

## Liste des tableaux

|           | <b>Titres</b>   | <b>Pages</b> |
|-----------|---|--------------|
| <b>01</b> | Effets thérapeutiques des produits de la ruche sur le foie et les reins.  | <b>20</b>    |
| <b>02</b> | La composition du miel d'Arbousier.   | <b>24</b>    |
| <b>03</b> | La végétation dans les deux régions de Skikda ( <b>Botaniste : Hamel T.</b> )   | <b>26</b>    |
| <b>04</b> | Description du miel d' <i>Arboutus unedo L.</i> (Miel Amer).  | <b>28</b>    |
| <b>05</b> | Table de CHATAWAY.  | <b>30</b>    |
| <b>06</b> | Table de LUFF-SCHOORL.  | <b>34</b>    |
| <b>07</b> | Propriétés physico-chimiques et la concentration des sucres réducteurs et du saccharose dans le miel sucré et amer.                                       | <b>39</b>    |
| <b>08</b> | Teneurs des composés bioactives dans le miel sucré et amer.   | <b>39</b>    |
| <b>09</b> | Activité anti radicalaire et antioxydante (DPPH et FRAP) du miel sucré et amer.   | <b>41</b>    |
| <b>10</b> | Propriétés physico-chimiques du chlorure du mercure.  | <b>48</b>    |
| <b>11</b> | Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (ONAB).   | <b>49</b>    |
| <b>12</b> | Les différents groupes de rats de l'expérimentation.  | <b>50</b>    |
| <b>13</b> | Les différents produits de la coloration.   | <b>60</b>    |
| <b>14</b> | Variation du poids corporel et du poids relatif des testicules et de l'épididyme chez les rats après 70 jours de traitement (Moyenne $\pm$ SD).           | <b>61</b>    |
| <b>15</b> | Variation de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes chez les rats pendant 70 jours de traitement (Moyenne $\pm$ SD).                       | <b>64</b>    |
| <b>16</b> | Variation des marqueurs du stress oxydatif (CAT, GPx, GSH, MDA) chez les rats pendant 70 jours de traitement (Moyenne $\pm$ SD).                          | <b>67</b>    |
| <b>17</b> | Variation du poids relatif du foie et des reins chez les rats pendant 70 jours de traitement.   | <b>88</b>    |
| <b>18</b> | Variations des enzymes sériques, de la bilirubine totale et directe, des protéines totales et de l'albumine chez les rats pendant 70 jours de traitement. | <b>90</b>    |
| <b>19</b> | Variations du cholestérol et des triglycérides chez les rats pendant 70 jours de traitement.  | <b>95</b>    |
| <b>20</b> | Variations des marqueurs rénaux chez les rats pendant 70 jours de traitement.   | <b>97</b>    |
| <b>21</b> | Variation du calcium, sodium, le chlore et le potassium chez les rats pendant 70 jours de traitement.   | <b>99</b>    |
| <b>22</b> | Variation de la glycémie chez les rats pendant 70 jours de traitement.  | <b>101</b>   |
| <b>23</b> | Variation des marqueurs du stress oxydatif chez les rats pendant 70 jours de traitement.  | <b>103</b>   |

## Liste des figures

|           | <b>Titres</b>  | <b>Pages</b> |
|-----------|--|--------------|
| <b>01</b> | Mécanismes et cibles moléculaires médiateurs des effets du miel.   | <b>19</b>    |
| <b>02</b> | Le miel sucré (1) et amer (2).   | <b>25</b>    |
| <b>03</b> | Carte situationnelle et la distribution de la végétation aux alentours des ruches des deux types de miels.                   | <b>26</b>    |
| <b>04</b> | Différents constituants de l'arbre <i>Arbutus unedo</i> : branche d'arbre, fleurs, fruit mûr et non mûr.                     | <b>28</b>    |
| <b>05</b> | Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.   | <b>36</b>    |
| <b>06</b> | Courbe d'étalonnage de la catéchine.   | <b>36</b>    |
| <b>07</b> | Courbe d'étalonnage de l'acide tannique  | <b>37</b>    |
| <b>08</b> | Teneurs totales en polyphénols du miel sucré et amer. mg EAG/100 g de miel : mg équivalent d'acide gallique / 100 g de miel. | <b>40</b>    |
| <b>09</b> | Teneurs en flavonoïdes du miel sucré et amer. mg EC/100 g de miel : mg équivalent de catéchine / 100 g de miel.              | <b>40</b>    |
| <b>10</b> | Teneurs en tanins du miel sucré et amer. mg EAT/100 g de miel : mg d'acide gallique équivalent / 100 g de miel.              | <b>40</b>    |
| <b>11</b> | Activité radicalaire du miel sucré polyfloral et du miel amer uni floral.  | <b>41</b>    |
| <b>12</b> | Activité anti-oxydante du miel sucré polyfloral et du miel amer unifloral.   | <b>42</b>    |
| <b>13</b> | Des rats males et adultes de la souche Wistar.   | <b>47</b>    |
| <b>14</b> | Flacon du Chlorure de mercure.   | <b>47</b>    |
| <b>15</b> | Synthèse du protocole expérimentale.   | <b>51</b>    |
| <b>16</b> | Principe du dosage du glutathion.  | <b>55</b>    |
| <b>17</b> | Principe du dosage du malondialdéhyde.   | <b>56</b>    |
| <b>18</b> | La courbe d'étalonnage utilisée (nmol/ml) pour le dosage MDA.  | <b>57</b>    |
| <b>19</b> | La courbe d'étalonnage de BSA (1mg/ml) utilisée pour le dosage des protéines.  | <b>58</b>    |
| <b>20</b> | Variation du poids des rats pendant 70 jours de traitement.  | <b>62</b>    |
| <b>21</b> | Poids corporel total (g) du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.                       | <b>62</b>    |
| <b>22</b> | Poids relatif des testicules du rat (moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.                   | <b>63</b>    |
| <b>23</b> | Le poids relatif de l'épididyme du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.                | <b>63</b>    |
| <b>24</b> | Concentration de sperme de rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.                        | <b>65</b>    |
| <b>25</b> | Mobilité des spermatozoïdes du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.                    | <b>66</b>    |
| <b>26</b> | L'activité testiculaire de la CAT du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.              | <b>67</b>    |
| <b>27</b> | L'activité de la GPx testiculaire du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.              | <b>68</b>    |
| <b>28</b> | Le niveau du GSH testiculaire du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.                  | <b>68</b>    |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>29</b> | Le niveau du MDA testiculaire chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>69</b>  |
| <b>30</b> | Caractéristiques microscopiques des tubules séminifères de rats dans le groupe témoin (a), le groupe MS (b), le groupe MA (c), le groupe HgCl <sub>2</sub> (d), le groupe Hg-MS (e) et le groupe Hg-MA (f). Coloration H&E avec un grossissement de x100 (à gauche) et x400 (à droite). Les barres représentent 100 $\mu$ m et 20 $\mu$ m.      | <b>72</b>  |
| <b>31</b> | Caractéristiques de l'épididyme du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a'), le groupe MS (b'), le groupe MA (c'), le groupe HgCl <sub>2</sub> (d'), le groupe Hg-MS (e') et le groupe Hg-MA (f'). Coloration H&E avec un grossissement de x 100 (à gauche) et x 400 (à droite). Les barres représentent 100 $\mu$ m et 20 $\mu$ m. | <b>74</b>  |
| <b>32</b> | Protocole expérimentale (2 <sup>ème</sup> partie).  | <b>82</b>  |
| <b>33</b> | Poids relatif du foie du rat (moyenne $\pm$ écart-type) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>88</b>  |
| <b>34</b> | Poids relatif des reins du rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>89</b>  |
| <b>35</b> | Taux de la TGO chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>91</b>  |
| <b>36</b> | Taux de la TGP chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>91</b>  |
| <b>37</b> | Taux du PAL chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>92</b>  |
| <b>38</b> | Taux du LDH chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>92</b>  |
| <b>39</b> | Taux de la bilirubine totale chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>93</b>  |
| <b>40</b> | Taux de la bilirubine directe chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>93</b>  |
| <b>41</b> | Taux des protéines totales chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel  | <b>94</b>  |
| <b>42</b> | Taux de l'albumine chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>94</b>  |
| <b>43</b> | Taux du cholestérol chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>95</b>  |
| <b>44</b> | Taux des triglycérides chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>96</b>  |
| <b>45</b> | Taux de l'urée chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>97</b>  |
| <b>46</b> | Taux de la créatinine chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>98</b>  |
| <b>47</b> | Taux de l'acide urique chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>98</b>  |
| <b>48</b> | Taux du calcium chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>99</b>  |
| <b>49</b> | Taux du sodium chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>100</b> |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>50</b> | Taux du chlore chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>100</b> |
| <b>51</b> | Taux du potassium chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>101</b> |
| <b>52</b> | Taux de la glycémie chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>102</b> |
| <b>53</b> | Le niveau de l'activité de la CAT hépatique et rénal chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.   | <b>104</b> |
| <b>54</b> | Le niveau du GPx hépatique et rénal chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>105</b> |
| <b>55</b> | Le niveau du GSH hépatique et rénal chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>106</b> |
| <b>56</b> | Le niveau du MDA hépatique et rénal chez le rat (Moyenne $\pm$ SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  | <b>107</b> |
| <b>57</b> | Caractéristiques du foie du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a), le groupe MS (b), le groupe MA (c), le groupe HgCl <sub>2</sub> (d), le groupe Hg-MS (e) et le groupe Hg-MA (f). Coloration H&E avec un grossissement de x 100 (à gauche) et x 400 (à droite). Les barres représentent 100 $\mu$ m et 20 $\mu$ m.                              | <b>110</b> |
| <b>58</b> | Caractéristiques de la zone corticale des reins du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a1), le groupe MS (b1), le groupe MA (c1), le groupe HgCl <sub>2</sub> (d1), le groupe Hg-MS (e1) et le groupe Hg-MA (f1). Coloration H&E avec un grossissement de x 100 (à gauche) et x 400 (à droite). Les barres représentent 100 $\mu$ m et 20 $\mu$ m. | <b>113</b> |
| <b>59</b> | Caractéristiques de la zone médullaire des reins du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a2), le groupe MS (b2), le groupe MA (c2), le groupe HgCl <sub>2</sub> (d2), le groupe Hg-MS (e2) et le groupe Hg-MA (f2). Coloration H&E avec un grossissement de x 100. Les barres représentent 100 $\mu$ m.   | <b>114</b> |

# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| <b>Introduction</b> .....  | 01 |
| <b>Chapitre I : Partie bibliographique</b>                             |    |
| <b>Partie 1 : Mercure</b>  |    |
| 1- Source d'exposition au mercure .....                                | 03 |
| 2- Histoire du mercure .....   | 03 |
| 3- Utilisation du mercure .....  | 03 |
| 4- Mercure dans la chaîne alimentaire .....                            | 04 |
| 5- Mercure et les êtres vivants .....                                  | 04 |
| 6- Normes du mercure .....   | 04 |
| 7- Toxicodynamique du mercure.....                                     | 05 |
| 8- Toxicocinétique du mercure .....                                    | 05 |
| 9- Mercure et organes cibles .....                                     | 06 |
| 10- Mercure et la reproduction .....                                   | 06 |
| 11- Mercure et le foie . .....   | 07 |
| 12- Mercure et le rein . .....   | 08 |
| <br>   |    |
| <b>Partie 2 : Stress oxydant</b>                                       |    |
| Généralité .....   | 10 |
| 1- Protéines et le stress oxydant .....                                | 10 |
| 2- Mitochondrie et stress oxydant .....                                | 11 |
| 3- La peroxydation lipidique .....                                     | 11 |
| 4- Reproduction et stress oxydant .....                                | 12 |
| 5- Rôle des antioxydants cellulaire dans la défense testiculaire ..... | 12 |
| a. Catalase et Superoxyde Dismutase .....                              | 12 |
| b. Glutathion peroxydase .....   | 13 |
| c. Le glutathion .....   | 13 |
| 6- Antioxydants et détoxification.....                                 | 13 |
| a. Polyphénols .....   | 14 |
| b. Zinc .....  | 14 |
| c. Sélénium .....  | 14 |
| d. Vitamine E et C .....   | 14 |
| <br>   |    |
| <b>Partie 3 : Miel</b>   |    |
| 1- Propriétés du miel .....  | 16 |
| 2- Composants phénoliques .....  | 16 |
| 3- Utilisation thérapeutiques .....                                    | 17 |
| a. Inflammation .....  | 17 |
| b. Diabète .....   | 18 |
| c. Action Antibactérienne.....   | 18 |
| d. Système digestif .....  | 18 |
| e. ADN .....   | 18 |
| f. Le sang .....   | 18 |
| g. Le cancer .....   | 18 |
| 4- Miel et stress oxydant .....  | 19 |
| 5- Le miel et la fonction testiculaire.....                            | 19 |
| 6- Le miel et la fonction hépatique et rénale .....                    | 20 |

|   |    |
|---|----|
| 7- Classification du miel .....                               | 21 |
| 8- Le miel monofloral d'arbousier .....                       | 21 |
| a. Fruits .....   | 21 |
| b. Utilisation thérapeutique .....                            | 21 |
| c. Nectar et pollen .....                                     | 22 |
| d. Le miel d'Arbutus .....                                    | 22 |
| e. Composition chimique et effet antioxydant .....            | 22 |
| f. Activité de l'acide homogentisique (HGA) .....             | 23 |
| <b>Partie 4 : Références</b> .....                            |    |
| <b>Chapitre II : Le Miel</b>                                  |    |
| <b>Partie 1 : Matériels et Méthodes</b>                       |    |
| <b>I-</b> Collections d'échantillons.....                     | 25 |
| <b>II-</b> Le miel d'Arbutus unedo L. ....                    | 27 |
| o Description .....   | 27 |
| o Caractéristiques organoleptique/ sensorielle .....          | 29 |
| <b>III-</b> Méthodes d'analyse .....                          | 29 |
| <b>1-</b> Composition physico-chimique .....                  | 29 |
| <b>1-1-</b> pH .....  | 29 |
| <b>1-2-</b> Humidité ou teneur en eau .....                   | 29 |
| <b>1-3-</b> Matière sèche totale .....                        | 31 |
| <b>1-4-</b> Densité ou poids spécifique .....                 | 31 |
| <b>1-5-</b> Acidité .....                                     | 31 |
| <b>1-6-</b> Dosage des sucres réducteurs .....                | 33 |
| <b>2-</b> Activité antioxydante .....                         | 35 |
| <b>2-1-</b> Dosage des polyphénols .....                      | 35 |
| <b>2-2-</b> Dosage des flavonoïdes .....                      | 36 |
| <b>2-3-</b> Dosage des Tanin Totaux .....                     | 37 |
| <b>2-4-</b> Test de la capacité anti-oxydante DPPH .....      | 37 |
| <b>2-5-</b> Test de la capacité anti-oxydante FRAP .....      | 38 |
| <b>3-</b> Etudes statistiques.....                            | 38 |
| <b>Partie 2 : Résultats</b> .....                             |    |
| <b>1-</b> Propriétés physicochimiques et taux de sucres ..... | 39 |
| <b>2-</b> Composés bioactifs .....                            | 39 |
| <b>3-</b> Activité antioxydante .....                         | 41 |
| <b>Partie 3 : Discussion</b> .....                            | 43 |
| <b>Partie 4 : Références</b> .....                            |    |
| <b>Chapitre III : Fonction Testiculaire</b>                   |    |
| <b>Partie 1 : Matériels et Méthodes</b> .....                 |    |
| <b>I-</b> Matériels utilisé .....                             | 47 |
| <b>1-</b> Matériel biologiques .....                          | 47 |
| ▪ Choix des animaux .....                                     | 47 |
| <b>2-</b> Matériel chimique .....                             | 47 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| ▪    | Choix du mercure .....   | 47 |
| ▪    | Propriété physico-chimique.....                                  | 48 |
| 3-   | Produit naturel .....  | 48 |
| ▪    | Choix du miel .....  | 48 |
| II-  | Méthodologie du travail .....                                    | 49 |
| 1-   | Entretien et traitement des rats .....                           | 49 |
| 2-   | Prélèvement des échantillons.....                                | 52 |
| 2-1- | Spermogramme.....  | 52 |
| 3-   | Prélèvement des organes .....                                    | 52 |
| 3-1- | Poids relatif des organes .....                                  | 52 |
| 3-2- | Dosage de l'activité de la Catalase testiculaire .....           | 53 |
| 3-3- | Dosage de l'activité de glutathion peroxydase testiculaire ..... | 53 |
| 3-4- | Dosage de l'activité du glutathion réduit testiculaire.....      | 55 |
| 3-5- | Dosage du marqueur de l'oxydation des lipides : le MDA.....      | 56 |
| 3-6- | Dosage des protéines tissulaire .....                            | 57 |
| 4-   | Etude histologique .....   | 58 |
| 5-   | Etudes statistiques.....   | 60 |

## Partie 2 : Résultats

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1- | Influence du traitement sur la croissance corporelle et sur le poids relatif des testicules et de l'épididyme ..... | 61 |
| 2- | Influence du traitement sur la biologie des spermatozoïdes .....  | 64 |
| 3- | Influence du traitement sur la variation des marqueurs du stress oxydatif .....                                     | 66 |
| 4- | Etude histologique .....  | 69 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| Partie 3 : Discussion ..... | 75 |
|-----------------------------|----|

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Partie 4 : Références..... |  |
|----------------------------|--|

## Chapitre IV : Fonction hépatique et rénale

### Partie 1 : Matériels et Méthodes

|       |   |    |
|-------|---|----|
| I-    | Matériels utilisé.....                                    | 81 |
| II-   | Méthodologie de travail (suite) .....                     | 81 |
| 1-    | Mesure de la glycémie .....                               | 81 |
| 2-    | Prélèvement sanguin .....                                 | 81 |
| 3-    | Prélèvement des organes .....                             | 81 |
| 4-    | Dosage des marqueurs biochimiques .....                   | 82 |
| 4-1-  | Mesure de l'alanine aminotransférase (ALAT/GPT) .....     | 82 |
| 4-2-  | Mesure de l'aspartate aminotransférase (ASAT / GOT) ..... | 83 |
| 4-3-  | Mesure de la phosphatase alcaline (PAL).....              | 83 |
| 4-4-  | Mesure du lactate déshydrogénase (LDH) .....              | 83 |
| 4-5-  | Mesure de la bilirubine directe et totale .....           | 84 |
| 4-6-  | Mesure des protéines totales plasmatiques .....           | 84 |
| 4-7-  | Mesure de l'albumine .....                                | 84 |
| 4-8-  | Mesure de triglycéride .....                              | 84 |
| 4-9-  | Mesure du cholestérol .....                               | 85 |
| 4-10- | Mesure de l'acide urique .....                            | 85 |
| 4-11- | Mesure de l'urée .....                                    | 85 |

|   |  |     |
|---|--|-----|
| 4-12-                                   | Mesure de la créatinine .....  | 86  |
| 4-13-                                   | Mesure du Calcium plasmatique .....  | 86  |
| 4-14-                                   | Mesure du sodium, chlore et potassium.....                                       | 86  |
| 4-15-                                   | Mesure de la glycémie .....  | 87  |
| 5-                                      | Dosage des marqueurs du stress oxydatif .....                                    | 87  |
| 6-                                      | Etude histologique .....   | 87  |
| <b>Partie 2 : Résultats</b>             |  |     |
| 1-                                      | Influence du traitement sur le poids relatif du foie et des reins .....          | 88  |
| 2-                                      | Influence du traitement sur le profil hépatique .....                            | 89  |
| 3-                                      | Influence du traitement sur le profil lipidique.....                             | 95  |
| 4-                                      | Influence du traitement sur le profil rénal .....                                | 96  |
| 5-                                      | Influence du traitement sur les minéraux .....                                   | 99  |
| 6-                                      | Influence du traitement sur la glycémie .....                                    | 101 |
| 7-                                      | Influence du traitement sur les marqueurs du stress oxydatif .....               | 102 |
| 8-                                      | Influence du traitement sur l'architecture des tissus hépatiques et rénaux ..... | 108 |
| <b>Partie 3 : Discussion.....</b>       |  |     |
|   |  | 115 |
| <b>Partie 4 : Références.....</b>       |  |     |
|   |  |     |
| <b>Conclusion et Perspectives .....</b> |  |     |
|   |  | 129 |
| <b>Annexe .....</b>                     |  |     |
|   |  | 132 |
| <b>Productions Scientifiques.....</b>   |  |     |
|   |  | 136 |

# **|Introduction**

Les activités humaines jouent un rôle majeur dans la pollution de l'environnement où l'industrie a entraîné une augmentation des métaux toxiques par l'intermédiaire de l'air, de l'eau et du sol contaminés. Les métaux lourds ne sont pas dégradables mais s'accumulent plutôt dans l'environnement, et produisent des effets considérables même à faibles doses (**Mumtaz et al., 2019**).

Le mercure (Hg) et ses composés sont appelés polluants mondiaux parce qu'ils se répandent à la surface de la Terre, dans l'atmosphère et dans les océans et présentent un risque élevé pour la santé (**Manju & Jagadeesan, 2019 ; Cho et al., 2020**). Il est classé comme étant le troisième métal lourd le plus dangereux après l'arsenic et le plomb dans la liste des substances toxiques et des maladies (**Zhang et al., 2017 ; Caglayan et al., 2019**), car il est présent dans l'environnement sous différentes formes chimiques qui présentent un large éventail de propriétés toxicologiques (**Hazlhoff & Torres, 2018**). On le trouve sous trois formes chimiques différentes ; le mercure élémentaire (Hg<sup>0</sup>), le mercure organique (principalement le méthylmercure) et le mercure inorganique (principalement le chlorure de mercurique) (**Uzunhisarcikli et al., 2016 ; Caglayan et al., 2019**). Chaque forme de mercure a un profil toxicologique unique et diffère par les mécanismes de transport et d'élimination dans l'organisme, ainsi que par le devenir métabolique (**ATSDR, 1999 ; Yang et al., 2020**). La toxicité mercurielle est toujours accompagnée par un stress oxydant énorme par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Eldesoky et al., 2013**), conduisant à certaines perturbations physiologiques (**Beigi Boroujeni et al., 2017**).

Les chercheurs ont prouvé que les propriétés du miel en font l'un des antioxydants naturels les plus importants (**Beretta et al., 2005 ; Boukraâ, 2015**) qui peuvent atténuer le stress oxydatif. Les propriétés physico-chimiques, la composition chimique et les applications thérapeutiques du miel ont été rapportées dans de nombreuses parties du territoire Algérien (**Chefrour et al., 2009 ; Makhloufi et al., 2010 ; Nair et al., 2013 ; Adjlane et al., 2014 ; Haouam et al., 2016**). À ce stade, le miel est connu en médecine traditionnelle comme agent préventif et traitant en stimulant l'immunité, en combattant l'anémie, en guérissant les plaies, en stabilisant la fonction cardiaque, en activant la digestion, en guérissant les allergies cutanées et en inhibant les bactéries pathogènes (**Schramm et al., 2003, Boukraâ, 2015**). La composition chimique du miel peut être affectée par les facteurs climatiques et les espèces végétales. Par ailleurs, l'utilisation thérapeutiques dépend aussi du type du miel ; polyfloral ou monofloral. En Algérie, le miel de nectar polyfloral est récolté à partir de plusieurs espèces végétales (**Makhloufi et al., 2010 ; Ahmed et al., 2012 ; Nair et al., 2013 ; Bouasla & Bouasla, 2017**). Par contre, le miel monofloral est récolté principalement à partir du nectar d'une seule plante, comme celle de sidr, d'eucalaptus, et de l'arbousier. Le miel monofloral d'arbousier *Arbutus unedo*, est un produit typique du bassin méditerranéen méconnu par la population vu son gout amer si on le compare avec le miel polyfloral. Ainsi, des études ont accordé beaucoup d'attention sur les propriétés physico-chimiques, la composition chimique et les activités antioxydantes du miel d'arbousier dans la région nord de la Méditerranée (**Alves et al., 2013, Ulloa et al., 2015 ; Rosa et al., 2011 ; Afrin et al., 2017**). Malgré cela, on en sait peu sur ses paramètres physico-chimiques et ses propriétés bioactives, en Algérie, bien que le miel amer produit à partir du fraisier soit un produit connu de la population locale grâce à ses avantages thérapeutiques et sa réputation respectable.

### **Problématique :**

Les études approfondies de la littérature sur le miel ont révélé que l'utilisation traditionnelle du miel a une longue histoire pour traiter diverses maladies, mais peu de travaux ont été réalisés sur l'activité protectrice du miel contre l'intoxication mercurielle, ce dernier à un effet parfois fatal sur les humains et les animaux à cause de l'utilisation élargie de ce métal dans plusieurs domaines durant les dernières décennies.

### **Objectifs :**

Les objectifs de ce travail est de réaliser les points suivants :

1/ La comparaison entre les caractéristiques physico-chimiques et antioxydantes du miel amer unifloral (récolté en plein hiver) et du miel sucré polyfloral (récolté en plein été) provenant de deux sites de la région de Skikda.

2/ La détermination de l'effet protecteur possible de l'administration orale du miel sucré et amer suite à une exposition chronique du rat *Wistar* au mercure inorganique, et ceci par l'évaluation :

a/ des marqueurs du stress oxydatifs,

b/ des marqueurs biochimiques lié aux fonctions hépatiques et rénales,

c/ des marqueurs lié à la fonction testiculaire,

d/ des altérations histo-pathologiques survenues dans les testicules, épидидyme, le foie et les reins.

