b>Myrthacées (71%)</b>
Pollens d'accompagnement (de 10 à 40 %)	<b>Apiacées (12%)</b>
Pollens isolés (<10%)	<b>Ronces, Trèfle, Brassicacées, Astéracées, Rosacées</b>

Pollens isolés significatifs  
Elements figurés

## 3. Examen organoleptique (non accrédité)

### 3.1. Présentation

Examen visuel	<b>Homogène</b>
<u>Couleur:</u> miel liquide (Pfund)	
miel cristallisé (Pantone)	<b>145 Terre De Sienne Clair</b>

#### Consistance de l'échantillon:

à son entrée au laboratoire	<b>Onctueux</b>
à sa sortie	<b>Onctueux</b>
Cristallisation	<b>Imperceptible</b>
Sablage	<b>Fin</b>

### 3.2. Profil odorant et gustatif

Légende Contribution à l'intensité 1: mineure 2: de base, 3: dominante

#### ODEURS

Intensité	<b>moyenne</b>	<b>type d'odeurs</b>
		<i>Chaude</i>
		<i>Boisée</i>
		<i>Avancée*</i>

#### ARÔMES

Intensité	<b>moyenne</b>	<b>type d'arôme, évoquant</b>
Chaud	<b>3</b>	⇒ <i>Fruits cuits</i>
Floral/fruité	<b>1</b>	⇒ <i>Fruité</i>
Frais		
Chimique*		
Boisé	<b>2</b>	⇒ <i>Résiné et épicé</i>
Avancé*		

#### SAVEURS ET SENSATIONS

SAVEURS	Intensité	<b>moyenne</b>
	Sucrée	<b>2</b>
	Acide	<b>3</b>
SENSATIONS	Amère	
	Astringente	<b>1</b>
	Froid	
	Piquante	

#### ARÔMES, SENSATIONS EXOGÈNES

⇒ Néant

#### PERSISTANCE

**2**

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.



# Rapport d'essai



Accrédité selon la norme  
ISO 17025  
Certificat n°312-TEST

## CARI ASBL

4, Place Croix du Sud  
B - 1348 Louvain-la-Neuve  
BELGIQUE

Tél. : +32 (0)10/47 34 16

Fax. : +32 (0)10/47 34 94

e-mail : info@cari.be

http://www.cari.be

Louvain-la-Neuve, le 22/07/2010

ULG

SERTEYN Didier

Boulevard de Colonster, 20-B41

4000 liege

### Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 2

Période de récolte: de l'année

### Informations du laboratoire:

Miel n° 2011208

Reçu au laboratoire le 09/07/2010

## 1. EXAMEN PHYSICO-CHIMIQUE

Méthodes adaptées d'Apidologie, 1997, Special Issue

Norme légale : AR relatif au miel du 19/03/2004

Validations des résultats HD

### a) Essais accrédités selon la norme ISO 17025:2005

● Humidité(%) **18,18** ± 0,2

Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 13/07/2010

Seuil conseillé ≤ 18 %

Norme légale ≤ 20 %

● pH et acidité

pH **4,6** ± 0,2

pH au point d'équivalence **6,3** ± 0,3

Acidité libre (AL) (méq/kg) **19,5** ± 1,05 (si AL < 40)  
± 2,20 (si AL > 40)

Mesuré par pHmétrie et titrage au NaOH

"non détecté" : Acidité libre ≤ 1,5

Acidité libre :

"non quantifié" : 1,5 < AL ≤ 3,5

Norme légale ≤ 10

Analysé le 15/07/2010

● Conductivité(mS/cm) **1,03** ± 0,01

Mesuré par conductimétrie à 20°C

Analysé le 20/07/2010

Norme légale

Miel de miellat ≥ 0,8

● Indice de saccharose

**32,1** ± 1,9

Mesuré par spectrophotométrie à 400 nm

"non détecté" : IS ≤ 0,9

Seuil conseillé

"non quantifié" : 0,9 < IS ≤ 2,1

IS > 10

Analysé le 16/07/2010

et si IS < 10,

ID/IS ≤ 2,5

○ HMF(mg/kg) ± 1,9

Méthode de Winkler

"non détecté" : HMF ≤ 1,2

Norme légale

"non quantifié" : 1,2 < HMF ≤ 3,5

HMF ≤ 40

miels tropicaux ≤ 80

○ Indice diastasique (échelle de Schade)

± 2,8

Méthode Phadebas

"non détecté" : ID ≤ 0,26

Norme légale

ID > 8

"non quantifié" : 0,26 < ID ≤ 1,88

ou miel d'agrumes...

ID >3 si HMF < 15 mg/kg

Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.



**CARI ASBL**  
4, Place Croix du Sud  
B - 1348 Louvain-la-Neuve  
BELGIQUE  
Tél. : +32 (0)10/47 34 16  
Fax. : +32 (0)10/47 34 94  
e-mail : info@cari.be  
http://www.cari.be

# Rapport d'essai Humidité



Accrédité selon la norme  
ISO 17025  
Certificat n°312-TEST

Louvain-la-Neuve, le 13/07/2010

**ULG**

SERTEYN Didier  
Boulevard de Colonster, 20-B41

4000 liege

---

## Informations transmises par l'apiculteur:

Vos références: 2

Période de récolte: de l'année

## Informations du laboratoire:

**Miel n° 1011208**

Reçu au laboratoire le 09/07/2010

---

## EXAMEN DE L'HUMIDITÉ

TENEUR EN EAU en % : **18,18** ± 0,2

### Mesuré par réfractométrie à 20°C

Analysé le 13/07/10

Intervalle rencontré: 13,5 - 23 %

Seuil conseillé ≤ 18 %

Norme légale (AR relatif au miel du 19/03/2004) ≤ 20%

Bandes APAQ-W demandées :

Bandes APAQ-W délivrées :

N° de début de série \_\_\_\_\_

N° de fin de série \_\_\_\_\_

Validation des résultats HD

**Vos autres essais et/ou étiquettes suivront accompagnées de la facturation.**

*Les résultats ne sont représentatifs que de l'échantillon transmis au laboratoire. L'échantillonnage est de la responsabilité du demandeur.*