# **|Chapitre I :**

## **Etude Bibliographique**

# **Partie 1 : Le mercure**

Le mercure (Hg) est un métal naturel que l'on peut trouver dans tout l'environnement. C'est un élément non essentiel et hautement toxique. L'organisation mondiale de la santé estime qu'environ 10 000 tonnes de mercure sont libérées chaque année dans le monde à partir de sources naturelles et artificielles (**Joshi et al., 2010**).

### 1- Source d'exposition au mercure :

Les **sources naturelles** d'exposition au Hg comprennent les tremblements de terre, les éruptions volcaniques et l'érosion de la croûte terrestre. Il est également présent dans les combustibles fossiles, les minéraux métalliques et d'autres minéraux (**Hazlhoff & Torres, 2018**). De plus, les nombreuses **activités anthropologiques** augmentent sa libération dans l'atmosphère, le sol et l'eau (**Magos & Clarkson, 2006 ; Syversen & Kaur, 2012**). La pollution de l'environnement et l'exposition professionnelle sont les principales formes d'exposition involontaire à ce métal (**Hazlhoff & Torres, 2018**). L'exposition alimentaire se produit également après l'ingestion de poissons et de crustacés contaminés par le méthylmercure (**EPA, 2018 ; Drif al., 2019**).

### 2- Histoire du mercure :

L'application industrielle de ce métal toxique a induit une pollution de la baie de Minamata au Japon en 1950, et que des milliers de personnes ont connu des effets neurotoxiques, qui sont dû principalement à leur consommation de poisson et d'autres fruits de mer de cette baie. D'autres pays ont été aussi victime de l'empoisonnement au mercure comme l'Irak en 1972, Pakistan et au Guatemala (**ATSDR, 2011 ; Peixoto et al., 2008 ; Joshi et al., 2014**).

Après cet incident, l'utilisation du Hg a été considérablement diminué, alors que dans les pays en développement et sous-développés, sont confrontés à des problèmes de santé en raison de leur contamination pendant l'extraction d'or ou/et à la combustion de combustibles fossiles (**Magos & Clarkson, 2006 ; Berlin et al., 2015**) où les mineurs peuvent inhaler de grandes quantités de vapeur de mercure (**Peixoto et al., 2008 ; Hazlhoff & Torres, 2018 ; Orr et al., 2019**). L'Asie du Sud-Est, l'Afrique et l'Amérique du Sud sont les principaux émetteurs mondiaux de mercure dans l'air. Le Pérou, le Brésil, la Bolivie, l'Équateur et la Colombie sont les principaux pays qui pratiquent l'exploitation minière artisanale pour extraire l'or, généralement de manière illégale (**Magos & Clarkson, 2006 ; Hazlhoff & Torres, 2018**).

### 3- Utilisation du mercure :

De nombreux composés inorganiques du mercure sont utilisés depuis plus de 3000 ans dans la médecine (comme désinfectants, obturations dentaires en amalgame, poudres de blanchiment des dents, anti-inflammatoire, médicament ayurvédiques, les laxatifs, les antiseptiques, les diurétiques, traitement contre la syphilis et les vaccins), dans les cosmétiques (crèmes éclaircissantes, les colorants capillaires et les savons), dans l'agriculture (pesticides, fongicides), dans les laboratoires de chimie analytique (comme intermédiaire dans la production d'autres composés du Hg, catalyseur dans la fabrication de produits chimiques, électrodes chimiques, instruments scientifiques, la production électrolytique de chlore et d'alcali et les explosifs) et enfin la fabrication industrielle (fabrication des lampes fluorescentes, piles, thermostats, thermomètres, dans l'ingénierie

automobile et les équipements électriques comme les interrupteurs électriques) (ATSDR 1999 ; WHO 2003).

#### 4- Mercure dans la chaîne alimentaire :

Les métaux lourds sont très persistants et extrêmement nocifs pour les êtres vivants en raison de leur bioconcentration, bioaccumulation et bioamplification dans la chaîne alimentaire (Deepmala et al., 2013). Par exemple, la consommation de prédateurs supérieurs tels que le thon est préoccupante, car ces animaux constituent l'avant-dernière étape d'un processus de bioaccumulation qui peut entraîner une exposition élevée chez l'homme (Assefa et al., 2012).

#### 5- Mercure et les êtres vivants :

Une grande partie de la population est actuellement exposée à de faibles niveaux de Hg en raison de l'exposition professionnelle (Liu et al., 2016). L'exposition professionnelle au Hg est la plus élevée dans les industries de transformation. En outre, les dentistes, les peintres d'intérieur et les personnes travaillant à l'élimination ou au recyclage des déchets sont également exposés au risque d'être contaminés par le mercure (ATSDR, 2011 ; Deng et al., 2011). La contribution du Hg inhalé à partir de l'air est négligeable par rapport à l'ingestion de nourriture, à l'exception de l'exposition professionnelle (Sheikh et al., 2011). Les consommateurs de fruits de mer en particulier les populations qui vivent à proximité de petites mines d'or et dont le régime alimentaire dépend des poissons d'eau douce locaux, et les populations qui consomment des mammifères marins dans les régions arctiques présentent des concentrations de mercure dans le sang total inacceptables (McKelvey et al., 2007 ; Sheehan et al., 2014 ; Yang et al., 2020).

Chez les mammifères et les oiseaux, l'exposition au Hg se fait par deux voies principales, par inhalation ou par ingestion de nourriture polluée (Sheikh et al., 2011). L'étude d'Adams et al., (2010), a prouvé que des niveaux élevés du Hg dans l'eau auraient un effet négatif sur la santé de la truite de mer ainsi que d'autres créatures marines, et qui a provoqué des effets pathologiques et biochimiques importants, principalement dans le foie et les reins (Flora et al., 2008 ; Magos & Clarkson, 2006).

#### 6- Normes du mercure :

Selon l'agence 'Environmental Protection Agency' d'états unis d'Amérique, USEPA, (2006) a recommandé que les niveaux de mercure ne doivent pas dépasser 5,0 µg/L dans le sang total ou 1,0 mg/kg dans les cheveux (ATSDR, 1999 ; Yang et al., 2020). Aux États-Unis, entre 316588 et 637233 enfants naissent chaque année avec un taux de mercure sanguin > 5,8 µg/L, un niveau considéré par l'USEPA comme entraînant un risque accru d'effets néfastes sur la santé des bébés (Hightower et al., 2006). A l'Union Européen, environ 200 000 naissances chaque année dépassent une limite plus élevée de 2,5 µg/ de Hg dans les cheveux proposés par l'OMS (Bellanger et al., 2013). Chez l'homme, la dose mortelle varie entre 10 à 42 mg/kg (Kostial et al., 1978), alors que chez souris, la dose létale orale (DL50) est plus élevée, entre 25,9-77,7 mg/kg (Nielsen & Andersen, 1990 ; Stacchiotti et al., 2004).

### 7- Toxicodynamique du mercure :

L'intoxication au mercure peut être par inhalation, ingestion ou par absorption cutané (Wadaan, 2009 ; Uzunhisarcikli et al., 2016). Le Hg présente un degré élevé de toxicité puisqu'il se fixe et se stocke dans les tissus des organismes par des effets directs et indirects sur les systèmes biologiques et les cellules, par conséquent, il induit des effets biochimiques et pathologiques drastiques affectant la santé de l'homme et de l'animal (Agarwal et al., 2010a ; Chatterjee et al., 2014). Après une forte intoxication au Hg, plusieurs symptômes réapparaissent, modifiant les tâches des poumons et des lésions cérébrales, entraînant la nervosité, une déficience cognitive, une perte de conscience, des maux de tête, des tremblements, des troubles de la coordination, la polyneuropathie, des vomissements, des nausées, des crampes abdominales, la diarrhée, les piqûres, des éruptions cutanées et les fluctuations de la visualisation, la perte de cheveux, l'augmentation du rythme cardiaque ou de la pression artérielle et la protéinurie. En outre, le mercure est à l'origine de diverses affections, dont l'épilepsie et l'infarctus du myocarde ainsi que de troubles respiratoires chez les enfants et un dysfonctionnement rénal chez les enfants et les adultes (Joshi et al., 2013 ; Mumtaz et a., 2019 ; ONU ; 2019 ; Caglayan et al., 2019 ; Cho et al., 2020). Une étude épidémiologique proposée par Austin, (2008) a fait état d'un lien possible entre l'empoisonnement au Hg et l'autisme chez les enfants.

### 8- Toxicocinétique du mercure :

La toxicité du mercure élémentaire ( $Hg^+$ ) résulte de l'inhalation de vapeurs de mercure et affecte principalement les poumons (Deepmala et al., 2013). Lors de son absorption dans le flux sanguin, il se lie aux protéines plasmatiques ou il pénètre dans les érythrocytes (Elblehi et al., 2019). Il est facilement absorbé par divers organes. Étant soluble dans les lipides, le mercure s'accumule dans les graisses, en particulier dans les gaines nerveuses, le cerveau et le foie (Assefa et al., 2012). Par contre, il ne pénètre pas facilement dans le cerveau du fœtus, mais il peut passer dans d'autres organes (Kim et al., 2016 ; Elblehi et al., 2019). Selon Stacchiotti et al., (2009), le Hg peut traverser la barrière placentaire et s'accumule dans le fœtus où il induit de graves changements neurotoxiques même à de faibles niveaux d'exposition (Newland et al., 2008). Des taux élevés du Hg peuvent en revanche nuire aux reins et au système nerveux ainsi qu'au développement du nourrisson (Sakamoto et al., 2012 ; Mumtaz et al., 2019). L'absorption est possible à travers les membranes biologiques et d'autres protéines contenant du soufre (Ibegbu et al., 2014).

Le Hg élémentaire et le Hg organique sont tous les deux métabolisés en Hg inorganique (principalement le chlorure mercurique ( $HgCl_2$ ) dans l'intestin à raison de 1 % de la charge corporelle par jour (Stacchiotti et al., 2009 ; Liu et al., 2016). Ce dernier, exerce ses conséquences toxiques principalement en se transformant en composés de méthylmercure (de manière non enzymatique par les bactéries par le transfert du groupe méthyle de la méthylcobalamine à l'ion mercurique), ayant la capacité de s'accumuler dans les organes cibles, principalement les reins et le cerveau (Joshi et al., 2017). L'ingestion du mercure inorganique sous forme de sel divalent ou monovalent, provoque également une grave toxicité rénale et gastro-intestinale (Deepmala et al., 2013).

Étant donné que les cellules sont probablement exposées à diverses espèces de  $\text{Hg}^{2+}$ , il est nécessaire de bien comprendre la manière dont le  $\text{Hg}^{2+}$  est manipulé par les tissus, organes et cellules cibles (Oliveira et al., 2018). Une fois absorbés par les cellules cibles, les ions mercuriques peuvent produire des effets néfastes importants tels que des lésions oxydatives, la perturbation des voies de signalisation et de l'énergie cellulaire, et des altérations du cytosquelette (Orr et al., 2019). Bien que la toxicité du Hg organique ou inorganique a été largement étudiée, les mécanismes moléculaires ne sont pas encore complètement compris (Liu et al., 2016).

Le mercure est recyclé par le système entéro-hépatique chez l'adulte et est principalement excrété dans les fèces (Ibegbu et al., 2014).

### 9- Mercure et organes cibles :

Il est bien connu que le mercure est hépatotoxique (Perotoni et al., 2004), neurotoxique (Teixeira et al., 2014), néphrotoxique (Bharathi & Jagadeesan, 2014), hématotoxique (Sheikh et al., 2013), génotoxique (Rozgaj et al., 2005) et reprotoxique (Martinez et al., 2016). Toutes les formes du Hg potentialisent la toxicité dans plusieurs tissus et organes, en fonction de facteurs tels que la forme chimique, la dose, la durée et la voie d'exposition au mercure (Abariku et al., 2018). Il s'accumule principalement dans les reins, mais le deuxième bassin d'ions mercuriques le plus important se trouve dans le foie (Hazlhoff et Torres, 2018). Ces organes excréteurs défendent l'organisme contre les effets potentiellement nocifs de ces composés par biotransformation en métabolites moins actifs et par des processus de transport excréteur. Les reins et le foie sont donc les principales voies d'élimination des anions organiques (Trebucovich et al., 2014). Une exposition élevée au Hg entraîne une production accrue de radicaux libres et un stress oxydatif qui sont impliqués dans la pathogénie des troubles hépatiques et rénaux aigus (Othman et al., 2014). Des altérations de la structure et de la fonction des reins sont fréquemment rencontrées dans les maladies hépatiques graves (Obea Abd-Allh, 2014). En effet, une néphrotoxicité précoce induite par le  $\text{HgCl}_2$  pourrait exacerber le déséquilibre biochimique et accélérer l'hépatotoxicité (Merzoug et al., 2009 ; Uzunhisarcikli et al., 2016). Ce qui implique, que la fonction hépatique doit nécessairement être impliquée dans l'incorporation et le transport du Hg dans le rein lui-même (Mohamed et al., 2010 ; Uzunhisarcikli et al., 2016). Par exemple, la ligature biliaire avant l'administration de Hg inorganique a entraîné une réduction de l'accumulation de ce métal dans les reins (Zalups et al., 1999) ce qui confirme, que le foie est impliqué dans le dépôt et l'excrétion du Hg (Stacchiotti et al., 2009).

### 10- Mercure et la reproduction :

Le mercure est connu pour exercer des effets toxiques sur la fonction testiculaire (Eldesoky et al., 2013). L'infertilité masculine humaine augmente dans le monde en raison de la détérioration de la qualité du sperme (Ahmed et al., 2018). Jusqu'à présent, le déclin de la santé reproductive masculine au cours des dernières décennies était lié à l'exposition professionnelle à des produits chimiques dangereux, à des carences nutritionnelles et à des facteurs environnementaux, y compris les métaux lourds (Hemadi et al., 2013).

Le mercure (Hg) aurait influencé les fonctions spermatogéniques et stéroïdogènes testiculaires chez les animaux de laboratoire (Ernest et al., 1991 ; Eldesoky et al., 2013) en

provoquant une dérégulation de la qualité du sperme, un déséquilibre hormonal et la génération du stress oxydatif (Mohamed et al., 1987; Ernest et al., 1991; Hansen et al., 2006; Martinez et al., 2014; Martinez et al., 2016). En conséquence, les activités du superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GPx) et du glutathion réduit (GSH) des spermatozoïdes épидидymaires de rat in vivo, exposés au Hg, ont diminué, tandis que les niveaux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et la génération du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ont été remarquablement augmentés (Rao & Gangadharan, 2008). Le Hg se lie facilement aux groupes fonctionnels cellulaires (Abdenmour et al., 2002) comme les groupes sulfhydryle (-SH), ce qui peut contribuer à sa toxicité (Hansen et al., 2006). Le Hg inorganique est considéré comme l'un des pro-oxydants qui induit un stress oxydatif (Khan et al., 2004 ; Eldesoky et al., 2013) par la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) où ces derniers peuvent être responsables de l'infertilité masculine. Ainsi, une relation positive entre le niveau de ROS et l'infertilité masculine a été démontrée (Gharagozloo & Aitken 2011 ; Beigi Boroujeni et al., 2017). Il a été constaté que la formation anormale de spermatozoïdes provenait de l'altération du stress oxydatif sur la capacité stéroïdogène et de la différenciation des spermatozoïdes (Hales et al., 2003 ; Siti Balkis et al., 2017). Dans ces circonstances, les spermatozoïdes peuvent être affectés morphologiquement ou par des dommages à l'ADN (Ollero et al., 2001 ; Gil-Guzman et al., 2001 ; Beigi Boroujeni et al., 2017). De plus, les acides gras polyinsaturés des membranes de spermatozoïdes des mammifères étaient facilement vulnérables à la peroxydation en présence de ROS (Vernet et al., 2004 ; Siti Balkis et al., 2017).

### 11- Mercure et le foie :

Le foie est un organe important qui participe activement à de nombreuses fonctions métaboliques des molécules endogènes comme les lipides, les glucides, les protéines, la coagulation du sang et l'immunomodulation et exogènes comme de nombreux xénobiotiques où il facilite leur détoxification et leur élimination. Le foie a une importance clé dans la biotransformation du mercure (Deng et al., 2011 ; Hosseini et al., 2018) en raison de son rôle dans la production de la bile, dont il est impliqué dans le dépôt et l'excrétion du Hg (Liu et al., 2016). Les ions mercuriques inorganiques, ingérés dans l'alimentation, sont mal absorbés dans le tractus intestinal et la plupart sont excrétés dans les fèces (Caglayan et al., 2019). Il a été démontré que le Hg est libéré dans la bile et partiellement réabsorbé par le système circulatoire puis renvoyé dans le foie par la veine hépatique (Liu et al., 2016 ; Mumtaz et a., 2019). La quantité inhabituelle du Hg se déplace dans les tissus en raison de la liaison du mercure avec le complexe de cystéine ou au glutathion réduit (GSH) par un transporteur d'anions organiques 3 (Slc22A8, Oat3) dans la vésicule biliaire ainsi que dans le canal cholédoque (Hazlhoff & Torres, 2018 ; Mumtaz et al., 2019). La lésion du foie est associée à une distorsion de ces fonctions métaboliques et entraîne une perturbation de l'homéostasie du corps (Ravichandra et al., 2013). Liu et al., (2016) ; Caglayan et al., (2019) ont noté que le HgCl<sub>2</sub> peut induire des lésions hépatiques causées par les radicaux libres et la production des ROS provoquant un stress oxydatif.

Parmi les résultats obtenus de nombreuses études sur l'effet hépatotoxiques du Hg : **1)** la dépolarisation mitochondriale, le découplage conduisant à une déplétion de l'ATP et l'ouverture du pore de transition et de perméabilité dans les mitochondries hépatiques chez le rat conduisant à une apoptose ont été prouvé après exposition au HgCl<sub>2</sub> et méthylmercure (MeHg) (**Farina et al., 2004 ; Trebucovich et al., 2014 ; Joshi et al., 2017**) ; **2)** après liaison et réaction avec différentes protéines et enzymes cellulaires, les ROS entraînent une apoptose ou une nécrose des hépatocytes (**Liu et al., 2016; Zhao et al., 2017**) comme dans le cas du MeHg qui diminue la teneur en GSH et l'activité de la GPx, ce qui entraîne une peroxydation lipidique accrue et la mort cellulaire (**Farina et al., 2004**) ; **3)** le Hg entraîne des altérations dans les processus liés au métabolisme primaire, tels que les niveaux de glucose et de glycogène, une altération de la régulation de l'appétit et une réduction des acides aminés et de l'absorption intestinale des sucres (**Peixoto & Pereira, 2007**) ; **4)** il a été signalé que le HgCl<sub>2</sub> provoque des dommages histopathologiques et des lésions ultrastructurales dans le foie en raison de la dégénérescence des acides gras et de la nécrose cellulaire (**Hazlhoff & Torres, 2018**) ; **5)** une peroxydation lipidique accrue et des activités sériques de l'aspartate aminotransférase (AST), de l'alanine aminotransférase (ALT), de la phosphatase alcaline (ALP) et de la lactate déshydrogénase (LDH) indiquant des lésions hépatiques ont été observées au cours d'une intoxication expérimentale au Hg (**Abariku et al., 2018**).

### **12- Mercure et le rein :**

Les reins excrètent les déchets du métabolisme et jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie en régulant l'équilibre de l'eau et des solutés dans le corps. En plus de leur fonction d'excrétion, les tissus rénaux servent également de réservoir de mercure, il a été démontré que les composés du mercure s'accumulent dans les reins ainsi que dans d'autres organes (**Vijayaprakash et al, 2013 ; Bharathi & Jagadeesan, 2014**). L'ion mercurique est la principale espèce toxique dans le foie et les reins (**Joshi et al., 2017**). Le mercure inorganique s'accumule à des niveaux plus élevés dans les reins que dans le foie, ce qui est probablement responsable d'un plus grand nombre d'effets observés dans les reins (**Perottoni et al., 2004**). En raison de sa solubilité dans l'eau et de son absorption par le tube digestif (**Joshi et al., 2013**), les sels inorganiques du mercure auraient tendance à s'accumuler rapidement dans les reins en quelques heures (**Agarwal et al., 2014**). En effet, 50 à 90 % de la charge corporelle se trouve dans cet organe (**WHO, 1991 ; Peixoto et al., 2008**).

Le HgCl<sub>2</sub> est transporté dans les cellules tubulaires proximales par endocytose. La cystéinyl glycine joue le rôle majeur d'un puissant transporteur du mercure dans le tubule proximal du néphron (**Yadav et al., 2019**). Le tubule proximal (le long des trois segments du tubule proximal) est donc le principal site d'absorption et d'accumulation de Hg<sup>2+</sup>. Ce dernier semble être absorbé au niveau des membranes lumineuses et basolatérales des cellules tubulaires proximales sous forme de conjugué d'une ou plusieurs biomolécules contenant des thiols, comme la cystéine (**Zalups, 2000 ; Zalups & Lash, 2006 ; Oliveira et al., 2018**).

Le chlorure de mercure a été reconnu comme un agent néphrotoxique (**Fowler, 1992**). L'exposition à cette forme de métal entraîne de nombreux effets sur les reins liés aux fonctions biochimiques et structurales (**Peixoto & Pareira, 2007**) et principalement des lésions rénales en raison de l'impact immédiat de la collecte du mercure dans les cellules tubulaires du néphron (**Yadav et al., 2019**).

Parmi les dégâts provoqués par le Hg que ce soit chez l'homme ou chez les animaux de laboratoire, des problèmes de réabsorption et de sécrétion largement concentrés dans les tubules proximaux ont été rapportés (**Vijayaprakash et al, 2013**). Le HgCl<sub>2</sub> induit des lésions rénales aiguës lorsque l'hémodynamique glomérulaire et plus spécifiquement, le pars recta du tubule proximal est affecté. La lésion est plus importante dans le pars recta (segments S2 et S3) à faible dose, avec une implication des pars convoluta du tubule proximal et des segments distaux du néphron à plus forte dose (**Trebucobich et al., 2014**).

D'autres dommages de néphrotoxicité du Hg, comme une nécrose tubulaire aiguë, un syndrome néphritique ou une glomérulonéphrite immunologique selon (**Caglayan et al., 2019**) ce qui provoque l'augmentation des taux sériques de créatinine et d'urée (**Peixoto & Pereira, 2007 ; Peixoto et al., 2008**). **Shi et al., (2011)** ont comparé la néphrotoxicité du cinabre (HgS) (0,2g/kg), du HgCl<sub>2</sub> (0,02g/kg) et du MeHg (0,001g/kg) chez le rat Sprague-Dawley adultes, et le résultat a montré que le cinabre est beaucoup moins néphrotoxique que le HgCl<sub>2</sub> et le MeHg.

## **Partie 2 : Le stress oxydant**

### Généralité :

Dans des conditions normales, les ROS seront neutralisées par les systèmes antioxydants, endogènes non enzymatiques ou enzymatiques telles que la catalase (CAT), la SOD et la GPx (**Uzunhisarcikli et al., 2016 ; Liu et al., 2016**). Ces systèmes de défense doivent également être en accord avec les composants responsables des processus de réparation des molécules endommagées par l'oxydation afin de maintenir l'intégrité de la cellule (**Bando et al., 2005**). Les antioxydants s'épuisent dans des conditions pathologiques, provoquant la présence de radicaux libres en quantité excessive (**Ozturk et et al., 2003 ; Siti Balkis et al., 2017**). Cet excès peut altérer l'homéostasie ionique intracellulaire en endommageant de nombreuses macromolécules biologiques dans les cellules, notamment les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques, entraînant divers dysfonctionnements cellulaires, dont la mort cellulaire (**Deng et al., 2011 ; Uzunhisarcikli et al., 2016 ; Liu et al., 2016**). Le Hg est une substance toxique omniprésente dans l'environnement qui induit un stress oxydatif dans les organismes vivants par la présence des ROS (**Deng et al., 2011**). Ce stress oxydatif lié au métal est un état de déséquilibre entre la défense antioxydante et la production des ROS telles que les radicaux anioniques superoxydes ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  et les radicaux hydroxyles ( $HO^\cdot$ ) de sorte que les défenses de l'hôte sont dépassées par la formation de radicaux (**Majlesi et al., 2017 ; Elblehi et al., 2019**).

### 1- Protéines et le stress oxydant :

Les protéines de stress, qui comprennent les protéines de choc thermique (HSP en anglais), les protéines régulées par le glucose (GRP) et les métallothionéines (MT), sont des chaperons moléculaires hautement conservés, impliqués dans les mécanismes de défense endocellulaire en facilitant, le repliement et la récupération des protéines ou des organelles endommagés, qui peuvent être altérés par divers métaux. Ces protéines de stress sont donc responsables de la réparation des dommages oxydatifs afin de maintenir l'intégrité des cellules (**Reus et al., 2003 ; Stacchiotti et al., 2009**).

L'exposition au mercure, est fréquemment associée principalement à l'induction de MT (**Agarwal et al., 2010a**). Les MT sont des protéines omniprésentes riches en cystéines qui se lient au Hg en formant des complexes et en fonctionnant comme de puissants médiateurs de la détoxification cellulaire dans le foie (**Stacchiotti et al., 2009**). Ils jouent un rôle important dans la régulation, le stockage et la détoxification des métaux (**Agarwal et al., 2014**). Le mercure se lie aux organites cellulaires une fois pénétré dans la cellule (**Agarwal et al., 2014**). Il stimule également le rein et le foie à induire la synthèse de la métallothionéine, ce qui offre une protection partielle contre la toxicité du mercure. Une augmentation de l'expression des MT a été observée chez les animaux exposés au mercure comme indicateur de la toxicité et de la protection qui en découle (**Agarwal et al., 2010a ; Agarwal et al., 2010 b**).

L'exposition aux composés du mercure comme le  $HgCl_2$ , affecte la fonction oxydative en raison de sa grande affinité pour les thiols de cystéine cellulaires (**Vijayaprakash et al., 2013**). Ils interfèrent avec la fonction enzymatique en perturbant la synthèse des protéines et la production d'énergie (**Bando et al., 2005**). Ce processus de combinaison avec un métal

pour former un complexe dans lequel l'ion métallique est séquestré et fermement lié est appelé chélation. Un groupe thiol peut attirer un atome de mercure sous forme ionisée et le faire se combiner avec lui-même. Comme il s'agit d'un radical, il peut entrer dans cette combinaison ou en sortir sans aucun changement (**Deepmala et al., 2013**). Le mercure inorganique sous la forme  $Hg^{2+}$  est l'un des plus puissants agents de liaison des thiols pour les groupes SH des biomolécules endogènes (**Caglayan et al., 2019**) en déplaçant d'autres métaux de leurs sites de fixation naturels (**Chatterjee et al., 2014**).

Le Hg se trouve invariablement combiné à des protéines contenant des thiols, des peptides de petit poids moléculaire (le GSH) et des acides aminés (la cystéine) (**Elblehi et al., 2019**). La liaison du mercure aux groupes SH du glutathion ou des protéines est considérée comme un mécanisme de défense cellulaire qui séquestre, transporte et inactive les ions métalliques réactifs (**Bando et al., 2005**). Par exemple, le MeHg transporté à travers l'endothélium, se lie aux molécules sulfhydryles (-SH) telles que la L-cystéine, le GSH, l'hémoglobine, l'albumine et d'autres polypeptides contenant de la cystéine dans les tissus (**Jalili et al., 2019**). Par conséquent, le Hg entraîne une profonde détérioration des processus métaboliques vitaux (**Elblehi et al., 2019**) tels qu'un épuisement rapide du GSH et du système immunitaire ainsi une augmentation de la protéinurie (**Bando et al., 2005**).

### 2- Mitochondrie et stress oxydant :

La mitochondrie a été considérée comme le principal site intracellulaire pour la génération des ROS. La formation excessive de ROS peut perturber le métabolisme énergétique et altérer les activités des enzymes qui jouent un rôle essentiel dans l'inhibition des dommages oxydatifs (**Liu et al., 2016**). En outre, des études morphologiques et biochimiques ont montré que la toxicité du  $HgCl_2$  est associée à plusieurs impacts sur le bon fonctionnement mitochondrial tels que : **1**) perturbe la structure de la membrane interne et la bioénergétique de mitochondrie rénale qui génère l'adénosine triphosphate (**Lund et al., 1993 ; Fouda et al., 2008**), **2**) entraîne une diminution de la teneur en GSH des mitochondries, l'oxydation des nucléotides pyridines et une augmentation de la formation de  $H_2O_2$  par la chaîne de transport des électrons mitochondriaux in vitro, provoquant des lésions tissulaires oxydatifs (**Lund et al., 1991 ; Lund et al., 1993 ; Nath et al., 1996**), **3**) une désactivation importante des systèmes de piégeage des radicaux libres, tels que la SOD et la GPx (**Fouda et al., 2008**) ; **4**) facilite l'écoulement des particules de calcium des mitochondries rénales et affaiblit la fonction cellulaire (**Carneiro et al., 2013 ; Yadav et al., 2019**) ; **5**) déclenche la Caspase-3 à travers les mitochondries et initie la production des facteurs de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) dans les cellules tubulaires, ce qui entraîne une réponse inflammatoire robuste (**Jia et al., 2015 ; Yadav et al., 2019**) ; **6**) favorise également une peroxydation accrue des lipides mitochondriaux catalysée par le fer (**Lund et al., 1991**) ; **7**) entraîne une perte de la sélectivité normale des cations (**Lund et al., 1991**).

### 3- La peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidiques (LPO) est l'une des principales manifestations des dommages oxydatifs, qui joue un rôle important dans la toxicité de nombreux xénobiotiques (**Yousef & Salama, 2009 ; Ognjanovic et al., 2010**). Il faut noter que les dommages oxydatifs produit par le mercure, génèrent le  $H_2O_2$  (**El-Demerdash, 2001**). De plus, la LPO

est considérée comme un biomarqueur essentiel dans la pathogenèse des lésions tissulaires hépatiques, rénales, cérébrale et d'autres tissus détectés par l'augmentation des TBARS suite à une exposition au HgCl<sub>2</sub> (**El-Demerdash, 2001 ; Perotoni et al., 2004 ; Caglayan et al., 2019**). Le Malondialdéhyde (MDA) est l'un des principaux produits des acides gras polyinsaturés (AGPI) peroxydés, une teneur accrue en MDA est un indicateur important de la LPO (**Eldesoky et al., 2013**). La LPO est le processus de dégradation oxydative des acides gras polyinsaturé (AGPI) et son apparition dans les membranes biologiques entraîne une altération de la fonction membranaire, de l'intégrité structurale, une diminution de la fluidité membranaire et l'inactivation de plusieurs enzymes liées à la membrane (**Valko et al., 2005 ; Boujbiha et al., 2009**).

#### 4- Reproduction et stress oxydant :

Diverses expériences ont suggéré que le HgCl<sub>2</sub> cause des dommages oxydatifs aux cellules (**Mahboob et al., 2001 ; Boujbiha et al., 2009 ; Sharma & Bhattacharya, 2010 ; Abarikwu et al., 2016**). Le stress oxydatif joue un rôle important dans l'étiologie de la formation, de la fonction, du profil de numération des spermatozoïdes et de l'infertilité masculine déficiente (**Kalender et al., 2013**). Ces ROS sont des bioproduits du métabolisme de l'oxygène, constamment produits dans les cellules normales par les mitochondries, en particulier par les spermatozoïdes lors du processus de capacitation, mais leur action est neutralisée par le système antioxydant cellulaire (**Lavranos et al., 2012**). Cependant, lorsque les cellules testiculaires et épидидymaires sont exposées à des facteurs nocifs tels que la chaleur excessive, les radiations, les produits chimiques ou les métaux traces, la surproduction des ROS peut causer l'infertilité masculine (**Cocuzza et al., 2007 ; Makker et al., 2009 ; Yousef & Salama, 2009 ; Frenedoso da silva et al., 2014**) puisque ces derniers, peuvent endommager la fonction du sperme et l'intégrité de l'ADN (**Lanzafame et al., 2009**), en particulier si le système de défense est retardé (**Frenedoso da silva et al., 2014**).

Les enzymes de défense sont également un indicateur important du déséquilibre oxydatif favorisé par l'exposition chronique au HgCl<sub>2</sub>. Les testicules, l'épididyme, le sperme et le plasma séminal contiennent des activités élevées d'enzymes antioxydantes qui peuvent être considérablement affectées par le métal (**Orisakwe et al., 2001 ; Kalender et al., 2013 ; Rizzetti et al., 2017**). Les cellules disposent plusieurs mécanismes pour se protéger de l'effet toxique des ROS (**Bando et al., 2005**). L'effet protecteur des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx a été connu contre la toxicité induite par le mercure dans de nombreuses études préliminaires (**Farina et al., 2003 ; El-Desoky et al., 2013 ; Martinez et al., 2014**).

#### 5- Rôle des antioxydants cellulaire dans la défense testiculaire :

Les systèmes de défense antioxydants protègent l'homéostasie cellulaire contre les perturbations oxydatives provoquées par les molécules réactives générées par la réduction de l'oxygène moléculaire (**Bando et al., 2005**).

##### a- Catalase et Superoxyde Dismutase :

La SOD et la CAT sont des enzymes antioxydantes primaires présentes dans les cellules de mammifères (**Fang et al., 2002**). La CAT protège la SOD contre l'inactivation

par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Réciproquement, la SOD protège la CAT contre l'inhibition par l'anion superoxyde (O<sup>2-</sup>). Ainsi, ces enzymes travaillent ensemble pour éliminer les ROS des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN aux dommages oxydatifs (**Boujbiha et al, 2009 ; Kalender et al., 2013**). La catalase est une hémoprotéine qui catalyse la réduction des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et protège les tissus des radicaux hydroxyles hautement réactifs (**Ravichandiran et al., 2012**). La catalase convertit le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène moléculaire. On considère également que la CAT contribue à la fertilité masculine et protège contre les dommages oxydatifs (**Cheng et Ko, 2019**).

### b- Glutathion peroxydase :

Dans la famille de glutathion redox, les GPx sont des sélénoenzymes antioxydantes présentes dans le cytosol des cellules (**Kalender et al., 2013**). La fonction principale de ces enzymes, qui utilisent le GSH comme donneur d'électrons pour catalyser les ROOH (**Cheng et Ko, 2019**). Plusieurs isoformes de cette enzyme peuvent être trouvées dans le cytoplasme, les membranes plasmiques ou les fluides extracellulaires. Si l'isoforme GPx<sub>3</sub> est principalement exprimée dans le rein, son expression a également été identifiée dans l'épididyme et les testicules (**Maser et al., 1994 ; Schwaab et al., 1995**). Cette enzyme s'est également révélée protéger contre la peroxydation des phospholipides de la membrane des spermatozoïdes humains (**Tavilani et al., 2008 ; Cheng & Ko, 2019**).

### c- Le glutathion :

Une grande partie de la pathologie est associée à la diminution de la concentration intracellulaire de GSH (**Al-attar, 2011**). Le glutathion est un agent réducteur non enzymatique abondant qui agit comme un piègeur de radicaux libres et une coenzyme pour les agents réducteurs enzymatiques, en particulier le GPx (**Cheng & Ko, 2019**). Il est bien connu que le GSH est l'une des molécules antioxydantes les plus importantes et, à des concentrations physiologiques, contribue à maintenir l'état redox normal des cellules (**Youcef & Salama, 2009**) qui neutralise spontanément plusieurs ROS (**Eldesoky et al., 2013**). Il a été rapporté que le GSH, à la fois en tant que transporteur de mercure et agent antioxydant, joue un rôle spécifique dans la protection du corps contre la toxicité du mercure. Le complexe glutathion-mercure empêche le mercure de se lier aux protéines cellulaires, de causer des dommages aux enzymes, de pénétrer dans les tissus et de devenir une toxine intracellulaire (**Kromidas et al., 1990 ; Eldesoky et al., 2013**).

## 6- Antioxydants et détoxification :

Les organes aérobie utilisent une batterie de mécanismes de défense tels que les enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) pour atténuer ou prévenir les dommages tissulaires oxydatifs. Les antioxydants dérivés de l'alimentation comme l'acide ascorbique, la vitamine E, les caroténoïdes, les polyphénols et l'acide  $\alpha$ -lipoïque ont également servi comme lignes de défense primaires pour détruire les radicaux libres (**Wang & Luo, 2007 ; Uma et al., 2012**). Les antioxydants naturels peuvent retarder la progression de nombreuses maladies chroniques mais également le rancissement oxydatif des lipides dans les aliments, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques (**Kinsella et al., 1993 ; Sridhar et al., 2013**). Les antioxydants peuvent jouer un rôle important dans la réduction de certains risques sanitaires liés aux métaux lourds en relation avec une interaction des radicaux libres

physiologiques (Ansar & Igbal, 2016). Les molécules suivantes sont de puissants antioxydants :

a- **Polyphénols :**

Les agents alimentaires naturels jouent un rôle majeur dans la prévention de divers stress oxydatifs induits par les radicaux libres. Les flavonoïdes sont des produits polyphénoliques naturels omniprésents dans les légumes et les fruits, qui sont de puissants antioxydants et composants de l'alimentation humaine (Vijayaprakash et al., 2013).

b- **Zinc :**

Le zinc a la capacité de stimuler la production des protéines comme la MT (Peixoto et al., 2007 ; Joshi et al., 2012). Il joue également un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaires ainsi que la réplication et la transcription de l'ADN. Le zinc est un élément catalytique et structurel et un messager de signalisation intercellulaire qui est libéré par les terminaisons nerveuses centrales pendant l'activité synaptique (Deepmala et al., 2013). Le zinc est un métal-trace important dans la détoxification du mercure car le mercure est capable de concurrencer et de déplacer le zinc dans de nombreuses enzymes critiques (Joshi et al., 2012).

c- **Sélénium :**

Le sélénium (Se) est un composant essentiel de plusieurs enzymes telles que la GPx, la thiorédoxine réductase et la sélénoprotéine P, qui contiennent du Se sous forme de sélénocystéine. La capacité du Se à réduire la toxicité du mercure est bien connue (Cuvinaralar & Furness, 1991 ; Sasakura & Suzuki, 1998). Le mécanisme de protection comprend la capacité du Se à modifier la distribution du mercure dans les tissus et à induire la liaison des complexes Hg-Se aux protéines (Toufektsian et al., 2000 ; Chapman & Chan, 2000 ; El-Demerdash, 2001 ; Deepmala et al., 2013). Le Se aurait également un effet sur l'élimination du mercure en réduisant son excrétion urinaire et fécale, principale voie d'élimination du mercure inorganique dans l'organisme (Juresa et al., 2005).

d- **Vitamine E et C :**

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, qui joue un rôle important dans la stabilisation des membranes cellulaires en piégeant les radicaux libres (Warren et al., 2000 ; Agarwal et al., 2010 b). La vitamine E inhibe la peroxydation des lipides de la membrane en éliminant les radicaux peroxydes lipidiques (Uzunhisarcikli & Kalender, 2011 ; El-Demerdash, 2004). Rao et Sharma, (2001) ont rapporté que la vitamine E a montré un effet protecteur contre le HgCl<sub>2</sub> par une mauvaise absorption du Hg dans le tractus gastro-intestinal. La supplémentation de la vitamine E, réduit la néphrotoxicité (Aslanturk et al., 2014), la toxicité testiculaire (Kalender et al., 2013) et améliore les paramètres hématologiques et biochimiques, ainsi que les niveaux du MDA et des activités enzymatiques de la SOD, la CAT et de la GPx (Uzunhisarcikli et al., 2016) induite par le HgCl<sub>2</sub> chez le rat.

La vitamine C ou acide ascorbique joue également un rôle important dans la régénération du tocophérol (Young & Woodside, 2001). Ces antioxydants non enzymatiques circulatoires ont une action synergique dans l'élimination des ROS. La

vitamine E réagit avec les radicaux générés par LPO en agissant comme un terminateur de chaîne des lipides par oxydation tandis que la vitamine C aide à maintenir le niveau de vitamine E à des concentrations optimales (**Flora et al., 2008 ; Vijayaprakash et al., 2013**).

## **Partie 3 : Le miel**

### 1- Propriétés du miel :

L'histoire de l'utilisation du miel est parallèle à l'histoire de l'homme. Une réévaluation des preuves de l'âge de pierre, du moyen âge et du début des temps modernes suggère que les gens ordinaires mangeaient des quantités de miel beaucoup plus importantes que ce qui avait été reconnu auparavant (**Boukraa, 2014**). Le miel est utilisé depuis des siècles pour ses propriétés nutritionnelles et médicinales. Il semble qu'une partie des propriétés thérapeutiques du miel soit due à sa capacité antioxydante (**Ferreira et al., 2009**), et que certaines maladies sont la conséquence de dommages oxydatifs.

Selon le **FAO, (1996)**, le miel est un produit naturel, largement apprécié comme la seule forme concentrée de sucre disponible dans le monde qui a une valeur médicinale extraordinaire. Le miel est un aliment sucré domestique naturel et un produit superflu chimiquement diversifié de nectar fabriqué par les abeilles à partir de fleurs (**El-Rabey et al., 2013 ; Ahmad et al., 2017**). Les activités biochimiques et pharmacologiques du miel varient en fonction de son emplacement, du climat, de l'humidité, de la source de nectar et de la manipulation pendant la récolte et le stockage (**Moniruzzaman et al., 2013 ; Samat et al., 2017**).

Le miel comprend environ 200 constituants bioactifs bénéfiques (**Afroz et al., 2014**), 18 à 20 % d'eau et de matière organique qui est composé d'un mélange complexe de glucides (glucose, fructose), de protéines, d'enzymes (invertase, glucose oxydase, catalase et phosphatases), d'acides aminés et organiques (acide gluconique, acide acétique, etc.), de lipides, de vitamines (A et B, de C, D, E, K), de substances chimiques volatiles, d'acides phénoliques, de flavonoïdes, de caroténoïdes, de minéraux (calcium, cuivre, fer, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium et zinc) qui peuvent agir comme antioxydants (**Al-Waili et al., 2006 ; El-Rabey et al., 2013 ; Gholami et al., 2018a**). Un large éventail de constituants mineurs est également présent dans le miel, dont beaucoup sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes (**Alvarez-Suarez et al., 2009**). Ces propriétés permettent au miel d'agir à différents niveaux cellulaires et d'être un antioxydant naturel idéal. La diversité des couleurs, des saveurs et des propriétés fonctionnelles du miel est principalement due à sa composition phénolique (**Yordi et al., 2012 ; Hossen et al., 2017**). Selon **Schramm et al., (2003)**, le miel avec une teneur en eau plus élevée et avec une couleur plus foncée contient plus d'antioxydants.

Le miel est un aliment énergétique très important et est utilisé comme ingrédient dans des centaines d'aliments manufacturés, essentiellement dans les produits à base de céréales, pour sa douceur, sa couleur, sa saveur, sa caramélisation, sa viscosité (**Kahraman et al., 2010**) empêchant les réactions d'oxydation dégradantes, dans les aliments, comme l'oxydation des lipides dans la viande et le brunissement enzymatique des fruits et légumes (**Oszmianski & Lee, 1990**).

### 2- Composants phénoliques :

L'activité antioxydante totale du miel est principalement fournie par sa composition phénolique, plutôt que par la vitamine C et d'autres composants (**Hossen et al., 2017 ; Zhao et al., 2018**). Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires dans les plantes,

avec des groupes hydroxyles sur le cycle aromatique et agissent comme donneurs d'hydrogène dans l'extinction des radicaux (Negri et al., 2011). Les composés phénoliques sont également des donneurs d'électrons et réduisent les ions métalliques (Gülçin, 2012 ; Cheng et al., 2014).

Les flavonoïdes et les polyphénols sont d'importants composants bioactifs présents dans le miel et ont des propriétés antioxydantes (Ahmad et al., 2017). Les principaux composés phénoliques et flavonoïdes du miel sont l'acide ellagique, l'acide gallique, l'acide syringique, l'acide benzoïque, l'acide cinnamique, les acides féruliques, la myricétine, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'hespérétine, l'acide coumarique, l'isoramnétine, la chryisine, la quercétine, la galangine, la lutéoline et le kaempférol (Kassim et al., 2010 ; Petrus et al., 2011 ; Erejuwa et al., 2012). Certains composés bioactifs, par exemple la lutéoline, la galangine, l'isorhamnétine, la quercétine et le kaempférol sont présents dans la plupart des miels (Ahmad et al., 2017), d'autres tels que l'hespérétine et la naringénine sont présents dans quelques variétés de miel (Petrus et al., 2011 ; Erejuwa et al., 2012). Ces derniers ont des activités pharmacologiques importantes telles qu'antiallergiques, anti-biotiques, anti-cancérogènes et hypoglycémiques (Ahmad et al., 2017).

Les flavonoïdes désignent un groupe de produits naturels biologiquement actifs ayant une structure à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), comprenant deux cycles benzéniques reliés par un cycle pyrane hétérocyclique (Zand et al., 2000). Ils sont généralement classés en flavonols (par exemple, kaempférol, quercétine et pinobanksine), flavones (par exemple, chryisine, lutéoline et apigénine), flavanones (par exemple, pinocembrine, naringénine et hespérétine), isoflavones (par exemple, génistéine) et anthocyanidines (Kyselova, 2011). Certains flavonoïdes tels que la chryisine, la génistéine, la naringénine et la lutéoline ont montré une activité œstrogénique et sont souvent appelés phytoestrogènes (Han et al., 2002 ; Erejuwa et al., 2014). Les flavonoïdes présentent également des propriétés biologiques et pharmacologiques telles qu'antioxydant, anti-hépatotoxique, antimicrobien, anti-apoptotique, antitumoral, anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-allergique et anticholinergique (Kuzu et al., 2018 ; Benzer et al., 2018 ; Caglayan et al., 2019).

### 3- Utilisation thérapeutique :

Le grand médecin musulman **Ibn Sina** (980-1037) dans son manuel médical "Le Canon de la médecine" a rapporté les bienfaits du miel pour le traitement de diverses maladies et le maintien de la santé, en raison de ses propriétés antibactériennes, antioxydantes et cicatrisantes (Syazana et al., 2011). Les propriétés pharmacologiques du miel lui confèrent une valeur thérapeutique qui dépasse sa valeur nutritionnelle. Ces caractéristiques suggèrent que le miel est comme un alicament.

#### a- Inflammation :

Des recherches scientifiques ont prouvé que le miel présente des propriétés anti-inflammatoires (Al-Waili & Boni, 2003). Il est intéressant de noter que des composants isolés du miel peuvent favoriser la production de cytokines inflammatoires telles que les interleukines et les facteurs de nécrose tumorale (Tonks et al., 2007), où la stimulation de la production de cytokines inflammatoires est importante pour la réparation des tissus par les

cellules monocytiques humaines (Tonks et al., 2003 ; Afroz et al., 2014). À ce jour, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré l'efficacité des phénols et des flavonoïdes lorsqu'ils sont utilisés seuls ou en combinaison comme agents anti-inflammatoires (Facino, 2004 ; Galal et al., 2012).

### b- Diabète :

Le miel de Tualang produit un effet hypoglycémique modéré et améliore le stress oxydatif dans les reins des rats diabétiques induits par la streptozotocine (Erejuwa et al., 2010). Le venin d'abeille augmente la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  et abaissent le taux de glucose sanguin (Mousavi et al., 2012) grâce à ces deux principaux composants en plus de ses propriétés lipolytiques. Le venin d'abeille a un effet antiglycation important et qu'elle peut empêcher l'altération de la structure et de la fonction de l'hémoglobine induite par la glycation, ce qui pourrait également permettre de traiter les complications associées au diabète. En outre, le venin d'abeille a le potentiel de favoriser la guérison des plaies diabétiques (Grembecka & Szefer, 2013 ; Xu & Gao, 2013 ; Abdel Gawad et al., 2016).

### c- Action Antibactérienne :

Le miel naturel joue un rôle antiseptique pour tuer les bactéries comme l'*Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Shigella* etc... (Ahmad et al., 2017).

### d- Système digestif :

Le miel est utilisé contre les lésions gastriques aiguës et chroniques chez l'homme (Mobarok Ali & Swayeh, 2003 ; Alagwu et al., 2009).

### e- ADN :

Les composés phénoliques du miel peuvent pénétrer dans les lymphocytes et protéger l'ADN des dommages oxydatifs en piégeant le peroxyde d'hydrogène et/ou en chélatant les ions ferreux (Cheng et al., 2017).

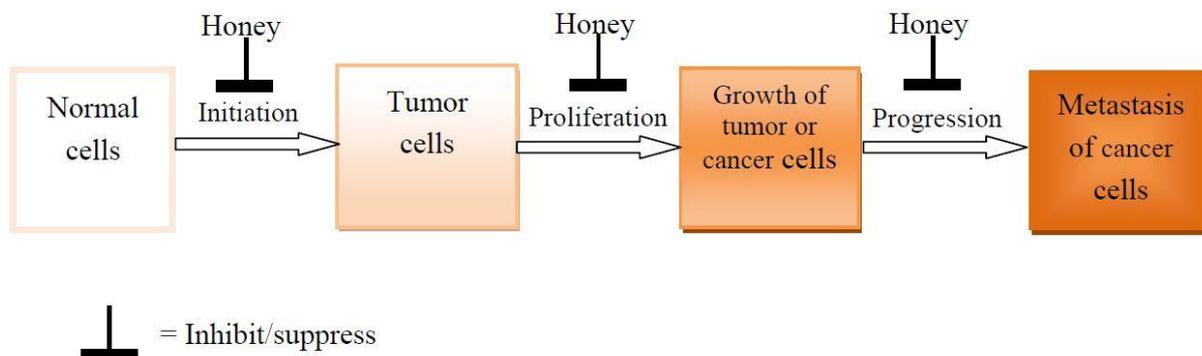
### f- Le sang :

Chez l'homme, la capacité antioxydante du sérum augmente 90 minutes après la consommation de miel de sarrasin dans l'eau (Schramm et al., 2003). Des recherches in vivo suggèrent que la supplémentation du miel augmente l'activité antioxydante du plasma et du sérum, inhibe les lipoprotéines sériques contre l'oxydation induite par le  $\text{Cu}^{2+}$  (Schramm et al., 2003 ; Gheldof et al., 2003) et réduit les dommages de l'ADN et les niveaux de MDA chez les rats (Yao et al., 2011 ; Cheng et al., 2014).

### g- Le cancer :

Le miel présente un effet anticancéreux vis-à-vis le cancer du sein, comme en témoigne son activité anti-oestrogène et son potentiel à induire la dépolarisation de la membrane mitochondriale et l'apoptose des cellules cancéreuses du sein (Erejuwa et al., 2014). Ils comprennent, entre autres, l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation de la voie mitochondriale, l'induction de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale,

l'induction de l'apoptose, la modulation du stress oxydatif, la réduction de l'inflammation, la modulation de la signalisation de l'insuline et l'inhibition de l'angiogenèse (Erejuwa et al., 2014). Le miel inhibe ou supprime les trois stades de la cancérogenèse, à savoir l'initiation, la prolifération et la progression (Erejuwa et al., 2014).



**Fig 1 :** Mécanismes et cibles moléculaires médiateurs des effets du miel.

#### 4- Miel et stress oxydant :

Galal et al., (2012) ont signalé le rôle important joué par le miel dans la prévention de la formation de radicaux hydroxyles et dans le maintien de l'intégrité et des fonctions cellulaires. Grâce à la source naturelle d'antioxydants que contient le miel où ces derniers agissent tous en synergie grâce à l'élimination des radicaux libres, au don d'hydrogène, à l'extinction de l'oxygène singulet, à la chélation des ions métalliques et à la neutralisation des réactions radicalaires (Khalil et al., 2011 ; El Denshary et al., 2012 ; Tanvir et al., 2015). L'action du miel pour prévenir les dommages oxydatifs pourrait être due à sa teneur en antioxydants phénoliques et non phénoliques ou indirectement par l'action de l'activité de la catalase dans la réduction du peroxyde d'hydrogène (El Shafey et al., 2015). Il existe une forte corrélation entre l'activité antioxydante du miel et sa composition phénolique et notamment le contenu phénolique total (Gheldof & Engeseth, 2002, Das et al., 2015) ainsi qu'une corrélation significative entre la composition antioxydante du miel et l'activité de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) où le haut pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) a confirmé le potentiel antioxydant du miel observé in vitro (Afroz et al., 2014).

#### 5- Le miel et la fonction testiculaire :

Le miel a des activités reproductives (Kadirvelu & Gurtu 2013 ; Gholami et al., 2018b). De plus, le miel a été élucidé pour augmenter la concentration de spermatozoïdes des rats en affectant les enzymes clés de la spermatogenèse (Abdulghani et al., 2008), en prévenant les lésions testiculaires et la peroxydation lipidique chez les rats exposés à la fumée de cigarette (Mohamed et al., 2011), en améliorant la motilité et la morphologie des spermatozoïdes chez les rats (Syazana et al., 2011), en augmentant le nombre de spermatozoïdes epididymaire (Mohamed et al., 2011) et en réduisant la fréquence des aberrations chromosomiques et des anomalies du sperme induites par l'intoxication au cadmium (Shahrour et al., 2016).

6- Le miel et la fonction hépatique et rénale :

Tableau 1 : Effet thérapeutiques des produits de la ruche sur le foie et les reins.

| Organes   | Produits apicoles            | Exposition (maladie)   | Effet thérapeutique   | Références                |
|---|------------------------------|--|---|---------------------------|
| Foie (plasma et histologie)                         | Miel (Turquie)               | Jaunisse obstructive (ligature et division du canal cholédoque commun)                           | -Anti-inflammatoire<br>-Antioxydant<br>-Renforce le système immunitaire   | Kılıcoglu et al., 2008    |
| Foie (plasma et histologie)                         | Propolis                     | Jaunisse obstructive (ligature et division du canal cholédoque commun)                           | -Anti-inflammatoire<br>-Antioxydant   | Kismet et al., 2008       |
| Foie (sérum et histologie)                          | Miel d'Anzer                 | N-éthylmaléimide (bloqueur de sulphydryle)   | -Hépatoprotecteur   | Korkmaz & Kolankaya, 2009 |
| Foie  | Miel de jujube               | Alcool (solvant)   | -Hépatoprotecteur<br>-Antioxydant (lésions)   | Cheng et al., 2014        |
| Foie (sérum et histologie)                          | Miel d'apice Cerana          | Bromobenzène (pesticide)   | -Hépatoprotecteur<br>-Antioxydant<br>-↓ des aminotransférases -<br>↑ des antioxydants sériques  | Zhao et al., 2017         |
| Rein (sérum et histologie)                          | Miel de Tulkarem : Palestine | <i>Furosémide</i> (un diurétique de l'anse)  | -Antidiurétique<br>-↑ l'excrétion urinaire de nitrites, la clairance de l'eau libre, le sodium filtré et la clairance de la créatinine. | Imtara et al., 2018       |
| Rein (sérum et histologie)                          | Miel de Tualang              | Streptozotocine (substance cytotoxique sur les cellules bêta des îlots de Langerhans) = diabète. | -Hypoglycémiant<br>-Anti oxydant (l'amélioration du stress oxydatif dans les reins de rats diabétiques à streptozotocine.)              | Erejuwa et al., 2011      |
| Reins (sérum et histologie)                         | Miel et Gelée royale         | Cisplatine (agent chimiothérapeutique)   | -Néphroprotecteur<br>- Histo-protecteur   | Ibrahim et al., 2015      |
| Foie et rein (sérum et histologie)<br>Sang (Anémie) | Miel de caroube              | Plomb (Métal)  | -Hépatoprotecteur<br>-Anti inflammatoire  | Fassi Fihri et al., 2016  |

|   |   |   |  |                           |
|---|---|---|--|---------------------------|
| <b>Foie et rein (Sérum et histologie)</b> | pollen d'abeille<br>Schisanda chinensis | Cisplatine (agent chimio thérapeutique) | -Antioxydant<br>-Anti-inflammatoire<br>-Anti-apoptotique | <b>Huang et al., 2017</b> |
|---|---|---|--|---------------------------|

### 7- Classification du miel :

Le miel est classé en miel poly floral et mono floral. Le miel poly floral est composé de plusieurs plantes, tandis que le miel mono floral contient essentiellement les fleurs d'une seule plante.

### 8- Le miel monofloral d'arbousier :

#### a- Fruits :

Le fruit comestible charnu d'*Arbutus unedo* est traditionnellement utilisé pour la consommation humaine dans plusieurs régions méditerranéennes, connu en Algérie sous le nom vulgaire de « Lendj » (**Doukani & Tabak, 2013**). Les fruits d'environ 2 cm de diamètre, arrivent à maturité en automne avec une couleur allant du rouge au cramoisi profond lorsqu'elles sont mûres. Les fruits matures d'*A. unedo* sont toujours caractérisés par un rapport sucre/acides élevé et une forte teneur en acides phénoliques, en composés terpénoïdes, en éléments minéraux et en tanin (**Figueiredo Nazaré Gomes, 2011**). C'est-à-dire que lorsque leur teneur élevée en tanin diminue et que leur teneur en sucre augmente (**Molina et al., 2011**). Les caractéristiques médicinales sont liées au contenu de plusieurs composés pharmacothérapeutiques actifs dans différentes parties de la plante (**Morgado et al., 2018**).

La plante contient une grande variété de composés antioxydants comme les caroténoïdes, acides organiques, phénoliques, terpénoïdes, de la niacine, vitamines E et C. Ses fruits riches en glucides ont une teneur élevée en fructose et fournissent 400 kcal/Kg poids sec (**Molina et al., 2011**). Les fruits frais sont également une bonne source d'antioxydants (flavonoïdes, anthocyanines, acide ellagique et son dérivé diglucoside) ainsi que de vitamines C et E et de caroténoïdes (**Figueiredo Nazaré Gomes, 2011**).

#### b- Utilisation thérapeutique :

Plusieurs études ont démontré l'importance ethnopharmacologique des fruits et des feuilles dans la médecine populaire pour traiter un grand nombre de maladies. Ces derniers présentent des effets antiseptiques, diurétiques, laxatifs et vasculaires et aussi utilisées pour traiter l'hypertension artérielle (**Takrouni & Boussaid, 2010 ; Morgado et al., 2018**). L'activité antioxydante totale des fruits est l'une des plus élevées des 28 fruits analysés (**García-Alonso et al., 2004**). Les feuilles présentent des activités anti-agrégantes, antidiabétiques, anti-inflammatoires et anti-tumorales (**Molina et al., 2011 ; Doukani & Tabak, 2013 ; Morgado et al., 2018**). Ils sont également utilisés comme antidiarrhéiques, astringents, et dépuratifs (**Sulusoglu et al., 2011**).

Les feuilles et l'écorce ont été utilisées pour le tannage et sont également appréciées pour leurs propriétés médicinales. Les graines contiennent une huile essentielle aux

propriétés siccatives. Une décoction de feuilles riches en tanin est utilisée comme diurétique pour traiter les infections urinaires et la diarrhée. Les racines macérées sont utilisées comme boisson et sont dépuratives et décongestionnantes (**Khela & Rivers 2017**).

### c- Nectar et pollen :

Les fleurs d'arbousier sont une source importante de nectar et de pollen pour les abeilles (**Figueiredo Nazaré Gomes, 2011**). Le nectar produit par les fleurs est à l'origine du célèbre miel amer ou la Sardaigne est l'un des plus grands producteurs au monde (**Floris et al., 2007**) où le potentiel mellifère de cette plante est d'environ 40 kg/ha (**Floris et al., 1991**). La sécrétion de nectar est optimale entre le début de novembre et les le début de décembre, tandis que la période de floraison est plus longue et dure d'octobre à janvier (**Floris et al., 2007**).

### d- Le miel d'Arbutus :

C'est un miel uniflore typique et réputé dans certaines régions méditerranéennes. En raison de son goût caractéristique, ce miel est connu sous le nom de "miel amer" et a été traditionnellement utilisé principalement à des fins curatives. Sa faible production par la ruche et ses propriétés biologiques présumées, le miel amer a une importance économique remarquable et son prix sur le marché (Italie) est de 4 à 8 fois plus élevé que celui d'un miel doux (**Floris et al., 2007 ; Tuberoso et al., 2010**).

### e- Composition chimique et effet antioxydant :

Le miel amer est caractérisé par une faible activité diastasique et des niveaux élevés d'acidité libre et de conductivité électrique (teneur en cendres). En raison de la période de production de ce miel, son humidité est souvent plus élevée que celle des autres types de miel. La présence des glucosides arbutine et méthylarbutine et une teneur élevée en phénols et en acide gluconique ont été démontrées (**Floris et al., 2007**). Le miel d'arbousier présente la plus forte activité antioxydante par rapport aux miels d'autres origine botanique (**Rosa et al., 2011 ; Aazza et al., 2013 ; Alves et al., 2013 ; Lovaković et al., 2017**). Il présente des propriétés antioxydantes exceptionnelles en raison de sa teneur élevée en composés phénoliques, particulièrement des flavonoïdes et des acides phénoliques (**Cherchi et al., 1994 ; Tuberoso et al., 2013**). Sa capacité antioxydante a été attribuée à des quantités élevées de l'acide homogentisique (ou acide 2,5-dihydroxyphénylacétique : HGA) étant le composé phénolique le plus abondant et le marqueur d'origine botanique le plus fiable (**Deiana et al., 2016**) qui représente environ 50-60% des phénols totaux (**Rosa et al., 2011**). Le miel de fraisier a montré une quantité très élevée en polyphénols (972 mg/kg EAG), une activité antioxydante élevée dans le test la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power) ( $11,7 \pm 1,7$  mmol Fe<sup>2+</sup>/kg), et la capacité de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ( $4,8 \pm 0,8$  mmol TEAC/kg) (**Rosa et al., 2011**). Les effets bénéfiques de la consommation du miel d'arbousier sur le statut antioxydant, les indices hématologiques, les taux d'enzymes et la concentration de fer sérique ont récemment été suggérée (**Brčić Karačonji et al., 2014**).

### **f- Activité de l'acide homogentisique (HGA) :**

Le HGA est impliqué dans la voie décrite pour la biosynthèse des plastoquinones (une coenzyme participant la photosynthèse) et des tocophérols (Vitamine E) dans les plantes supérieures mais aussi un catabolite du métabolisme phénolique dans une grande variété d'organismes supérieurs (mammifères, poissons, oiseaux, amphibiens et plantes). Chez l'homme, l'HGA est un intermédiaire dans le métabolisme de la tyrosine (acide aminé), normalement métabolisé par l'enzyme homogentisate 1,2-dioxygénase (**Rosa et al., 2011**). Grâce à la capacité de piégeage de ce miel (essais DPPH et FRAP) contre l'oxydation lipidique (**Rosa et al., 2011**), le HGA a montré, une activité antioxydante, anti radicalaire et protectrice intéressante, tels que des actions défensives contre la dégradation thermique du cholestérol (**Spano et al., 2006 ; Afrin et al., 2017**) mais aussi sa capacité à protéger les LDL (Low Density Lipoprotein) contre l'oxydation induite par le cuivre (**Rosa et al., 2011**). Une autre étude de **Kang et al., (2005)** a démontré que ce dernier, capte les radicaux DPPH et prévient la peroxydation des lipides induite par l' $H_2O_2$  dans les fibroblastes humains. Le HGA induit des effets cytotoxiques et mutagènes et qu'il semble se produire par un mécanisme d'oxydation basé sur la capacité de ce composé à subir une auto-oxydation, conduisant à la formation de quinones avec production des (ROS) (**Hiraku et al., 1998 ; Urios et al., 2003**). Le tableau suivant représente la composition chimique du miel d'arbousier.

**Tableau 2 : La composition du miel d'Arbusier (Aazza et al., 2013).**

| <b>Composition physico-chimique</b> |        | <b>Composition minéral</b>      |         |
|-------------------------------------|--------|---------------------------------|---------|
| <b>pH</b>                           | 4.49   | <b>Sodium (mg/kg)</b>           | 161.02  |
| <b>Acidité libre</b>                | 20.17  | <b>Potassium (mg/kg)</b>        | 1736.29 |
| <b>Acidité lactonique</b>           | 12.25  | <b>Calcium (mg/kg)</b>          | 24.92   |
| <b>Acidité total</b>                | 32.42  | <b>Magnésium (mg/kg)</b>        | 50.00   |
| <b>Cendre</b>                       | 0.70   | <b>Na+K+Ca+M (mg/kg)</b>        | 1972.23 |
| <b>Conductivité électrique</b>      | 875.67 |                                 |         |
| <b>Humidité</b>                     | 19.8   |                                 |         |
| <b>Pfund échelle (mm)</b>           | 88.9   |                                 |         |
| <b>Couleur</b>                      | Ambre  |                                 |         |
| <b>Proline (mg/kg)</b>              | 341.82 |                                 |         |
| <b>Diastase (Schade units/g)</b>    | 2.25   |                                 |         |
| <b>HMF (mg/kg)</b>                  | 8.2    |                                 |         |
| <b>Teneur en sucre (g/kg)</b>       |        | <b>Activité antioxydante</b>    |         |
| <b>Fructose</b>                     | 359.63 | <b>Vitamine C (mg/kg)</b>       | 71.57   |
| <b>Glucose</b>                      | 267.43 | <b>Phénols (mg EAG/100g)</b>    | 117.65  |
| <b>Sucrose</b>                      | 3.75   | <b>Flavonoïdes (mg EQ/100g)</b> | 9.66    |
| <b>Turanose</b>                     | 16.49  | <b>TEAC (IC50 = mg/ml)</b>      | 0.44    |
| <b>Maltose</b>                      | 21.53  | <b>ORAC (μmol TE/g)</b>         | 39.55   |
| <b>Tréhalose</b>                    | 10.43  | <b>Chélation (IC50 = mg/ml)</b> | 2.60    |
| <b>Melezitose</b>                   | 5.38   | <b>NO (IC50 = mg/ml)</b>        | 9.83    |
| <b>Glucose +fructose</b>            | 627.   |                                 |         |

## **Partie 4 : Références**

1. **Aazza S**, Lyoussi B, Antunes D, Miguel MG (2013) Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Commercial Portuguese Honeys. *J Food Sci* 78(8): 1159-1165
2. **Abarikwu SO**, Benjamin S, Ebah SG, Obilor G, Agbam G (2016) Oral administration of Moringa oleifera oil but not coconut oil prevents mercury-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia* 49(1): 1-13
3. **Abarikwu SO**, Njoku R-CC, Onuah CL (2018) Aged coconut oil with a high peroxide value induces oxidative stress and tissue damage in mercury-treated rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 29(4):365-376
4. **Abdel Gawad S**, Fikry H, Maged Amin M, Ramadan Elmahdi A, Abd Elaziz D (2016) Effect of apitherapy on the pancreas & liver of streptozotacin induced diabetic rats. A biochemical and histological study. *Eur J Pharm Med Res* 3(7): 555-565
5. **Abdennour C**, Khelili K, Boulakoud MS, Nezzal A, Boubsil S, Slimani S (2002) Urinary markers of workers chronically exposed to mercury vapor. *Environ Res* 89 (3): 245-249
6. **Abdul-Ghani AS**, Dabdoub N, Muhammad R, Abdul-Ghani R, Qazzaz M (2008) Effect of Palestinian honey on spermatogenesis in rats. *J Med Food* 11(4): 799-802
7. **Adams DH**, Sonne C, Basu N, Dietz R, Nam DH, Leifsson PS, Jensen AL (2010) Mercury contamination in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*: an assessment of liver, kidney, blood, and nervous system health. *Sci Total Environ* 408(23): 5808-5816
8. **Adjlane N**, Haddad N, Ameer KL, Kesraoui S, Moussaoui D (2014) Physicochemical and microbiological characteristics of some samples of honey produced by beekeepers in Algeria. *Acta Technol Agric* 17(1): 1-5
9. **Afrin S**, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Bompadre S, Quiles JL, Sanna G, Spano N, Giampieri F, Battino M (2017) Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ROS generation: A comparison with Manuka honey. *Int J Mol Sci* 18(613): 1-19
10. **Afroz R**, Tanvir EM, Hossain MF, Gan SH, Parvez M, Islam MA, Khalil MI (2014) Protective Effect of Sundarban Honey against Acetaminophen-Induced Acute Hepatonephrotoxicity in Rats. *Medicine Evid Based Complement Alternat Med*, Volume 2014, Article ID 143782, 8 pages
11. **Agarwal R**, Goel SK, Chandra R, Behari JR (2010 b) Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 29(1):70-78
12. **Agarwal R**, Raisuddin S, Tewari S, Goel SK, Raizada RB, Behari JR (2010a) Evaluation of Comparative Effect of Pre- and Posttreatment of Selenium on Mercury-Induced Oxidative Stress, Histological Alterations, and Metallothionein mRNA Expression in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 24(2):123-135
13. **Agrawal S**, Flora G, Bhatnagar P, Flora SJS (2014) Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell Mol Biol* 60 (2): 13-21
14. **Ahmad RS**, Hussain MB, Saeed F, Waheed M, Tufail T (2017) Phytochemistry, Metabolism and Ethnomedical Scenerio of Honey: A Concurrent Review. *Int J Food Prop* 20(1): 1-44
15. **Ahmed M**, Djebli N, Aissat S, Meslem A, Bacha S (2012) The influence of botanical origin and physicochemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. *J Plant Pathol Microb* 3(5): 1-5
16. **Ahmed MM**, El-Shazly SA, Alkafafy ME, Mohamed AA, Mousa, AA (2018) Protective potential of royal jelly against cadmium-induced infertility in male rats. *Andrologia* 50(5): e12996
17. **Alagwu EA**, Nneli RO, Okwari OO, Osim EE (2009) Bile secretion in albino rat following chronic honey intake. *Niger J Physiol Sci* 24(2):203-206

18. **Al-Attar AM (2011)** Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi J Biol Sci* 18(4):395-401
19. **Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Vidal A, Battino M (2009)** Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Curr Anal Chem* 5(4): 293-302
20. **Alves A, Ramos A, Goncalves MM, Bernardo M, Mendes B (2013)** Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J Food Compos Anal* 30(2): 130-138
21. **Al-Waili NS, Boni NS (2003)** Natural Honey Lowers Plasma Prostaglandin Concentrations in Normal Individuals. *J Med Food* 6(2):129-133
22. **Al-Waili NS, Saloom KY, Akmal M, Al-Waili F, Al-Waili TN, Al-Waili AN, Ali A (2006)** Honey ameliorates influence of hemorrhage and food restriction on renal and hepatic functions, and hematological and biochemical variables. *Int J Food Sci Nutr* 57(5-6): 353-362
23. **Ansar S, Iqbal M (2016)** Protective effect of diallylsulphide against mercuric chloride-induced hepatic injury in rats. *Hum Exp Toxicol* 35(12):1305-1311
24. **Aslanturk A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Demir F (2014)** Sodium selenite and vitamin E in preventing mercuric chloride induced renal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 70: 185-190
25. **Assefa S, Curtis JT, Sethi S, Davis RL, Chen Y, Kaul R (2012)** Inorganic mercury exposure in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) alters the expression of toll-like receptor 4 and activates inflammatory pathways in the liver in a sex-specific manner. *Hum Exp Toxicol* 1(4):376-386
26. **ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1999)** Toxicological profile for mercury. US Department of Health and Human Services Public Health Service. Available at <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp46.pdf>
27. **Austin D (2008)** An epidemiological analysis of the “autism as mercury poisoning” hypothesis. *Int J Risk Saf Med* 20:135-142
28. **Bando I, Sánchez Reus MI, Andrés D, Cascales M (2005)** Endogenous Antioxidant Defence System in Rat Liver Following Mercury Chloride Oral Intoxication. *J Biochem Mol Toxicol* 19 (3):154-161
29. **Beigi Boroujeni MB, Shahrokhi SS, Birjandi M, Abbaszadeh A, Beyranvand F, Hamoleh S, Zandbaf Z, Gholami M (2017)** Effects of pomegranate peel extract on histopathology, testosterone levels and sperm of testicular torsion–detorsion induced in adult Wistar rats. *J Complement Integr Med* 14(4): 1-7
30. **Bellanger M, Pichery C, Aerts D, Berglund M, Castano A, Cejchanova M, Crettaz P, Davidson F, Esteban M, Fischer M E, Gurzau AE, Halzlova K, Katsonouri A, Knudsen L E, Kolossa-Gehring M, Koppen G, Ligocka D, Miklavčič A, Reis MF, Rudnai P, Tratnik J S, Weihe P, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P, DEMO/COPHES (2013)** Economic benefits of methylmercury exposure control in Europe: monetary value of neurotoxicity prevention. *Environ Health* 7(12):3
31. **Benzer F, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kucukler S, Caglayan C (2018)** Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 32 (2): e22030
32. **Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM (2005)** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* 533: 185-191

33. **Berlin M, Zalups RK, Fowler BA (2015)** Mercury, in: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M (Eds.), Handbook of the Toxicology of Metals. Volume II: Specific Metals. Academic Press, San Diego, USA, pp. 1013-1075
34. **Bharathi E, Jagadeesan G (2014)** Antioxidant potential of hesperidin and ellagic acid on renal toxicity induced by mercuric chloride in rats. *Biomed Prev Nutr* 4 (2): 131-136
35. **Bouasla A, Bouasla I (2017)** Ethnobotanical survey of medicinal plants in Northeastern of Algeria. *Phytomedicine* 36: 68-81
36. **Boujbiha MA, Hamden K, Guermazi F, Bouslama A, Omezzine A, Kammoun A, El Feki A (2009)** Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. *Reprod Toxicol* 28(1): 81-89
37. **Boukraâ, L. (2015)** Honey in Traditional and Modern Medicine. Traditional Herbal Medicines for Modern Times. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
38. **Brčić Karačonji I, Tariba B, Živković T, Brajenović N, Jurica K, Pezer M, Turkalj M, Vihnanek Lazarus M, Lušić D, Pizent A (2014)** Beneficial effects of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey supplementation in men, in: I. Brčić Karačonji, D. Lušić (Eds.), B. Abstr. Int. Symp. Bee Prod. 3rd Ed. - Annu. Meet. Int. Honey Comm., Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, poster n° 110.
39. **Caglayan C, Kandemir F M, Darendelioglu E, Yıldırım S, Kucukler S, Dortbudak MB (2019)** Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Trace Elem Med Biol* 56:60-68
40. **Carneiro MF, Morais C, Barbosa F Jr, Gobe GC (2013)** Thimerosal in childhood vaccines contributes to accumulating mercury toxicity in the kidney. *Environ Toxicol Chem* 95:1424-1447
41. **Chapman L, Chan HM. (2000)** The influence of nutrition on methylmercury intoxication. *Environ Health Perspect* 108 (Suppl 1): 29-56
42. **Chatterjee S, Ray A, Mukherjee S, Agarwal S, Kundu R, Bhattacharya S (2014)** Low concentration of mercury induces autophagic cell death in rat hepatocytes. *Toxicol Ind Health* 30(7): 611-620
43. **Chefrour A, Draiaia R, Tahar A, Kaki YA, Bennadja S, Battesti MJ (2009)** Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some North-East Algerian honeys. *Afr. J. Food Agric Nutr Dev* 9(5): 1276-1293
44. **Cheng JW, Ko EY (2019)** Chapter 1.7 - Causes of Reductive Stress in Male Reproduction. Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. Pages 55-64
45. **Cheng N, Du B, Wang Y, Gao H, Cao W, Zheng J, Feng F (2014)** Antioxidant properties of jujube honey and its protective effects on chronic alcohol-induced liver damage in mice. *Food & Funct*, 24 pages
46. **Cheng N, Wang Y, Cao W (2017)** The Protective Effect of Whole Honey and Phenolic Extract on Oxidative DNA Damage in Mice Lymphocytes Using Comet Assay. *Plant Foods Hum Nutr* 72(4):388-395
47. **Cherchi A, Spanedda L, Tuberoso C, Cabras P (1994)** Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *J Chromatogr A* 669(1-2): 59-64
48. **Cho HW, Kim S H and Park MJ (2020)** An association of blood mercury levels and hypercholesterolemia among Korean adolescents. *Sci Total Environ* 709: 135965

49. **Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A (2007)** Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence-based analysis. *Int Braz J Urol* 33(5): 603-621
50. **Cuvin-Aralar MLA, Furness RW (1991)** Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 21(3): 348-364
51. **Das A, Datta S, Mukherjee S, Bose S, Ghosh S, Dhar P (2015)** Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. *Food Sci Technol* 61 (1): 244-250
52. **Deepmala J, Deepaka M, Srivastava S, Sangeeta S, Kumarb SA, Kumarb SS (2013)** Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protect acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Bio* 27(3): 249-256
53. **Deiana V, Tuberoso CIG, Satta A, Pinna C, Camarda I, Spano N, Ciulu M, Floris I (2016)** Relationship between markers of botanical origin in nectar and honey of the strawberry tree (*Arbutus unedo*) throughout flowering periods in different years and in different geographical areas. *J Apic Res* 54: 342-349
54. **Deng Y, Xu Z, Liu W, Yang H, Xu B, Wei Y (2011)** Effects of lycopene and proanthocyanidins on hepatotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Biol Trace Elem Res*, 146(2): 213-223
55. **Doukani K, Tabak S (2015)** Profil Physicochimique du fruit "Lendj" (*Arbutus unedo* L.). *Revue « Nature & Technologie ». B-Sciences Agronomiques et Biologiques* 12 : 53-66
56. **Drif F, Abdennour C, Cigerci İH, Ali MM, Mansouri O, Messarah M (2019)** Preliminary Assessment of Stress and Genotoxicity Biomarkers in Bivalve Molluscs from the Gulf of Annaba, Algeria. *Bull Environ Contam Toxicol* 102(4):555-559
57. **El Denshary ES, Al-Gahazali MA, Mannaa FA, Salem HA, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA (2012)** Dietary honey and ginseng protect against carbon tetrachloride-induced hepatonephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 64(7-8):753-760
58. **El Rabey HA, Al-Seeni MN, Al-Solamy SM (2013)** Bees' Honey Protects the Liver of Male Rats against Melamine Toxicity. *Biomed Res Int*, Volume 2013, Article ID 786051, 8 pages
59. **Elblehi SS, Hafez MH, El-Sayed YS (2019)** L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine attenuates mercury-induced hepato-renal damage through suppressing oxidative stress and inflammation. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(9): 9333-9342
60. **El-Demerdash FM (2001)** Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. *J Environ Sci Health B* 36(4):489-499
61. **El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH (2004)** Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem Toxicol* 42(10):1563-1571
62. **El-Desoky GE, Bashandy SA, Alhazza IM, Al-Othman ZA, Aboul-Soud MAM, Yusuf K (2013)** Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by *Spirulina platensis* in Rats. *PLoS ONE* 8(3): e59177
63. **El-Shafey AAM, Seliem MME, El-Zawahry SAM, Shahen EMS, Mahmoud DEM (2015)** Effect of honey bee on some antioxidant enzymes and lipid profile in hypercholesterolemic male albino rats. *Zagazig University Medical Journal* 21(1): 68-78
64. **EPA (2018)** How people are exposed to mercury. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
65. **Erejuwa OO, Gurtu S, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh MSM (2010)** Hypoglycemic and Antioxidant Effects of Honey Supplementation in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Int J Vitam Nutr Res* 80(1):74-82

66. **Erejuwa** OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS (2012) Honey: A Novel Antioxidant. *Molecules* 17(4): 4400-4423
67. **Erejuwa** OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS (2014) Effects of Honey and Its Mechanisms of Action on the Development and Progression of Cancer. *Molecules* 19: 2497-2522
68. **Erejuwa** OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, Salam SKN, MS Salleh Md, Gurtu S (2011) Comparison of Antioxidant Effects of Honey, Glibenclamide, Metformin, and Their Combinations in the Kidneys of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci* 12(1): 829-843
69. **Ernst** E, Moller-Madsen B, Danscher G (1991) Ultrastructural demonstration of mercury in sertoli and Leydig cells of the rat following methyl mercuric Chloride or mercuric chloride treatment. *Reprod Toxicol* 5(3): 205-209
70. **Facino** RM (2004) Honey in tumor surgery. *Arch Surg* 139(7): 802
71. **Fang** Y-Z, Yang S, Wu G (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10):872-9
72. **FAO** (1996) Value-added products from beekeeping. FOA Agricultural Services Bulletin. Rome, Italy: FAO.
73. **Farina** M, Brandão R, Lara FS, Soares FAA, Souza DO, Rocha JBT (2003) Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of delta-aminolevulinate dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicol Lett* 139(1):55-66
74. **Farina** M, Soares FAA, Zeni G, Souza DO, Rocha JBT (2004) Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. *Toxicol Lett* 146 (3): 227-35
75. **Fassi Fihri** A, Al-Waili NS, El-Haskoury R, Bakour M, Amarti A, Ansari MJ, Lyoussi B (2016) Protective Effect of Morocco Carob Honey Against Lead-Induced Anemia and Hepato-Renal Toxicity. *Cell Physiol Biochem* 39(1): 115-122
76. **Figueiredo Nazaré Gomes** Maria Filomena (2011) Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): in vitro propagation, mycorrhization and diversity analysis. These de doctorat, Universidade de Coimbra.
77. **Ferreira** ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM (2009) Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem* 114(4): 1438-1443
78. **Flora** SJS, Mittal M, Mehta A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress & it's possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res* 128(4): 501-523
79. **Floris** I, Prota R, Lentini A (1991a) Flora di interesse apistico della Sardegna (I. Indagine sul potenziale mellifero di *Arbutus unedo* L. in Sardegna settentrionale) *Atti Stato attuale e sviluppo della ricerca in apicoltura Sassari* 25–26 ottobre 1991: 189–200
80. **Floris** I, Satta A, Ruiu L (2007) Honeys of Sardinia (Italy). *Journal of Apicultural Research and Bee World* 46(3): 198-209
81. **Fouda** A-MM, Daba M-HY, Dahab GM, Sharaf el-Din OA (2008) Thymoquinone Ameliorates Renal Oxidative Damage and Proliferative Response Induced by Mercuric Chloride in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(2):109-118
82. **Frenedoso da Silva** R, Missassi G, dos Santos Borges C, Silva de Paula E, Hornos Carneiro MF, Grotto D, Barbosa Junior F., De Grava Kempinas W (2014) Phytoremediation Potential of *Maná-Cubiu* (*Solanum sessiliflorum* Dunal) for the Deleterious Effects of Methylmercury on the Reproductive System of Rats. *Hindawi Publishing Corporation, Biomed Res Int*, Volume 2014, Article ID 309631, 9 pages
83. **Galal** RM, Zaki HF, El-Nasr MMS, Agha AM (2012) Potential protective effect of honey against paracetamol induced hepatotoxicity. *Arch Iran Med* 15(11): 674-680

84. **García-Alonso M**, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC (2004) Evaluation of the Antioxidant Properties of Fruits. *Food Chem* 84(1): 13-18
85. **Gharagozloo P**, **Aitken RJ** (2011) The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 26(7): 1628-1640
86. **Gheldof N**, **Engeseth NJ** (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* 50(10):3050-3055
87. **Gheldof N**, Wang XH, Engeseth NJ (2003) Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 51(5): 1500-1505
88. **Gholami M**, Abbaszadeh A, Baharvand P, Hasanvand A, Gharravi AM (2018b) Protective effects of persian honey, *Apis Mellifera Meda Skorikov* on side effects of chemotherapy and ischemia/reperfusion induced testicular injury. *J Complement Integr Med* 15 (4): 1-7
89. **Gholami M**, Abbaszadeh A, Khanipour Khayat Z, Anbari K, Baharvand P, Gharravi AM (2018 a) Honey improves spermatogenesis and hormone secretion in testicular ischaemia–reperfusion-induced injury in rats. *Andrologia* 50(1): e12804
90. **Gil-Guzman E**, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AT Jr, Agarwal A (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16(9):1922-1930
91. **Grembecka M**, **Szefer P** (2013) Evaluation of honeys and bee products quality based on their mineral composition using multivariate techniques. *Environ Monit Assess* 185(5): 4033-4047
92. **Gülçin İ** (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86(3):345-391
93. **Hales DB**, Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH (2005) Mitochondrial Function in Leydig Cell Steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1061: 120-134
94. **Han DH**, Denison MS, Tachibana H, Yamada K (2002) Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(7): 1479-1487
95. **Hansen JM**, Zhang H, Jones DP (2006) Differential oxidation of thio-redoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med* 40(1): 138-145
96. **Haouam L**, Tahar A, Dailly H, Lahrichi A, Chaqroune A, Abdennour C (2016) Physicochemical properties and major elements contents of Algerian honeys from semi-arid regions. *Emir J Food Agric* 28(2): 107-115
97. **Hazelhoff MH**, **Torres AM** (2018) Gender differences in mercury-induced hepatotoxicity: potential mechanisms. *Chemosphere* 202: 330-338
98. **Hemadi M**, Saki G, Rajabzadeh A, Khodadadi A, Sarkaki A (2013) The effects of honey and vitamin E administration on apoptosis in testes of rat exposed to noise stress. *J Hum Reprod Sci* 6(1): 54-58
99. **Hightower JM**, O'Hare A, Hernandez GT (2006) Blood mercury reporting in NHANES identifying Asian, Pacific Islander, Native American, and multiracial groups. *Environ Health Perspect* 114(2): 173-175
100. **Hiraku Y**, Yamasaki M, Kawanishi S (1998) Oxidative DNA damage induced by homogentisic acid, a tyrosine metabolite. *FEBS Lett* 432(1-2):13-16
101. **Hosseini A**, Rajabian A, Fanoudi S, Farzadnia M, Boroushaki MT (2018) Protective effect of *Rheum turkestanicum* root against mercuric chloride-induced hepatorenal toxicity in rats. *Avicenna J Phytomed* 8(6): 488-497

102. **Hossen** MS, Ali MY, Jahurul MHA, Abdel-Daim MM, Gan SH, Khalil MI (2017) Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: a review. *Pharmacol Rep* 69(6):1194-1205
103. **Huang** H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X (2017) Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. *Biomed Pharmacother* 95:1765-1776
104. **Ibegbu** AO, Ayuba M, Animoku AA, Brosu D, Adamu SA, Akpulu P, Hamman WO, Umana UE, Musa SA (2014) Effect of Ascorbic acid on Mercury-induced changes on the liver in Adult Wistar Rats. *J appl Dent Med sci* 13(10):10-16
105. **Ibrahim** A, Abd Eldaim MA, Abdel-Daim MM (2015) Nephroprotective effect of bee honey and royal jelly against subchronic cisplatin toxicity in rats. *Cytotechnology* 68(4): 1039-1048
106. **Imtara** H, Al-Waili N, Bakour M, Al-Waili W, Lyoussi B (2018) Evaluation of antioxidant, diuretic, and wound healing effect of Tulkarm honey and its effect on kidney function in rats. *Vet World* 11(10): 1491-1499
107. **Jalili** C, Roshankhah S, Jalali A, Salahshoor MR (2019) Hepatoprotective Activity of Royal Jelly on Mercuric Chloride–induced Damage Model in Rats. *J Rep Pharm Sci* 8(2):181-187
108. **Jia** G, Aroor AR, Martinez-Lemus LA, Sowers JR (2015) Mitochondrial functional impairment in response to environmental toxins in the cardiorenal metabolic syndrome. *Arch Toxicol* 89(2):147-153
109. **Joshi** D, Kumar MD, Kumar SA, Sangeeta S (2014) Reversal of Methylmercury-Induced Oxidative Stress, Lipid Peroxidation, and DNA Damage by the Treatment of N-Acetyl Cysteine: A Protective Approach. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 33(2):167-182
110. **Joshi** D, Mittal DK, Kumar R, Srivastav AK, Srivastav SK (2013) Protective role of Curcuma longa extract and curcumin on mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rats: evidence by histological architecture. *Toxicol Environ Chem* 95(9): 1581-1588
111. **Joshi** D, Mittal DK, Shrivastava S, Shukla S (2010) Protective Role of Thiol Chelators Against Dimethylmercury Induced Toxicity in Male Rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 84(5):613-617
112. **Joshi** D, Srivastav SK, Belemkar S, Dixit VA (2017) Zingiber officinale and 6-gingerol alleviate liver and kidney dysfunctions and oxidative stress induced by mercuric chloride in male rats: A protective approach. *Biomed Pharmacother* 91:645-655
113. **Joshi** D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav AK (2012) Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethyl mercury toxicity in male albino rats. *Exp Toxicol Pathol* 64(1-2):103-108
114. **Juresa** D, Blanusa M, Kostial K. (2005) Simultaneous administration of sodium selenite and mercuric chloride decreases efficacy of DMSA and DMPS in mercury elimination in rats. *Toxicol Lett* 155(1) :97-102
115. **Kadirvelu** A, **Gurtu** S (2013) Potential benefits of honey in type 2 diabetes mellitus: A review. *Int J Collab Res Intern Med Public Health* 5(4): 199-206
116. **Kahraman** T, Buyukunal SK, Vural A, Altunatmaz SS (2010) Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chem* 123: 41-44
117. **Kalender** S, Uzun FG, Demir F, Uzunhisarcıklı M, Aslanturk A (2013) Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem Toxicol* 55: 456-462
118. **Kang** KA, Chae S, Lee KH, Zhang R, Jung MS, You HJ, Kim JS, Hyun JW (2005) Antioxidant effect of homogentisic acid on hydrogen peroxide induced oxidative stress in human lung fibroblast cells. *Biotechnol. Bioprocess Eng* 10(6): 556-563

119. **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):650-659
120. **Khalil M**, Alam N, Moniruzzaman M, Sulaiman S, Gan S. (2011) Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *J Food Sci* 76: 921-928
121. **Khan AT**, Atkinson A, Graham TC, Thompson SJ, Ali S, Shireen KF (2004) Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. *Food Chem Toxicol* 42(4): 571-577
122. **Khela S**, **Rivers MC** (2017) *Arbutus unedo*, Strawberry Tree. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T202930A68076133.
123. **Kılıcoglu B**, Gencay C, Kısmet K, Kılıcoglu SS, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA (2008) The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg* 195(2):249-256
124. **Kim KH**, Kabir E, Jahan SA (2016) A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *J Hazard Mater* 306:376-385
125. **Kinsella JE**, Frankel E, German B, Kanner J, Kinsella GJ (1993) Possible mechanism for the protective role of the antioxidant in wine and plant foods. *Food Tech* 47: 85- 89
126. **Kismet K**, Sabuncuoglu MZ, Kilicoglu SS, Kilicoglu B, Devrim E, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA (2008) Effect of Propolis on Oxidative Stress and Histomorphology of Liver Tissue in Experimental Obstructive Jaundice. *Eur Surg Res* 41(2): 231-237
127. **Korkmaz A**, **Kolankaya D** (2009) Anzer honey prevents N-ethylmaleimide-induced liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol* 61(4):333-337
128. **Kostial K**, Kello D, Jugo S, Rabar I, Maljković T (1978) Influence of age on metal metabolism and toxicity. *Environ Health Perspect* 25:81-86
129. **Kromidas L**, Trombetta LD, Jamall IS (1990) The protective effects of glutathione against methyl mercury cytotoxicity. *Toxicol Lett* 51(1): 67–80
130. **Kuzu M**, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Caglayan C, Turk E (2018) Morin attenuates doxorubicin-induced heart and brain damage by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 106: 443–453
131. **Kyselova Z** (2011) Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. *Interdiscip Toxicol* 4(4): 173-183
132. **Lanzafame FM**, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE (2009) Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 19(5): 638-659
133. **Lavranos G**, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R (2012) Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 34(3):298-307
134. **Liu W**, Xu Z, Li H, Guo M, Yang T, Feng S, Xu B, Yu Deng (2016) Protective effects of curcumin against mercury-induced hepatic injuries in rats, involvement of oxidative stress antagonism, and Nrf2-ARE pathway activation. *Hum Exp Toxicol* 36(9): 949-966
135. **Lovaković BT**, Lazarus M, Karačonji IB, Jurica K, Semren TŽ, Lušić D, Brajenović N, Pelić Z, Pizent A (2017) Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. *J Trace Elem Med Biol* 45: 85-92
136. **Lund B-O**, Miller DM, Woods JS (1991) Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 42 Suppl:181-187
137. **Lund B-O**, Miller DM, Woodst JS (1993) Studies on Hg (II)-induced H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 45(10):2017-2024

138. **Magos L, Clarkson TW (2006)** Overview of the clinical toxicity of Mercury. *Ann Clin Biochem* 43(4): 257-268
139. **Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT (2001)** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B* 36(5):687-697
140. **Majlesi M, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J, Eskandari MH (2017)** Effect of Probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on Alleviation of Mercury Toxicity in Rat. *Probiotics Antimicro Prot* 9(3): 300-309
141. **Makhloufi C, Kerkvliet JD, D'albore GR, Choukri A, Samar R (2010)** Characterization of Algerian honey by palynological and physicochemical methods. *Apidologie* 41(1): 509-521
142. **Makker K, Agarwal A, Sharma R (2009)** Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res* 129(4):357-367
143. **Manju M, Jagadeesan G (2019)** In Vivo Hepatoprotective Effect Of Caffeic Acid On Mercuric Chloride-Induced Biochemical Changes In Albino Wistar Rats. *Asian J Pharm Clin Res* 12(4): 119-124
144. **Martinez CS, Escobar AG, Torres JG, Brum DS, Santos FW, Alonso MJ, Salaices M., Vassallo DV, Peçanha FM, Leivas FG, Wiggers GA (2014)** Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. *J Toxicol Environ Health A*, 77(1-3): 143-154
145. **Martinez CS, Pecanha FM, Brum DS, Santos FW, Franco JF, Zemolin APP, Anselmo-Franci JA, Junior FB, Alonso MJ, Salaices M, Vassallo DV, Leivas FG, Wiggers GA (2016)** Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels: evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats. *Reprod Fertil Dev* 29(9): 1803-1812
146. **Maser RL, Magenheimer BS, Calvet JP (1994)** Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion. *J Biol Chem* 269(43): 27066-27073
147. **McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, Palmer CD, Parsons P J (2007)** A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environ Health Perspect* 115(10):1435-1441
148. **Merzoug S, Toumi ML, Oumeddour A, Boukhris N, Baudin B, Tahraoui A, Bairi A (2009)** Effect of inorganic mercury on biochemical parameters in Wistar rat. *J Cell Anim Biol* 3 (12): 222-230
149. **Mobarok Ali AM, AL Swayeh OA (2003)** Honey potentiates the gastric protection effects of sucralfate against ammonia induced gastric lesions in rats. *Saudi J Gastroenterol* 9: 117-123
150. **Mohamed ET, Mahran HA, Mahmoud MS (2010)** Hepato ameliorative effect of *Azadirachta indica* leaves extract against mercuric chloride environmental pollution. *Journal of American Science* 6: 735-751
151. **Mohamed M, Burbacher T, Mottet M (1987)** Effects of methyl mercury on testicular functions in *Macaca fascicularis* monkey. *Pharmacol Toxicol* 60(1): 29-36
152. **Mohamed M, Sulaiman SA, Jaafar H, Sirajudeen KNS (2011)** Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats. *Int J Mol Sci* 12(9): 5508-5521
153. **Molina M, Pardo-De-Santayana M, Aceituno L, Morales R, Tardío J (2011)** Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry* 84(4):419-429
154. **Moniruzzaman M, Sulaiman SA, Azlan SAM, Gan SH (2013)** Two-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in *Acacia* honey. *Molecules* 18 (12): 14694-710

155. **Morgado S**, Morgado M, Plácido AI, Roque F, Duarte AP (2018) Arbutus unedo L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *J Ethnopharmacol* 225: 90-102
156. **Mousavi S**, Imani S, Haghghi S, Mousavi S, Karimi A (2012) Effect of Iranian Honey bee (*Apis mellifera*) Venom on Blood Glucose and Insulin in Diabetic Rats. *J Arthropod Borne Dis* 6(2): 136-143
157. **Mumtaz S**, Ali S, Khan R, Andleeb S, Ulhaq M, Khan MA, Shakir HA (2019) The protective role of ascorbic acid in the hepatotoxicity of cadmium and mercury in rabbits. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(14):14087-14096
158. **Nair S**, Meddah B, Aoues A (2013) Melissopalynological characterization of north Algerian honeys. *Foods* 2(1): 83-89
159. **Nath KA**, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D (1996) Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int* 50(3): 1032-1043
160. **Negri G**, Teixeira EW, Alves, MLTMF, Moreti ACCC, Otsuk IP, Borguini RG, Salatino A (2011) Hydroxycinnamic acid amide derivatives, phenolic compounds and antioxidant activities of extracts of pollen samples from Southeast Brazil. *J Agr Food Chem* 59(10): 5516-5522
161. **Newland M**, Paletz E, Reed M (2008) Methylmercury and nutrition: adult effects of fetal exposure in experimental models. *Neurotoxicology* 29(5):783-801
162. **Nielsen JB**, **Andersen O** (1990) Disposition and retention of mercuric chloride in mice after oral and parenteral administration. *J Toxicol Environ Health* 30(3): 167-180
163. **Obead Abd-Allh S** (2014) Precautionary Effect of Ginkgo biloba Against Mercury-Induced Acute Nephro-Hepatotoxicity in male Rats. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences/* 9(22): 2390-2405
164. **Ognjanović BI**, Marković SD, Ethordević NZ, Trbojević IS, Stajn AS, Saicić ZS (2010) Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q (10) and vitamin E. *Reprod Toxicol* 29(2):191-197
165. **Oliveira C**, Joshee L, Bridges CC (2018) MRP2 and the Transport Kinetics of Cysteine Conjugates of Inorganic Mercury. *Biol Trace Elem Res* 184(1): 279-286
166. **Ollero M**, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JJG (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16(9): 1912-1921
167. **ONU** (2018) Global Mercury Assessment. UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland.
168. **Orisakwe OE**, Afonne OJ, Nwobodo E, Asomugha L, Dioka CE (2001) Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95(1): 92-96
169. **Orr SE**, George HS, Barnes MC, Mathis TN, Joshee L, Barkin J, Kiefer AM, Seney CS, Bridges CC (2019) Co-administration of Selenium with Inorganic Mercury Alters the Disposition of Mercuric Ions in Rats. *Biol Trace Elem Res* 195(1):187-195
170. **Oszmianski J**, **Lee CY** (1990) Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J Agric Food Chem* 38:1892-1895
171. **Othman MS**, Safwat G, Aboulkhair M, Abdel Moneim AE (2014) The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem Toxicol* 69: 175-181

172. **Ozturk A**, Ballad AK, Mogulkoc IT, Ozturk B (2003) The Effect of Prophylactic Melatonin Administration on Reperfusion Damage in Experimental Testis Ischemia Reperfusion. *Neuro Endocrinol Lett*, 24 (3-4): 170-172
173. **Peixoto NC, Pereira ME** (2007) Effectiveness of ZnCl<sub>2</sub> in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl<sub>2</sub> in newborn rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 66(3): 441-446
174. **Peixoto NC, Rocha LC, Moraes DP, Bebianno MJ, Dressler VL, Flores EMM, Pereira ME** (2008) Changes in levels of essential elements in suckling rats exposed to zinc and mercury. *Chemosphere* 72(9): 1327-1332
175. **Peixoto NC, Serafim MA, Flores EMM, Bebianno MJ, Pereira ME** (2007) Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. *Life Sci* 81(16): 1264-1271
176. **Perottoni J, Rodrigues OED, Paixão MW, Zeni G, Lobato LP, Braga AL, Rocha JBT, Emanuelli T** (2004) Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol* 42(1):17-28
177. **Petrus K, Schwartz H, Sontag G** (2011) Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400: 2555-2563
178. **Rao MV, Gangadharan B** (2008) Antioxidative potential of melatonin against mercury induce intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol In Vitro* 22(4): 935-942
179. **Rao MV, Sharma PSN** (2001) Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reprod Toxicol* 15(6):705-712
180. **Ravichandiran V, Nirmala S, Ahamed KFH N** (2012) Protective effect of tannins from *Ficus racemosa* in hypercholesterolemia and diabetes induced vascular tissue damage in rats. *Asian Pac J Trop Med* 5(5):367-373
181. **Ravichandra VD, Ramesh C, Sridhar KA** (2013) Hepatoprotective potentials of aqueous extract of *Convolvulus pluricaulis* against thioacetamide induced liver damage in rats. *Biomed Aging Pathol* 3(3):131-135
182. **Reus IS, Bando I, Andrés D, Cascales M** (2003) Relationship Between Expression of HSP70 and Metallothionein and Oxidative Stress During Mercury Chloride Induced Acute Liver Injury in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 17(3):161-168
183. **Rizzetti DA, Martinez CS, Escobar AG, da Silva TM, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Castro MM, Wiggers GA** (2017) Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food Chem Toxicol* 100: 253-264
184. **Rosa A, Tuberoso CIG, Atzeri A, Melis MP, Bifulco E, Dessí MA** (2011) Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chem* 129(3): 1045-1053
185. **Rozgaj R, Kašuba V, Blanuša M** (2005) Mercury chloride genotoxicity in rats following oral exposure, evaluated by comet assay and micronucleus test. *Arh Hig Rada Toksikol* 56: 9-15
186. **Sakamoto M, Man Chan H, Domingo JL, Kubota M, Murata K** (2012) Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. *Ecotoxicol Environ Saf* 84:179-184
187. **Samat S, Enchang FK, Hussein FN, Ismail WIW** (2017) Four-Week Consumption of Malaysian Honey Reduces Excess Weight Gain and Improves Obesity-Related Parameters in High Fat Diet Induced Obese Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* Volume 2017, Article ID 1342150
188. **Sasakura C, Suzuki KT**. (1998) Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J Inorg Biochem* 71(3-4): 159-162

189. **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(6):1732-1735
190. **Schwaab** V, Baud E, Ghyselinck N, Mattei MG, Dufaure JP, Drevet JR (1995) Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene* 167(1-2): 25-31
191. **Shahrour** A, Zowail M, Sharafeldin KM (2016) The protective role of honey against cytotoxicity of cadmium chloride in mice. *Afr J Biotechnol* 15(46): 2620-2626
192. **Sharma** DN, **Bhattacharya** L (2010) Role of some antioxidants on mercury chloride induced spermatogenesis in swiss albino mice during pre pubertal phase of life. *Indian J Sci Res* 1(2) : 19-25
193. **Sheehan** MC, Burke TA, Navas-Acien A, Breysse PN, McGready J, Fox, M A (2014) Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review. *Bull World Health Organ* 92(4): 254-269
194. **Sheikh** TJ, Patel BJ, Joshi DV (2011) Effect of mercuric chloride on oxidative stress and target organ pathology in wistar rat. *J Appl Pharm Sci* 01 (07): 59-61
195. **Sheikh** TJ, Patel BJ, Joshi DV, Patel RB, Jegoda MD (2013) Repeated dose oral toxicity of inorganic mercury in wistar rats: biochemical and morphological alterations. *Vet World* 6(8): 563-567
196. **Shi** JZ, Kang F, Wu Q, Lu YF, Liu J, Kang YJ (2011) Nephrotoxicity of mercuric chloride, methylmercury and cinnabar-containing Zhu-Sha-An- Shen-Wan in rats. *Toxicol Lett* 200(3): 194-200
197. **Siti Balkis** B, Fatin Farhana J, Siti Nur Farahana MNA, Nur Liyana MY, Izatus Shima T, Jamaludin M (2017) Kelulut honey supplementation prevents sperm and testicular oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* 79(3): 89-95
198. **Spano** N, Casula L, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Scanu R, Tapparò A, Sanna G (2006) An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey, The case of strawberry tree honey. *Talanta* 68(4): 1390-1395
199. **Sridhar** MP, Nandakumar N, Rengarajan T, Balasubramanian MP (2013) Amelioration of mercuric chloride induced oxidative stress by *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine via modulating the oxidant – antioxidant imbalance in rat liver. *J Biochem Tech* 4(3): 622-627
200. **Stacchiotti** A, Volti GL, Lavazza A, Rezzani R, Rodella LF (2009) Schisandrin B stimulates a cytoprotective response in rat liver exposed to mercuric chloride. *Food Chem Toxicol* 47(11):2834-2840
201. **Stacchiotti** A, Lavazza A, Rezzani R, Borsani E, Rodella L, Bianchi R (2004) Mercuric chloride-induced alterations in stress protein distribution in rat kidney. *Histol Histopathol* 19(4): 1209-1218
202. **Sulusoglu** M, Cavusoglu A, Erkal S (2011) *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) selection in Turkey Samanlı mountain locations. *J Med Plants Res* 5(15): 3545-3551
203. **Syazana** NS, Hashida NH, Majid AM, Duriyyah Sharifah HA, Kamarudin MY (2011) Effects of Gelam Honey on Sperm Quality and Testis of Rat. *Sains Malays* 40(11): 1243-1246
204. **Syversen** T, **Kaur** P (2012) The toxicology of mercury and its compounds. *J Trace Elem Med Biol* 26(4): 215-226
205. **Takrouni** MM, **Boussaid** M (2010) Genetic diversity and population's structure in Tunisian strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *Sci Hort* 126(3): 330-337

206. **Tanvir** EM, Afroz R, Alamgir Zaman Chowdhury M, Khalil MI, Hossain MS, Rahman MA, Rashid MH, Gan SH (2015) Honey has a protective effect against chlorpyrifos-induced toxicity on lipid peroxidation, diagnostic markers and hepatic histo architecture. *Eur J Integr Med* 7(5): 525-533
207. **Tavilani** H, Goodarzi MT, Doosti M, Vaisi-Raygani A, Hassanzadeh T, Salimi S, Joshaghani HR (2008) Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 16(5): 649-656
208. **Teixeira** FB, Fernandes RM, Farias-Junior PMA, Costa NMM, Fernandes LMP, Santana LNS, Silva-Junior AF, Silva MCF, Maia CSF, Lima RR (2014) Evaluation of the Effects of Chronic Intoxication with Inorganic Mercury on Memory and Motor Control in Rats. *Int J Environ Res Public Health* 11(9): 9171-9185
209. **Tonks** AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A (2003) Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* 21(5):242-247
210. **Tonks** AJ, Dudley E, Porter NG, Parton J, Brazier J, Smith EL (2007) A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *J Leukoc Biol* 82(5):1147-1155
211. **Toufektsian** M, Boucher F, Pucheu S, Tanguy S, Ribuot C, Sanou D, Tresallet N, de Leiris J (2000) Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. *Toxicology* 148(2-3):125-132
212. **Trebucovich** MS, Hazelhoff MH, Chevalier AA, Passamonti S, Brandoni A, Torres AM (2014) Protein expression of kidney and liver bilitranslocase in rats exposed to mercuric chloride- A potential tissular biomarker of toxicity. *Toxicol Lett* 225(2):305-310
213. **Tuberoso** CIG, Bifulco E, Caboni P, Cottiglia F, Cabras P, Floris I (2010) Floral Markers of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey. *J Agric Food Chem* 58: 384-389
214. **Tuberoso** CIG, Boban M, Bifulco E, Budimir D, Pirisi FM (2013) Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem* 140(4): 686-691
215. **Ulloa** PA, Maia M, Brigas AF (2015) Physicochemical parameters and bioactive compounds of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J Chem Vol.* 2015, Article ID 602792, 10 pages
216. **Uma** C, Poornima K, Surya S, Ravikumar G, Gopalakrishnan VK (2012) Nephroprotective Effect of Ethanolic Extract of *Tabernaemontana Coronaria* in Mercuric Chloride Induced Renal Damage in Wistar Albino Rats. *Int J Chem Eng Appl* 3(4):269-273
217. **Urios**, A., López-Gresa MP, González MC, Primo J, Martínez A, Herrera G, Escudero JC, O'Connor J-E, Blanco M (2003) Nitric oxide promotes strong cytotoxicity of phenolic compounds against *Escherichia coli*: The influence of antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(11): 1373-1381
218. **USEPA** (2006) Integrated risk information system data base for methylmercury.
219. **Uzunhisarcikli** M, Aslanturk A, Kalender S, Apaydin FG, Bas H (2016) Mercuric chloride induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: the protective effects of sodium selenite and vitamin E. *Toxicol Ind Health* 32 (9): 1651-1662
220. **Uzunhisarcikli** M, **Kalender** Y (2011) Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74(7): 2112-2118
221. **Valko** M, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12(10):1161-1208
222. **Vernet** P, Aitken RJ, Drevet JR (2004) Antioxidant Strategies in the Epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol* 216(1-2): 31-39

223. **Vijayaprakash S**, Langeswaran K, Kumar SG, Revathy R, Balasubramanian MP (2013) Nephro-protective significance of kaempferol on mercuric chloride induced toxicity in wistar albino rats. *Biomed Aging Pathol* 3(3):119-124
224. **Wadaan MAM** (2009) Effects of mercury exposure on blood chemistry and liver histopathology of male rats. *J Pharmacol Toxicol* 4: 126-131
225. **Wang ZJ, Luo DH** (2007) Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Carbohydr Polym* 68(1): 54-58
226. **Warren S, Patel S, Kapron CM** (2000) The effect of vitamin E exposure on cadmium toxicity in mouse embryo cells in vitro. *Toxicology* 142(2):119-126
227. **WHO** (World Health Organisation) (2003) Elemental Mercury and Inorganic Mercury Compounds: Human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document. CICAD 50. WHO, Geneva.
228. **WHO** (1991) Inorganic Mercury, Environmental Health Criteria, vol. 118. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
229. **Xu X, Gao Y** (2013) Isolation and characterization of proteins and lipids from honeybee (*Apis mellifera* L.) queen larvae and royal jelly. *Food Res Int* 54(1): 330-337
230. **Yadav HN, Sharma US, Singh S, Gupta YK** (2019) Effect of combination of *Tribulus terrestris*, *Boerhavia diffusa* and *Terminalia chebula* reverses mercuric chloride-induced nephrotoxicity and renal accumulation of mercury in rat. *Orient Pharm Exp Med* 19:497-507
231. **Yang L, Zhang Y, Wang F, Luo Z, Guo S, Strähle U** (2020) Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere* 245:125586
232. **Yao LK, Razak SLA, Ismail N, Fai NC, Asgar MHAM, Sharif NM, Aan GJ, Jubri Z** (2011) Malaysian gelam honey reduces oxidative damage and modulates antioxidant enzyme activities in young and middle aged rats *Med J Plants Res* 5(23): 5618-5625
233. **Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU** (2012) Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, Well-Being and Health*: 23-48
234. **Young IS, Woodside IV** (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54(3):176-186
235. **Yousef MI, Salama AF** (2009) Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem Toxicol* 47(6):1168-1175
236. **Zalups R, Barfuss D, Lash L** (1999) Disposition of inorganic mercury following biliary obstruction and chemically-induced glutathione depletion: Disposition changes 1h after the intravenous administration of mercury chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 135-144
237. **Zalups RK** (2000) Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 52(1):113-143
238. **Zalups RK, Lash LH** (2006) Cystine alters the renal and hepatic disposition of inorganic mercury and plasma thiol status. *Toxicol Appl Pharmacol* 214(1): 88-97
239. **Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP** (2000) Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat* 62(1): 35-49
240. **Zhang H, Tan X, Yang D, Lu J, Liu B, Baiyun R, Zhang Z** (2017) Dietary luteolin attenuates chronic liver injury induced by mercuric chloride via the Nrf2/Nf-κB/ P53 signaling pathway in rats. *Oncotarget* 8 (25): 40982-40993
241. **Zhao H, Cheng N, He L, Peng G, Liu Q, Ma T, Cao W** (2018) Hepatoprotective Effects of the Honey of *Apis cerana Fabricius* on Bromobenzene-Induced Liver Damage in Mice. *J Food Sci* 83(2):509-516

242. **Zhao** H, Cheng N, He L, Peng G, Xue X, Wu L, Cao W (2017) Antioxidant and hepatoprotective effects of A. cerana honey against acute alcohol-induced liver damage in mice. *Food Res Int* 101: 35-44

## |Chapitre II :

### Le Miel

يقول الله تبارك وتعالى: (وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ  
\* ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًّا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ  
لِّلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ) (سورة النحل آية 68 - 69)

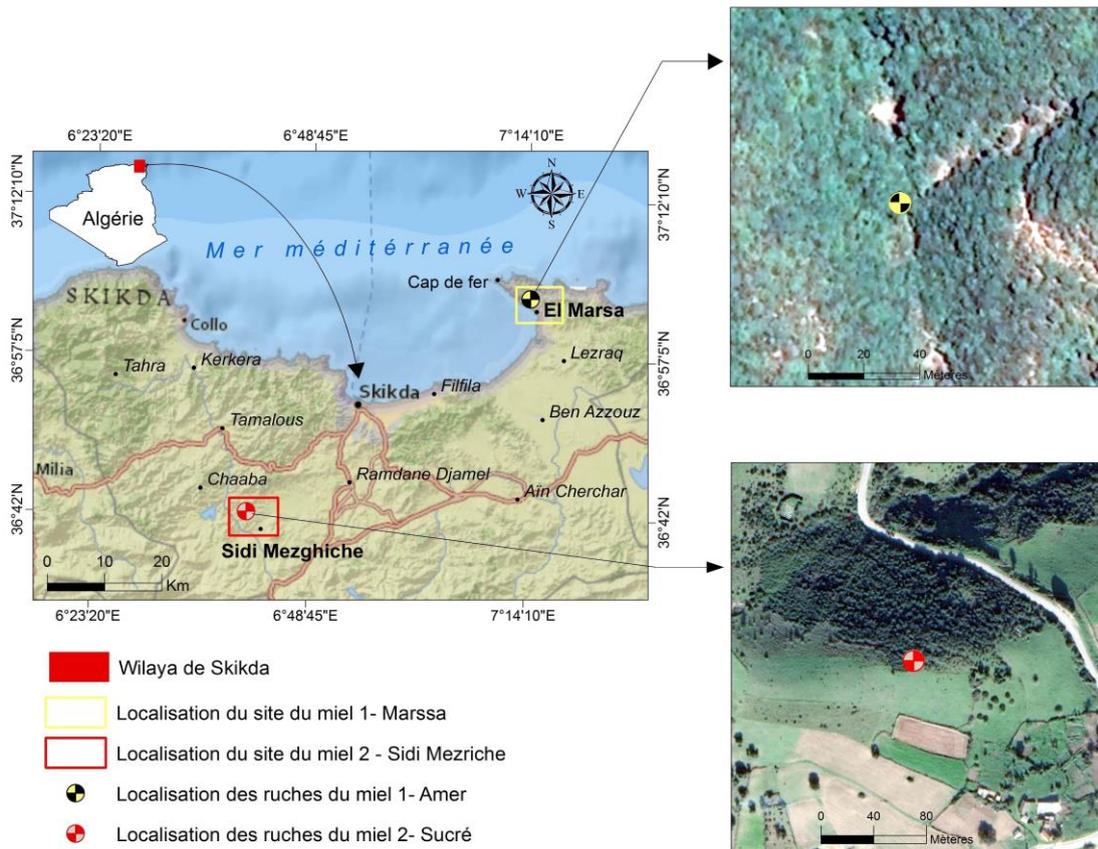
# **Partie 1 : Matériels et Méthodes**

### I- Collections d'échantillons :

Les deux types de miel ont été obtenus à partir de deux sites non pollués situés dans la province de Skikda, le Nord-Est de l'Algérie chez des apiculteurs qui ont une expérience traditionnelle. Le miel unifloral (amer) a été obtenu en janvier de la forêt du Cap de Fer à El Marsa (coordonnées géographiques : Latitude : 37.0299, Longitude : 7.25317 ; 37°1'48" Nord, 7°15'11" Est), lorsque le nectar est dominé dans les fleurs d'arbousier (*Arbutus unedo*) en novembre-décembre. Le miel polyfloral (sucré) mûr a été récolté en juillet dans la campagne de Bourzem, daïra de Sidi Mezghiche (coordonnées géographiques : Latitude : 36.6833, Longitude : 6.71667 ; 36°40'60" Nord, 6°43'0" Est), ayant une grande biodiversité de plantes fleuries et éloigné de tout type de pollution. Les miels mûrs étaient extraits par la méthode dans laquelle le miel était retiré des cadres par forces centrifuges, filtrées, placées dans des récipients en verre, et ensuite stocké dans un endroit sombre à température ambiante.



**Fig 2** : Le miel sucré (1) et amer (2).



**Fig 3 :** Carte situationnelle et la distribution de la végétation aux alentours des ruches des deux types de miels.

**Tableau 3 :** La végétation dans les deux régions de Skikda (**Botaniste : Hamel T.**)

| Sidi Mezghiche                             | El Marsa (cap de fer)                       |
|--|---|
| ✓ Anthyllis vulneraria L.                  | ✓ Ampelodesmosmauritanicus (Poiret) Durand  |
| ✓ Bartsia trixago L.                       | ✓ <b>Arbutus unedo L.</b>                   |
| ✓ Bellisannua subsp. annua L.              | ✓ Arisarum vulgareTarg-Toz. subsp. vulgare  |
| ✓ Centaurea napifolia L.                   | ✓ Arum italicum subsp. italicum Miller      |
| ✓ Convolvulus arvensis subsp. arvensis L.  | ✓ Asparagus acutifolius L.                  |
| ✓ Convolvulus tricolor L. subsp. tricolor  | ✓ Asphodelus ramosus subsp. ramosus L       |
| ✓ Drimia numidica (Jord. &Fourr.) J.C      | ✓ Asteriscus maritimus (L.)                 |
| ✓ Galactites elegans (All.) Soldano        | ✓ Avena sterilis L.                         |
| ✓ Glebiobis segetum (L.) Fourr.            | ✓ Bellis annua subsp. annua L.              |
| ✓ Hedysarum coronarium L                   | ✓ Bellis sylvestrisCirillo                  |
| ✓ Medicago murex Willd.                    | ✓ Bombycilaena discolor (Pers.) Laínz       |
| ✓ Oxalis pes-caprae L.                     | ✓ Borago officinalis L.                     |
| ✓ Plantago serraria L.                     | ✓ Brachypodium sylvaticum (Hudson) Beauv    |
| ✓ Poa annua subsp. annua L.                | ✓ Brassica procumbens (Poiret) O. E. Schulz |
| ✓ Scolymus hispanicus L.                   | ✓ Briza maxima L.                           |
| ✓ Senecio vulgaris L.                      | ✓ Briza minor L.                            |
| ✓ Trifolium campestre Schreber             |   |
| ✓ Trifolium repens L                       |   |
| ✓ Urospermum dalechampii (L.) F.W. Schmidt |   |

|  |   |
|--|---|
|  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Bromus hordeaceus L. subsp. hordeaceu</li> <li>✓ Calicotome villosa subsp. villosa Poirer Link</li> <li>✓ Centaurea calcitrapa L.</li> <li>✓ Centaurea napifolia L.</li> <li>✓ Corrigiola littoralis subsp. littoralis L.</li> <li>✓ Cynodon dactylon (L.) Pers.</li> <li>✓ <b>Dittrichia viscosa</b> (L.) Greuter</li> <li>✓ Drimia numidica (Jord. &amp;Fourr.) J.C.</li> <li>✓ Erica arborea L.</li> <li>✓ Genista ferox subsp. ferox (Poirer) Dum. Cour.</li> <li>✓ Genista numidica Spach subsp. numidica (Spach.) Batt.</li> <li>✓ Hypochaeris achyrophorus L.</li> <li>✓ Leontodon tuberosus L.</li> <li>✓ Lotus edulis L.</li> <li>✓ Lythrum junceum Banks &amp;Solander</li> <li>✓ Moraea sisyrinchium (L.) Ker Gawl.</li> <li>✓ Myrtus communis L.</li> <li>✓ Olea europaea L.</li> <li>✓ Oncostema peruviana (L.) Speta</li> <li>✓ Oxalis pes-caprae L.</li> <li>✓ Phillyrea latifolia L.</li> <li>✓ Pistacia lentiscus L.</li> <li>✓ Poaannua subsp. annua L.</li> <li>✓ Raphanus raphanistrum subsp. raphanistrum L.</li> <li>✓ Sanguisorba verrucosa (G. Don) Ces.</li> <li>✓ Scolymus hispanicus L.</li> <li>✓ Sherardia arvensis L.</li> <li>✓ Tetragonolobus biflorus (Desr.) DC.</li> <li>✓ Trifolium campestre Schreber</li> <li>✓ Verbascum sinuatum L.</li> <li>✓ Veronica cymbalaria Bodard</li> </ul> |
|--|---|

## II- Le miel d'*Arbutus unedo* L. :

### ○ Description :

La plante *Arbutus unedo* L. (famille des Éricacées), communément appelé fraisier, est un petit arbre ou un arbuste à feuilles persistantes, avec des fleurs actinomorphes, un ovaire supérieur et le fruit étant une capsule, une baie ou une drupe, mesurant normalement entre 1,5 et 3 m de haut originaire de la région méditerranéenne, mais que l'on trouve également dans d'autres régions caractérisées par des étés chauds et des hivers doux et pluvieux. Il pousse à des altitudes allant de 400 à 1200 m sur des sols secs siliceux ou décartonnés et peut également pousser sur des sols alcalins et relativement acides (**Takrouni & Boussaid, 2010**).



Fig 4 : Différents constituants de l'arbre *Arbutus unedo* : branche d'arbre, fleurs, fruit mûr et non mûr.

Tableau 4 : Description du miel d'*Arbutus unedo* L. (Miel Amer).

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Nom vernaculaire</b>  | Boujbiba ou lanj                        |
| <b>Nom français</b>      | Arbousier- Arbre aux fraises            |
| <b>Nom Anglais</b>       | Strawberrytrees                         |
| <b>Nom Latin</b>         | <i>Arbutus unedo</i>                    |
| <b>Famille</b>           | Ericacées                               |
| <b>Constituants</b>      | Tanins- Arbutine- Composées phénoliques |
| <b>Parties utilisées</b> | Les feuilles- les racines- les fruits   |

### ○ **Caractéristiques organoleptique/ sensorielle :**

D'après **Oddo et al., 1995**, les caractéristiques organoleptiques du miel d'arbutus italien sont :

**Etat Physique :** cristallisation souvent irrégulière.

**Couleur :** brun clair à brun avec des teintes grisâtres.

**Odeur et saveur :** moyennement fort, nettement amer, piquant, astringent, persistant.

### **III- Méthodes d'analyse :**

#### **1- Composition physico-chimique :**

##### **1-1- pH :**

Le pH ou « potentiel hydrogène » c'est la mesure du coefficient caractérisant l'acidité ou la basicité d'un milieu, il représente la concentration des ions  $H^+$  d'une solution.

##### **• Mesure :**

Le pH d'un miel est mesuré en solution dans l'eau à 10% à l'aide d'un pH-mètre.

##### **• Normes et interprétation :**

La plupart des miels ont un pH relativement bas (acide) :  $pH = 3.5 - 5.5$ . Les miels dont le pH est situé entre 3.5 et 4.5 sont issus de nectar ou en léger mélange aux miellats, alors que les valeurs situées entre 4.5 et 5.5 indiquent qu'il s'agit d'un miel de miellat. En outre un miel à un pH faible de l'ordre de 3.5 est considéré comme un produit fragile pour la conservation, duquel de grandes précautions doivent être prises. Le miel est un tampon, ce qui veut dire que son pH ne change pas par l'addition de petites quantités d'acides et de bases. Le pouvoir tampon est dû à la teneur en phosphates, des carbonates et autres sels minéraux.

##### **1-2- Humidité ou teneur en eau :**

##### **• Principe:**

Basée sur la mesure optique de l'indice de réfraction (IR) au moyen d'un réfractomètre.

Lorsque la lumière traverse un milieu donné, elle est déviée. Le type de milieu ainsi que la concentration de ce milieu vont influencer l'angle de déviation.

##### **• Mode opératoire :**

Préparation de l'échantillon:

On introduit quelques grammes de miel homogénéisé dans un flacon, on l'obture et on le place dans l'étuve pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre. On homogénéise par agitation et on laisse refroidir.

Mesure de l'indice de réfraction:

A l'aide d'une baguette en verre, on dépose rapidement une goutte de miel sur le prisme du réfractomètre, on fait la lecture de l'indice de réfractomètre et on note la température du prisme.

### • Expression des résultats :

À partir de la table de CHATAWAY, on obtient le pourcentage d'eau correspondant à l'indice de réfraction à 20°C.

Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20°C :

- Température supérieure à 20°C : additionner 0.00023 par °C
- Température inférieure 20°C : soustraire 0.00023 par °C.

**Tableau 5 : Table de CHATAWAY.**

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

### • Normes et interprétation :

L'IR varie proportionnellement avec la température et la teneur en eau (de 1,5041 à 1,4915 pour une teneur en eau de 13 à 18 %, donc pour la plupart des miels, et atteint 1,4789 pour les miels de callune avec 23 % d'eau).

Les limites normales de l'humidité pour un miel sont généralement comprises entre 1.45 et 23.5% avec une moyenne de 15%.

Tant le **Codex Alimentarius** que la norme de l'Union Européen prescrit actuellement une teneur en eau maximale de 21%.

L'humidité du miel est le critère de qualité qui détermine la capacité de miel à rester stable et à résister à la détérioration par fermentation par la levure : plus l'humidité est élevée, plus la probabilité que le miel va fermenter lors du stockage est grande :

- Valeur en eau: 16-19 %: meilleur conservation et stockage.
- Teneur > 19 %: miel renfermant une grande quantité d'eau (fermente plus facilement).

Remarque : **Indice de Brix**

- Permet d'évaluer le taux de matière sèche du produit à analyser.
- La lecture est faite sur l'échelle qui se trouve en parallèle avec l'échelle d'IR.

### 1-3- Matière sèche totale :

La matière sèche du miel a été calculée sous forme de total des solides solubles (TSS) et total des solides (TS). Les mesures ont été mesurées par un Réfractomètre Exacta et Optech Lab center Abbe (modèle RMT) et les résultats ont été exprimée en **degrés Brix**. Toutes les mesures ont été effectuées à la température ambiante et les relevés ont été corrigés pour une température standard de 20°C en ajoutant la correction facteur de 0,00023/C (Rosa et al., 2011). Le total soluble (TS) de l'échantillon de miel a été calculé en pourcentage à partir des résultats de l'humidité en utilisant la formule suivante :

$TS (\%) = 100 - \text{humidité (Saxena et al., 2010)}$ .

### 1-4- Densité ou poids spécifique :

#### • Principe :

Il consiste à peser à l'aide d'une éprouvette de volume connu, un volume de miel par rapport à la masse du même volume en eau distillée et à la même température 20°C.

• **Matériels et produits** : Eprouvettes (2), Thermomètre, Balance analytique, Eau distillée.

• **Mode opératoire** : La prise d'essai est de 5ml de miel, de même pour l'eau distillée dont on fait les pesées.

• **Résultats** : La densité  $d$  du miel est donnée par la formule suivante :

$$d = m/m'$$

Où :

-  $m$  : masse de volume du miel à 20°C

-  $m'$  : masse du même volume en eau à 20°C.

#### • Interprétation des résultats :

La densité d'un miel normal varie de 1.39 à 1.44 à 20°C. La mesure de la densité du miel est un moyen de connaître sa teneur en eau donc la fluidité du miel. La densité élevée est due à : La présence d'impureté ou à une teneur en sucre inverti très grande. La densité inférieure aux normes est due à la présence d'une teneur en eau trop élevée.

### 1-5- Acidité :

#### • Origine:

L'acidité est due à la présence faible (0.15 à 0.25%) d'acides organiques divers principalement l'acide gluconique (3/4 de l'acidité totale, formé à partir du glucose), acide formique (10% de l'acidité totale) et des traces d'acide oxalique, succinique...

Le miel est acide, ce qui l'on a du mal à imaginer, car à la dégustation, la saveur acide est masquée par la teneur en sucre. Cette particularité explique, en partie, sa résistance vis-à-vis les microorganismes.

• **Principe :**

L'échantillon est dissous dans de l'eau, le pH est mesuré, et la solution est titrée avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,05 N ; jusqu'à un pH de 8,30. Pour l'appréciation du point finale, on peut utiliser la phénolphtaléine comme indicateur coloré ou même utiliser un pH-mètre. L'acidité due aux lactones est obtenue en ajoutant un excès d'hydroxyde de sodium à la solution de miel et en déterminant cet excès par un titrage en retour par l'acide sulfurique.

• **Réactifs et appareil :**

- Eau distillée exempte de CO<sub>2</sub> ; Solution d'hydroxyde de sodium 0,05N ; Solution de phénolphtaléine : dissoudre 0,5 g phénolphtaléine dans 100 ml d'éthanol 50 % (V/V).  
- pH-mètre.

• **Mode opératoire :**

- Dissoudre 10 grammes d'échantillon dans 75 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone dans un bécher de 250 ml. - Agiter. - Titrer avec la soude (NaOH) 0,05 N, en présence de 4 à 6 gouttes de phénolphtaléine jusqu'à apparition d'une coloration rose persistante pendant 10 secondes. - Effectuer un essai à blanc avec de l'eau distillée et corriger le volume de soude utilisé dans le dosage.

• **Calcul et expression des résultats :**

L'acidité libre est exprimée en milliéquivalents de NaOH nécessaire pour porter à pH équivalent par 1000g de miel :

$$\begin{array}{rcl}
 1\text{L de NaOH } 1\text{N} & \longrightarrow & 1\text{eq} \\
 \text{V ml de NaOH } 0.05\text{N} & \longrightarrow & n \times 0.05 \text{ meq} \\
 \text{V } 0.05 \text{ meq PE} & \longrightarrow & = 10\text{g} \\
 \text{Ac. libre} & \longrightarrow & 1000\text{g}
 \end{array}$$

$$\text{Ac. libre} = (1000 \cdot \text{V} \cdot \text{N}) / \text{PE}$$

Où :

- **PE** : prise d'essai de miel = 10g

- **V** : volume en millilitres de NaOH versés pour atteindre le pH du point équivalent E lors de la neutralisation du miel.

L'acidité due aux lactones ou l'acidité combinée est exprimée en milliéquivalent de NaOH pour 1000g de miel :

Normalité de NaOH = normalité de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

$$\begin{array}{rcl}
 1\text{L de NaOH } 1\text{N} & \longrightarrow & 1\text{eq} \\
 (10 - n') \text{ ml de NaOH } 0.05\text{N} & \longrightarrow & (10 - n') \times 0.05 \text{ meq} \\
 (10 - n') 0.05\text{meqPE} & \longrightarrow & = 10\text{g} \\
 \text{Ac. Lactonique} & \longrightarrow & 1000\text{g} \\
 \text{A. combinée} & = & 1000 (10 - n') \text{ N} / \text{PE}
 \end{array}$$

$n'$ : le volume en millilitres de  $H_2SO_4$  pour atteindre le pH du point équivalent lors du dosage en retour.

L'acidité totale est exprimée en milliéquivalents de NaOH correspondant à la somme des deux acidités de 1000g de miel :

$$A. \text{ Totale} = A. \text{ libre} + A. \text{ combinée}$$

### • Normes et interprétations :

La concentration en acides libres maximum acceptable est de 50 méq/kg de miel. (La teneur limite en acide libre des miels destinés à l'industrie est 80 méq. d'acide/kg). Une augmentation de cette valeur est susceptible de traduire :

- une fermentation du miel. Ce phénomène peut se produire notamment sur des miels récoltés « humides » soit trop tôt car non operculés, soit extraits dans de mauvaises conditions.
- un apport de sucre interverti car en cas de nourrissement, l'acidité du miel augmente rapidement.

### 1-6- Dosage des sucres réducteurs :

#### Méthode de LUFF SCHOORL

##### • Principe :

La solution éventuellement déféquée et dans laquelle se trouvent les sucres réducteurs est portée à ébullition dans des conditions normalisées, en présence d'une solution de cuivre (II). Cette dernière solution est partiellement réduite en cuivre (I). L'excès de cuivre (II) est dosé par iodométrie.

##### • Réactifs :

Solution de Carrez I, Solution de Carrez II, Réactif selon LUFF-SCHOORL, Solution d'amidon, d'acide chlorhydrique (pour la préparation des solutions voir annexe).

##### • Mode opératoire :

###### ☐ Mise en solution des sucres et défécation:

- Peser 10 g de miel, les dissoudre dans 100 ml d'eau distillée. - Introduire cette solution dans une fiole jaugée de 250 ml. - Ajouter à la pipette 25 ml de solution Carrez-I et agiter pendant une minute. - Ajouter ensuite 25 ml de solution de Carrez-II et agiter à nouveau pendant une minute. - Compléter au trait de jauge, mélanger et filtrer sur filtre plissé sec.

###### ☐ Inversion:

- Prélever exactement 10 ml de la solution déféquée et les introduire dans une fiole jaugée de 200 ml y ajouter 40 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré et trois gouttes de méthylorange. - Agiter et plonger la fiole dans un bain-marie ; chauffer progressivement de telle manière que la température de la solution de miel atteigne 70° en douze minutes. - La température est contrôlée pendant toute l'opération à l'aide d'un thermomètre. - Laisser refroidir jusqu'à 20°C et neutraliser par l'hydroxyde de sodium jusqu'au virage de l'indicateur. - Compléter à 200 ml avec de l'eau distillée.

###### ☐ Dosage:

- Dosage avant inversion (sucres réducteurs) :

- Diluer au vingtième (1/20) la solution obtenue et effectuer le dosage sur cette solution diluée.
- Dans une fiole conique de 300 ml placer 25 ml de réactif de LUFF-SCHOORL et 25 ml de la solution diluée. (Ce volume de liqueur sucrée ne doit pas contenir plus de 60 mg de sucres réducteurs).
- Ajouter quelques grains de pierres ponce.
- Adapter à la fiole un réfrigérant ascendant.
- Porter le liquide à ébullition en deux minutes et maintenir cette ébullition pendant 10 min exactement.
- Refroidir immédiatement sous courant d'eau froide.
- Après refroidissement complet, ajouter 10 ml de solution d'iodure de potassium, 25 ml d'acide sulfurique 3N (en raison de l'effervescence, ajouter l'acide par petites portions mais aussi rapidement que possible) et 2 ml de solution d'amidon.
- Titrer par la solution de thiosulfate de sodium 0.1N. - Soit n le nombre de ml utilisés. - Par ailleurs, effectuer un dosage témoin avec 25 ml d'eau distillée. Soit n2 le volume de thiosulfate utilisé.
- **Dosage après inversion :**
- Effectuer le même dosage en utilisant 25 ml de la solution obtenue en soit n1 le volume de thiosulfate utilisé.

• **Expression des résultats et calculs :**

La table de **LUFF-SCHOORL** indique le nombre de mg de sucres correspondant à **(n2-n)** et **(n2-n1)** ml de thiosulfate 0.1N pour 25 ml de solution sucrée.

Avec : **n** : avant inversion, **n1** : après inversion, **n2** : témoin.

**Tableau 6:** Table de LUFF-SCHOORL.

| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub><br>0.1 mol/litre | Glucose, fructose invert<br>sugars<br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> |            |
|--|---|------------|
| ml   | mg  | difference |
| 1  | 2.4   | 2.4        |
| 2  | 4.8   | 2.4        |
| 3  | 7.2   | 2.5        |
| 4  | 9.7   | 2.5        |
| 5  | 12.2  | 2.5        |
| 6  | 14.7  | 2.5        |
| 7  | 17.2  | 2.6        |
| 8  | 19.8  | 2.6        |
| 9  | 22.4  | 2.6        |
| 10   | 25.0  | 2.6        |
| 11   | 27.6  | 2.7        |
| 12   | 30.3  | 2.7        |
| 13   | 33.0  | 2.7        |
| 14   | 35.7  | 2.8        |
| 15   | 38.5  | 2.8        |
| 16   | 41.3  | 2.9        |
| 17   | 44.2  | 2.9        |
| 18   | 47.1  | 2.9        |
| 19   | 50.0  | 3.0        |
| 20   | 53.0  | 3.0        |
| 21   | 56.0  | 3.1        |
| 22   | 59.1  | 3.1        |
| 23   | 62.2  |            |

### □ Teneur en sucres réducteurs avant inversion:

Soit S le nombre de mg de sucre interverti correspondant au thiosulfate utilisé (n2-n).

Les sucres réducteurs exprimés en sucre interverti (en grammes % de miel) :

$$S. I. \text{ grammes } \% = S \times 200 \times 250 \times 10025 \times 10 \times 10 \times 1000$$

Soit 2,0 S

### □ Teneur en sucres réducteurs totaux après inversion:

Soit S1 le nombre de mg de sucre interverti correspondant au thiosulfate utilisé (n2-n1).

Les sucres réducteurs totaux exprimés en sucre interverti (en grammes % de miel) :

$$S.I.T. \text{ grammes } p.100 = S1 \times 200 \times 250 \times 100$$

Soit 2,0 S1

### □ Teneur en sucres réducteurs totaux après inversion:

$$S.A. \text{ grammes } \% = (2,0 S1 - 2,0 S) \times 0.95$$

### • Normes et interprétation :

- Teneur apparente en sucres réducteurs, exprimé en sucre inverti :

Miel de nectar : pas moins de 65%. Miel de miellat, seul ou en mélange avec le miel de nectar : pas moins de 60%.

- Teneur en saccharose :

En général : pas plus de 5%. Miel de miellat, seul ou en mélange avec le miel de nectar : pas plus de 10 %.

- La présence d'une grande quantité de saccharose peut dévoiler les tentatives de fraude.

La teneur en sucres réducteurs et saccharose apparent n'a pas de signification pour la détermination de la qualité du miel. Voilà pourquoi cette norme doit être remplacée par une norme concernant les sucres spécifiques.

## 2- Activité antioxydante :

### 2-1- Dosage des polyphénols :

L'estimation des composés phénoliques totaux était réalisée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Le miel a été dilué dans de l'eau distillée (500 mg/ml). Ensuite, 1,5 ml du réactif Folin-Ciocalteu (dilué avec 1 ml du réactif dans 10 ml d'eau distillée) et 1,2 ml du carbonate de sodium ( $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ ) (7,5 %) ont été ajoutés à 0,3 ml du miel dilué. Après incubation dans l'obscurité pendant 1h, l'absorbance a été obtenue à 760 nm. La concentration des composés phénoliques ont été déterminés par référence à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (fig 5) réalisée en parallèle (Seladji et al., 2014). Les résultats ont été exprimés en mg d'Acide gallique par 100 g de miel (mg EAG/100 g).

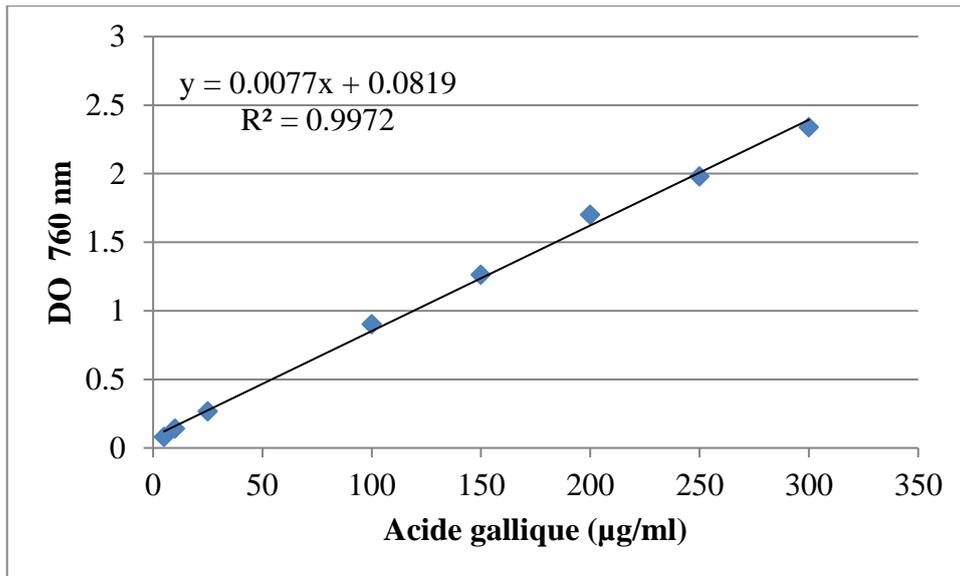


Fig 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

### 2-2- Dosage des flavonoïdes :

La teneur totale en flavonoïdes du miel a été déterminée par une méthode colorimétrique. 1 ml de l'extrait aqueux du miel a été mélangé avec 4 ml d'eau distillée, puis, 0,3 ml de la solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) a été ajoutée. Après 6 minutes, on ajoute 0,3 ml de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) (10%) et on laisse reposer le mélange encore pendant 6 min, puis on ajoute 2 ml de d'hydroxyde de sodium  $\text{NaOH}$  (1N), le totale est ajusté a 10 ml avec de l'eau distillé. On a laissé reposer le mélange pendant 15 minutes, et ensuite, l'absorbance a été mesurée par rapport au blanc à 510 nm (Khodaie et al., 2012). Les résultats ont été exprimés par rapport à la catéchine (EC mg / g de matière sèche).

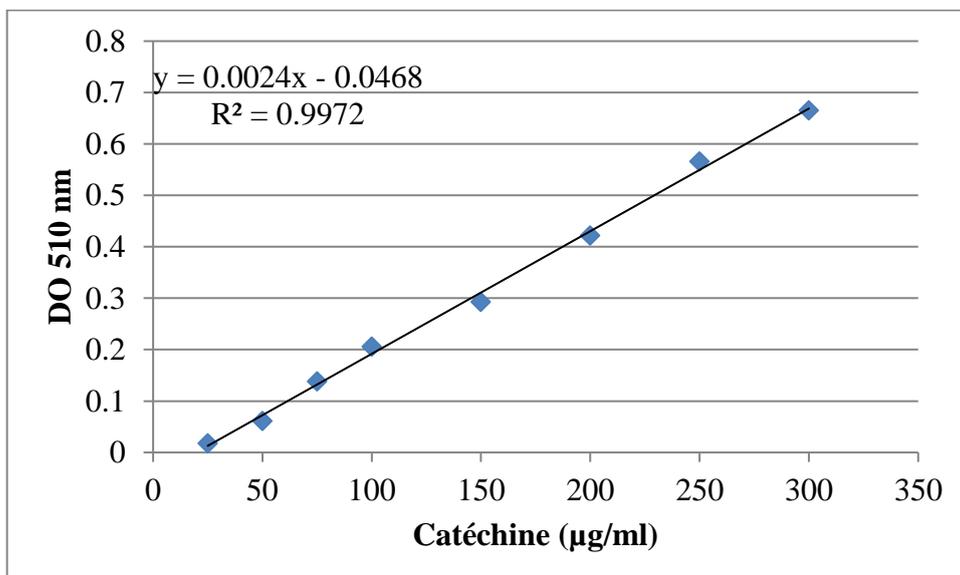


Fig 6 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

### 2-3- Dosage des Tanin Totaux :

Les tanins totaux ont été mesurés par la méthode Folin-Denis (**Polshettiwar et al., 2007**). La colorimétrie des tannins était basée sur la mesure de la couleur bleue formée par la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par les tanins comme composé en milieu alcalin. 1,0 ml d'extrait et une solution étalon de tanin (100-800 µg/ml) ont été portées à 7,5 ml avec l'eau distillée. Ensuite, 0.5 ml de réactif Folin-Denis et 1 ml de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ont été ajoutées. Le volume a été complété jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance a été lue à 700 nm. La teneur totale en tanin a été exprimée en mg d'équivalent acide tannique (EAT)/ g d'extrait (**Padma et al., 2013**).

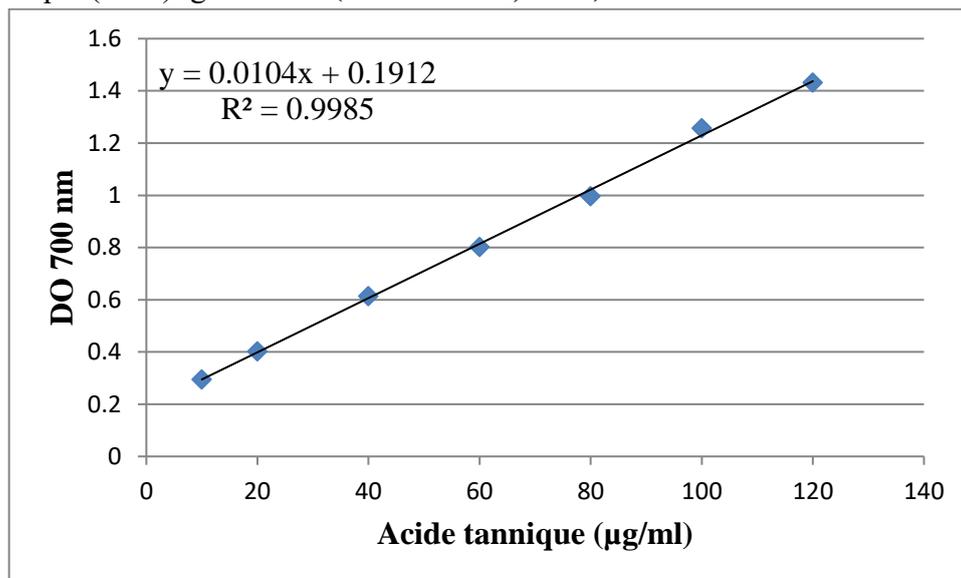


Fig 7 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

### 2-4- Test de la capacité anti-oxydante DPPH :

Les propriétés antioxydantes des échantillons de miel ont été étudiées en évaluant le piégeage des radicaux libres l'activité du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), qui était basé sur la méthode de **Boulilaa et al., (2015)**.

Le radical DPPH était l'un des plus répandus des substrats utilisés pour une évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante grâce à sa stabilité de forme radicalaire et la simplicité de l'analyse (**Bozin et al., 2008**). La concentration inhibitrice (CI50) a été définie comme la concentration de miel qui inhibe 50 % du radical DPPH. Une valeur inférieure de la CI50 (concentration de substrat qui cause 50% de l'inhibition de l'activité de la DPPH) indique une activité antioxydante élevée. 1 ml de chaque extrait de miel à différentes concentrations a été mélangé avec 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0,04 g/l. Après 60 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant le méthanol comme blanc. Les pourcentages d'inhibition du DPPH ont été calculés en fonction de la formule suivante :

**DPPH (% d'inhibition) = [(A<sub>0</sub>-A<sub>eq</sub>) / A<sub>0</sub>] × 100**, où **A<sub>0</sub>** et **A<sub>eq</sub>** sont l'absorbance du contrôle et de l'échantillon, respectivement. La courbe exprimant le pourcentage d'inhibition de la DPPH en fonction de la concentration de l'antioxydant (µg/ml) a permis de déduire la CI50 définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour faire décroître la

concentration initiale de la DPPH à 50 %. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard ou témoin positif.

### 2-5- Test de la capacité anti-oxydante FRAP :

Le test FRAP (Ferricreducing/antioxidant power assay) était basé sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ . Le dosage FRAP a été mesuré selon la méthode d'Oyaizu, (1986). Après dilution avec de l'eau distillée, 1 ml de chaque échantillon de miel a été mélangé avec 2,5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) à 1 % (m/v). Le mélange a ensuite été incubé à 50°C pendant 20 minutes. 2,5 ml de l'acide trichloracétique (TCA) à 10 % (m/v) a ensuite été ajouté puis le tout a été centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Pour 2,5 ml de chaque surnageant, 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,1 % (m/v) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm contre le méthanol comme un blanc. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle. Le résultat a été exprimé par la concentration inhibitrice (CI50) de l'extrait aqueux de miel correspondant à une absorbance de 0,5  $\mu$ g de miel/ml du mélange (CI50 en mg/ml).

### 3- Etudes statistiques :

L'analyse statistique de tous les résultats a été analysée en utilisant le programme Microsoft Excel (2010) et Logiciel "Minitab 17" (test t de Student). L'expérience a été répétée trois fois, où la moyenne  $\pm$  l'écart-type a été calculée.

## **Partie 2: Résultats**

### 1- Propriétés physicochimiques et taux de sucres :

Les résultats du tableau 7 montrent la caractérisation du miel en fonction de ses propriétés physico-chimiques. Les deux types de miel sont proches dans leurs propriétés, à l'exception du miel amer qui a une faible teneur en saccharose (0,95 g/100 g) par rapport au miel sucré (5,89 g/100 g).

**Tableau 7 :** Propriétés physico-chimiques et la concentration des sucres réducteurs et du saccharose dans le miel sucré et amer.

|   | Unités | Miel sucré | Miel amer |
|---|--------|------------|-----------|
| <b>pH</b>                               |        | 4.30       | 4.59      |
| <b>Index de Réfraction</b>              |        | 1.4915     | 1.4845    |
| <b>Humidité</b>                         | %      | 18         | 20.8      |
| <b>TSS (Total des Solides Solubles)</b> | Brix   | 80.5       | 77.7      |
| <b>TS (Total des Solides)</b>           | %      | 80         | 79.2      |
| <b>Densité</b>                          |        | 1.38       | 1.40      |
| <b>Acidités libre</b>                   | mEq/kg | 41         | 37        |
| <b>Sucres reducteurs</b>                | g/100g | 60.4       | 60.4      |
| <b>Saccharose</b>                       | g/100g | 5.89       | 0.95      |

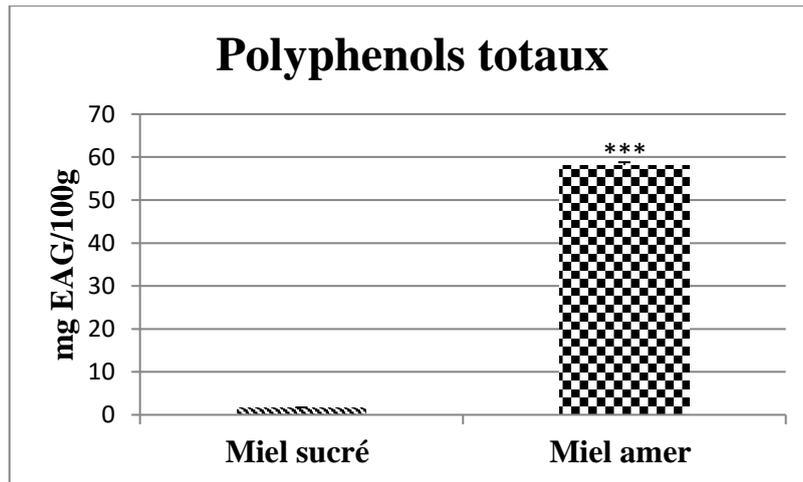
### 2- Composés bioactifs :

Les résultats indiquent que le miel amer a eu une remarquable quantité accrue en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins que celui du miel sucré (tableau 8 et figures 8, 9,10).

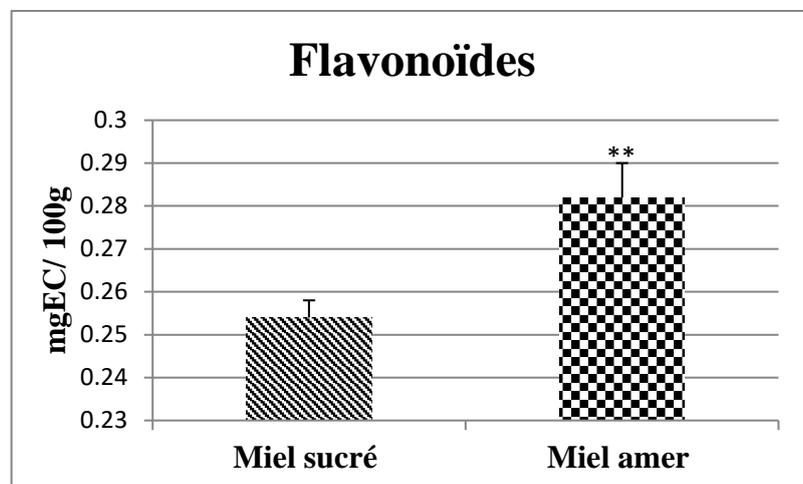
**Tableau 8 :** Teneurs des composés bioactives dans le miel sucré et amer.

|                           | Unités      | Miel sucré  | Miel amer     |
|---------------------------|-------------|-------------|---------------|
| <b>Polyphénols totaux</b> | mg EAG/100g | 1.68 ±0.05  | 58.14±0.66*** |
| <b>Flavonoïdes</b>        | mg EC/100g  | 0.254±0.004 | 0.282±0.008** |
| <b>Tanins</b>             | mg EAT/100g | 114.13±2.08 | 351.62±3.3*** |

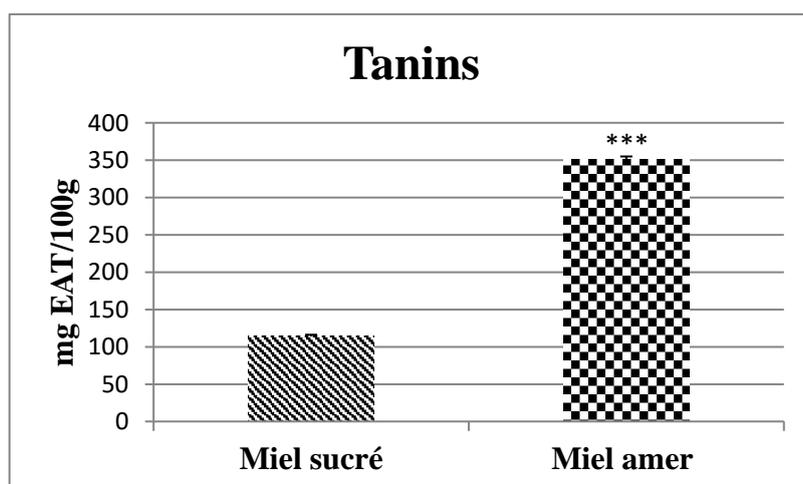
EAG= équivalent d'acide gallique, EC= équivalent de catéchine, EAT= équivalent d'acide tannique.



**Fig 8 :** Teneurs totales en polyphénols du miel sucré et amer. mg EAG/100 g de miel : mg équivalent d'acide gallique / 100 g de miel.



**Fig 9 :** Teneurs en flavonoïdes du miel sucré et amer. mg EC/100 g de miel : mg équivalent de catechine / 100 g de miel.



**Fig 10 :** Teneurs en tanins du miel sucré et amer. mg EAT/100 g de miel : mg équivalent d'acide tannique/ 100 g de miel.

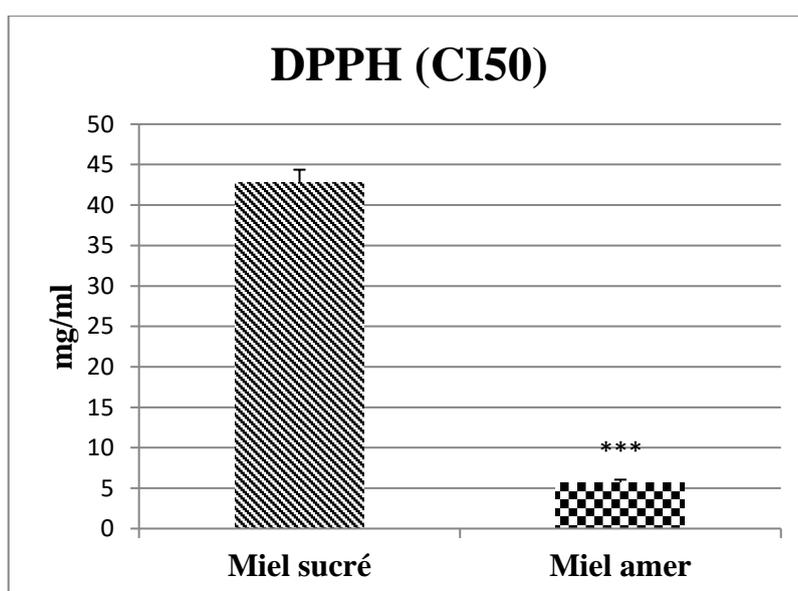
### 3- Activité antioxydante :

Le **tableau 9** et les figures (11 et 12) montre que le miel amer avait une l'activité antiradicalaire et antioxydante (DPPH et FRAP) que le miel sucré. La CI50 du DPPH était de 42,74 mg/ml d'acide ascorbique pour le miel sucré, mais il était de 5,72 mg/ml d'acide ascorbique pour celui du miel amer. En outre, le test FRAP a enregistré de grandes différences de CI50 entre les deux sortes de miel.

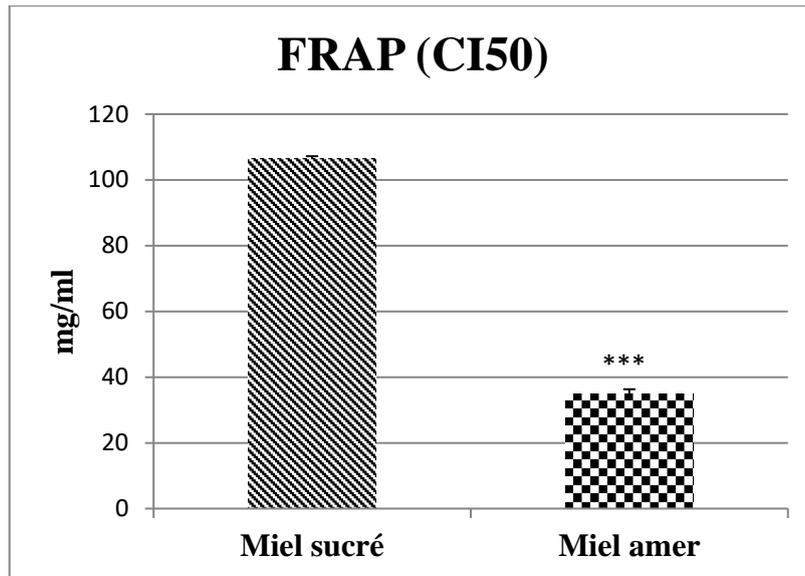
**Tableau 9** : Activité anti radicalaire et antioxydante (DPPH et FRAP) du miel sucré et amer.

|                         | Unités | Miel sucré  | Miel amer     |
|-------------------------|--------|-------------|---------------|
| DPPH(CI <sub>50</sub> ) | mg/ml  | 42.74±1.63  | 5.72±0.33***  |
| FRAP(CI <sub>50</sub> ) | mg/ml  | 106.38±0.82 | 34.91±1.40*** |
| Acide Ascorbique        | µg/ml  | 3.20±0.10   | 2.23±0.13***  |

DPPH=2,2Diphenyl 1 picrylhydrazyl, FRAP=Ferric reducing/antioxidant power, CI50= concentration inhibitrice médiane.



**Figure 11** : Activité radicalaire du miel sucré polyfloral et du miel amer uni floral.



**Figure 12 :** Activité anti-oxydante du miel sucré polyfloral et du miel amer unifloral.

## **Partie 3 : Discussion**

Par rapport au miel amer, le miel sucré a un pH, une humidité et une gravité spécifique plus faibles, par contre un TSS, un TS et une acidité libre plus élevés. Les caractéristiques du miel sucré et amer récolté sur des sites ayant presque les mêmes conditions climatiques ont révélé des différences qui étaient liées à leur composition chimique. Par la suite, il est raisonnable de s'attendre à ce que la composition et les propriétés du miel des différents lieux peuvent différer (**Ciappini & Stoppani, 2014**). En outre, le miel amer était plus foncé dans une certaine mesure.

**L'indice de réfraction** des échantillons étudiés est entre 18% pour l'unifloral et 20,8% pour le polyfloral (**Tableau 7**). La valeur la plus basse de l'unifloral est bien en dessous de la limite (normes : Max. 21%) recommandée par le **Codex Alimentarius, (2001)**, tandis que celle du polyfloral est à la limite de la valeur recommandée. Le taux d'humidité est un élément important pour évaluer le degré de maturité du miel et sa durée de conservation. En général, une quantité élevée en eau provoque la fermentation du miel, la perte de saveur ainsi que la qualité. La fermentation du miel pendant le stockage est causée par l'action de l'osmotolérance des levures, ce qui conduit à la formation d'alcool éthylique et de dioxyde de carbone. Les miels utilisés sont éloignés de ces conditions puisque les échantillons ont été analysés après une courte période de leur collecte. D'autre part, le goût amer du miel du site (**ElMasra**) est certainement dû à la présence de nectars principalement des plantes d'*Arbutus unedo*, suivi d'*Inula viscosa* car leur période de floraison se situe à la fin de l'automne et au début de l'hiver. L'indice de réfraction du multifloral, Eucalyptus et Citrus, collectés dans différentes régions de l'Algérie avait une teneur en eau qui varie entre 13,9 à 20,2 % (**Makhloufi et al., 2010**) et 16-20,4% (**Chefrour et al., 2009**), respectivement. Pourtant, le taux d'humidité dans les miels italien de Strawberry tree était de 18,6% et de 18,9%, respectivement (**Alves et al., 2013 ; Persano Oddo et al., 1995**).

Les valeurs de **pH** des deux échantillons analysés (**tableau 7**) sont cohérentes avec celles déclarées par **Bogdanov et al., (1999)**, qui ont confirmé que le miel dérivé du nectar avait un pH de 3,5 à 4,5, tandis que ceux de miellat se situaient entre 5 et 5,5. Notamment, les valeurs de **pH** du miel multifloral algérien étaient de 3,69-4,48 (**Bouasla & Bouasla, 2017**), qui se situent dans la fourchette de l'enquête actuelle. Notamment, le miel a été extrait par la méthode traditionnelle utilisant un extracteur à main, et ensuite, il a été stocké dans des conditions optimales. Le pH du miel d'arbousier semble plus élevé, où des échantillons provenant du Portugal ont montré une valeur moyenne de 4,52 (**Ulloa et al., 2015**) et 4,49 (**Aazza et al., 2013**), tandis qu'en Italie, avait un pH de 4,2 (**Persano Oddo et al., 1995**).

La valeur de **l'acidité libre** (**tableau 7**) se situe dans les normes de 50 mEq/kg fixées par le **Codex Alimentarius, (2001)**. Par conséquent, l'acidité est un critère de qualité important ; elle donne des indications très importantes sur le statut du miel (**Bogdanov, 1999**). En plus des acides organiques et des acides aminés, la diversité botanique joue un rôle important dans la définition du pH final du miel. L'acidité libre, précédemment signalée du miel d'Algérie était de 47,25-55,25 (**Doukani et al., 2014**) et que le miel de caroube marocain a varié entre 17 et 42 mEq/kg (**El-Haskoury et al., 2018**). Le miel de Starwberry

tree unifloral italien a montré des niveaux de 27,3-53,4 mEq/kg (Persano Oddo et al., 1995), ce qui est proche de notre étude.

Le TSS du miel qui représente la matière sèche principalement des composés de sucre, était de 80,5° pour l'unifloral et 77,7° pour le polyfloral (tableau 7). Le TS avait des valeurs proches en qui était de 80% pour le miel doux et de 79,2% pour le miel amer. Les résultats obtenus sont en total accord avec la littérature citée (Oroian et al., 2013). De plus, la moyenne des niveaux du TSS (76,2-80,40) du miel indien (Saxena et al., 2010) et celle du TS (1 79,0-82,2%) du Portugal est bien acceptée avec nos résultats pour les deux types de miel. En conséquence, la teneur en TSS des échantillons du miel d'*Arbutus unedo* du sud du Portugal a montré un niveau moyen de 78,35 Brix (Ulloa et al., 2015).

La gravité spécifique ou la densité du miel sucré et amer sont respectivement de 1,38 et 1,40 (tableau 7) ; ils sont plus ou moins dans la fourchette normale. Dans les pays occidentaux et Sud-ouest de l'Algérie, la gravité spécifique du miel était de 1.405-1.442 (Doukani et al., 2014) et pour la région Nord-Est, de 1.32-1.55 (Laouar & Tahar, 2017). En conséquence, la gravité spécifique de miel indien (1,39-1,49) est presque similaire à nos résultats (Nandaa et al., 2003). Il semble notamment que les échantillons de miel ayant un taux d'humidité élevé avait la plus faible valeur spécifique la gravité et vice versa. Les taux de sucres réducteurs de l'étude actuelle sont de 60,4 g/100 g pour les deux types de miel (tableau 7).

Selon le Codex Alimentarius, (2001), le sucre total et le sucre réducteur ne doit pas être inférieure à 60 g/100 g de miel de fleurs, ce qui confirme que les échantillons examinés sont des miels de nectar. En outre, le miel de différentes régions du Nord-Est de l'Algérie avait des sucres réduits de 62,5-84,45%, et le saccharose était de 2,91 à 15,34%, alors que celui du miel monofloral (*Ziziphus jujuba*) était de 62,5 à 90,12 % pour les sucres réduits et de 4,24 à 10,09 % pour le saccharose (Adjlane et al., 2014). Il a été signalé que les niveaux de fructose, de glucose et de saccharose d'un miel polyfloral finlandais était de 38,7-43,7, 30,4-38,1, et 0,0 g/100 g, respectivement (Salonen et al., 2017). Il semble que le pourcentage des glucides du miel sucré est proche des résultats nigériens et indiens (Adeniyi et al., 2014 ; Gopal et al., 2017), tant dit que le saccharose est beaucoup plus faible dans le miel amer avec une concentration de seulement 0,95 g/100 g. Pour le miel d'arbousier, la teneur en sucres réducteurs de ce travail est plus faible que celle du Portugal (Ulloa et al., 2015) et de l'Italie Persano Oddo et al., 1995).

Le miel amer monofloral est plus riche en polyphénols totaux que le miel sucré, ce qui suggère un meilleur potentiel antioxydant. Les substances phénoliques sont les principaux facteurs responsables des activités biologiques du miel. Le miel pakistanais avait une moyenne de 48,5 mg/100 g de miel (Fahim et al., 2014), tandis que le miel du Chili a enregistré des niveaux de 0-8,83 mg/100 g de miel (Muñoz & Copaja, 2007), ce qui est proche de notre miel unifloral. Il est intéressant de noter que le miel d'*Arbutus unedo* italien était le plus riche en phénols totaux (972 mg/kg d'EAG) par rapport aux miels de miellat, de bruyère, d'eucalyptus, d'asphodèle, de Citrus spp. et d'acacia (Rosa et al., 2011). Apparemment, nos résultats concordent bien avec ceux du miel d'Arbousier portugais

(Alves et al., 2013), mais pas avec ceux du miel d'*Arbutus unedo* des différentes régions de Sardaigne, qui ont enregistré une très faible teneur en polyphénols totaux (Afrin et al., 2017). Fait remarquable, l'acide homogénisique est le principal composé phénolique du miel d'Arbousier, qui pourrait avoir un potentiel antioxydant important. Dans cette étude, le miel est principalement fabriqué à partir des fleurs de l'arbousier, mais la plante *I. viscosa* y participe dans une certaine mesure, en plus d'autres fleurs rares.

La teneur en **flavonoïdes** des deux types de miel est presque la même, malgré la différence de couleur, où la couleur des échantillons amers est plus foncée. En général, les miels les plus foncés comme le tournesol et le sarrasin contiennent des concentrations plus élevées en flavonoïdes que le miel fade, ainsi qu'une meilleure capacité antioxydante (Doukani et al., 2014). En outre, des valeurs plus élevées en flavonoïdes ont été enregistrés dans les miels algériens (Khalil et al., 2012), pakistanais (Fahim et al., 2014) et malaisiens (Ranneh et al., 2018). Cependant, le miel du Chili est à la limite de l'éventail de nos résultats, dans lequel il se situe entre 0,01 et 8,83 mg/100 g de miel (Muñoz & Copaja, 2007). La teneur en flavonoïdes totales dans le miel d'Arbousier (65,74-108,20 mg de CAE/kg de miel) de la Sardaigne (Afrin et al., 2017) est étroitement liée à nos résultats du miel unifloral, tandis que celui du Portugal (4,09- 5,77 mg QE/100 g de miel) était remarquablement plus faible (Ulloa et al., 2015).

La teneur en **tanins** a enregistré le taux le plus élevé dans le miel amer qui est en accord avec la couleur sombre observée. Les tanins sont des polymères phénoliques constitués de multiples molécules de type anthocyanique (Shrivastava, 2011). En effet, les caractéristiques de l'arôme boisé et de la couleur foncée du miel indiquent la présence de tanins et de lignines. De plus, le miel polyfloral du Bénin avait des valeurs beaucoup plus élevées que notre miel polyfloral et unifloral (Azonwadé et al., 2018). En ce qui concerne le miel d'*Arbutus unedo*, il a été signalé qu'il était plus actif en tant qu'agent antioxydant en raison de sa teneur plus élevée en tanins (Adeniyi et al., 2014) ; c'est probablement pour cette raison que l'amertume uniformisée le miel est plus approprié à des fins thérapeutiques.

**Le test DPPH** a fourni une CI50 de 42,74 et 5,72 mg/ml d'acide ascorbique pour le miel sucré et amer, respectivement (**tableau 9**). La valeur d'inhibition la plus faible indique une forte capacité à piéger les radicaux libres (Kanoun, 2010). En conséquence, le dosage du DPPH a été signalé comme reflétant l'activité d'un antioxydant hydrosoluble. Il semble que le DPPH des deux miels algériens de la région Sud avait des valeurs relativement fortes de 10,94 et 6,60 CI50 mg/ml de miel (Bakchiche et al., 2017). En conséquence, d'autres études ont révélé que le miel d'Arbousier de la région côtière de l'Italie (Rosa et al., 2011) et de la Croatie (Lovakovića et al., 2018) présentait également une activité radicalaire plus élevée, 4,8 mmol ECAT/kg et 3,34 mmol ECAT/kg respectivement, ce qui correspond bien à cette étude. Le DPPH du miel d'*Arbutus unedo* a révélé une très forte activité (0,09-0,20 mmol TE/100 g) dans différentes régions de Sardaigne (Afrin et al., 2017).

**Le test FRAP** a donné une CI50 de 106,38 pour le miel sucré, alors qu'il a atteint 34,91 mg/ml pour le miel amer (**tableau 9**), ce qui suggère un potentiel antioxydant. Le potentiel antioxydant est principalement attribué à la présence de différents composants

phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et d'autres composés qui ont des potentiels antioxydants différents. En outre, le miel de couleur claire avait des valeurs FRAP inférieures à celles de la couleur foncée, ce qui indique une forte capacité antioxydante. Au Portugal, le pouvoir réducteur du miel varie entre 13,26 et 94,11 mg/ml, en fonction de la couleur du miel (**Ferreira et al., 2009**), un résultat semble être similaire à celui de la présente enquête. Pour le miel maltais, une corrélation significative entre l'activité antioxydante et les polyphénols totaux a été enregistré (**Meinen et al., 2014**). Contrairement à nos résultats, l'activité FRAP du miel de Strawberry tree italien était plus élevée ( $11,7 \pm 1,7$  mmol Fe<sup>2+</sup>/kg) que les autres miels unifloraux tels que l'Eucalyptus, le Citrus et l'Acacia (**Rosa et al., 2011**). D'autre part, le miel amer sarde avait une faible activité FRAP de 0,51-0,92 mmol Fe (II)/100 g (**Afrin et al., 2017**). Dans l'ensemble, l'activité antioxydante constatée confère au miel, en particulier à celui qui est amer, le pouvoir approprié pour contrer le stress oxydatif généré au sein des cellules lorsqu'il est exposé à différentes maladies et agents toxiques. De tels résultats confirment certaines opinions populaires non documentées sur l'application de l'*Arbutus unedo* L. dans le traitement de nombreuses maladies telles que le cancer et les troubles digestifs.

## **Partie 4 : Références**

1. **Aazza S**, Lyoussi B, Antunes D, Miguel M G (2013) Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial portuguese honeys. *J Food Sci* 78(8): C1159-C1165
2. **Adeniyi KA**, Daudu OAY, Abubakar A, Ismail AD, BusariMB, Abdulsalami H, OyiboUsman KA (2014) Comparative Analysis of the Proximate and Nutritional Compositions of Nigerian Bitter and Sweet Honey from *Apis mellifera*. *Int J Sci Res Publ*4(11):1-4
3. **Adjlane N**, Haddad N, Laid Ameer K, Kesraoui S, Moussaoui D (2014) Physicochemical and Microbiological Characteristics of Some Samples of Honey Produced by Beekeepers in Algeria. *Acta Technol Agricul*17(1): 1-5
4. **Afrin S**, Forbes-Hernandez TY, Gasparini M, Bompadre S, QuilesJL, Sanna G, Spano N, Giampieri F, Battino M (2017) Strawberry-Tree Honey Induces Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells and Increases ROS Generation: A Comparison with Manuka Honey. *Int J MolSci* 18 (613): 1-19
5. **Alves A**, Ramos A, Goncalves MM, Bernardo M, Mendes B (2013) Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J Food Compos Anal* 30 (2): 130-138
6. **Azonwadé FE**, Gbaguidi B, Paraiso A, Dah-Nouvlessounon DM, Goubalan E, Baba-Moussa F, Amoussa M, Lagnika L, TamègnonDougnon V, Baba-Moussa L (2018) Polyphenolic profile, and antioxidant and antifungal activities of honey products in Benin. *Afr J Microbiol* 12(1): 9-18
7. **Bogdanov S** (1999) Stockage-cristallisation et liquéfaction du miel. Centre suisse de recherche apicole ; 05p.
8. **Bogdanov S**, Lullman C, Martin P (1999) Qualité du miel et norme internationale relative au miel. Rapport de la Commission Internationale du miel. *Bee world* 80 : 61-69
9. **Bogdanov S**, Martin P, Lullmann C (2002) Harmonised Methods of the International Honey Commission. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld.
10. **Boulilaa A**, Hassen I, Haouari L, Mejri F, Ben Amor I, Casabiancac H, Hosni K (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Ind Crops Prod* 74: 485-493
11. **Bozin B**, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igc R (2008) Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem* 111(4): 925-929
12. **Chataway HD** (1932) The determination of moisture in honey. *Can J Res* 6(5): 532-547
13. **Chefrou A**, Draiaia R, Tahar A, Ait Kaki Y, Bennadja S, Battesti MJ (2009) Physicochemical Characteristics and Pollen Spectrum of Some North-East Algerian Honeys. *Afr J Food Agric Nutr Dev* 9(5):1276-1293
14. **Ciappini MC**, **Stoppani FS** (2014) Determination of antioxidant capacity, flavonoids, and total phenolic content in eucalyptus and clover honeys. *J ApicSci* 58(1): 103-111
15. **Codex Alimentarius** (2001) Codex Stan 12, Revised Codex Standard for honey, Standards and Standard Methods 11:1-7 <http://www.codexalimentarius.net>.
16. **Doukani K**, TabakS, Derriche A, Hacini Z (2014) Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecol-Environ* 10: 37-49
17. **El-Haskoury R**, Kriaa W, Lyoussi B, Makni M (2018) Ceratonia siliqua honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. *J Food Drug Anal* 26(1): 67-73
18. **Fahim H**, Dasti JI, Ali I, Ahmed S, NadeemM (2014) Physico-chemical analysis and antimicrobial potential of *Apis dorsata*, *Apis mellifera* and *Ziziphus jujube* honey samples from Pakistan. *Asian Pac J Trop Biomed* 4(8): 633-641

19. **Ferreira** ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM (2009) Antioxidant activity of portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem* 114(4): 1438-1443
20. **Gopal** V, Joshna K, Lavitha B (2017) A comparative review on sweet honey and bitter honey. *Int J Res Pharm Sci* 8(4): 716-723
21. **Haouam** L, Tahar A, Dailly H, Lahrichi A, Chaqroune A, Abdennour C (2016) Physicochemical properties and major elements contents of Algerian honeys from semi-arid regions. *Emir J Food Agric* 28(2): 107-115
22. **Kanoun** K (2010) Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire de Magister en substances naturelles, activités biologiques et synthèse. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen. Page 118
23. **Khalil** MI, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam MA, Islam MN, Sulaiman SA, Gan SH (2012) Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules* 17(9):11199-11215
24. **Khodaie** L, Bamdad S, Delazar A, Nazemiyeh H (2012) Antioxidant, Total Phenol and Flavonoid Contents of Two *Pedicularis* L. Species from Eastern Azerbaijan, Iran *Bioimpacts* 2(1): 43-57
25. **Laouar** H, **Tahar** A (2017) Physicochemical analysis of some honeys from humid regions in North East Algeria. *J Chem PharmSci* 10(1): 1-5
26. **Lees** R (1975) *Food Analysis: Analytical and Quality Control Methods for the Manufacturer and Buyer*. Leonard Hill Books, pp 145-146
27. **Louveaux** J (1968) Composition, propriétés et technologie du miel. « In Chauvin ». R. *Traité de biologie de l'abeille*. Ed Masson et Cie, Paris. Tome 3 : 277-324
28. **Lovakovića** BT, Lazarusa M, BrčićKaračonjia I, Juricab K, ŽivkovićSemrena T, Lušić D, Brajenovića N, Pelaić Z, Pizent A (2018) Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. *J. Trace Elem Med Biol* 45: 85-92
29. **Makhloufi** C, Kerkvliet JD, Ricciardelli D'albore G, Choukri A, Samar R (2010) Characterization of Algerian honey by palynological and physico-chemical methods. *Apidol* 41(5): 509-521
30. **Meinen** N, Camilleri L, Attard E (2014) The Antioxidant Activity of Maltese Honey. *J Apic Sci* 8(1): 1-60
31. **Muñoz** O, **Copaja** S (2007) Contenido de flavonoides y compuestos fenolicos de mieles chilenas e indice antioxidante. *Quim Nova* 30(4): 848-851
32. **Nandaa** V, Sarkara BC, Sharmaa HK, Bawa AS (2003) Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *J Food Compost Anal* 16(5): 613-619
33. **Oroian** M, Amariei S, Escriche I, Gutt G (2013) Rheological aspects of Spanish honeys. *Food Bioprocess Tech* 6(1): 228-241
34. **Oyaizu** M (1986) Studies on products of browning reaction: antioxydative activity of products of browning reaction. *Jpn J Nutr* 44(6):307-315
35. **Padma** R, Parvathy NG, Renjith V, Kalpana PR (2013) Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrical*. *Int J Res Pharm Sci* 4(1): 73-77
36. **Persano Oddo** L, Piazza M, Sabatini A, Accorti M (1995) Characterization of unifloral honeys. *Apidol* 26(6): 453-465

37. **Polshettiwar** SA, Ganjiwale RO, Wadher SJ, Yeole PG (2007) Spectrophotometric estimation of total tannins in some ayurvedic eye drops. *Indian J Pharm Sci* 69 (4): 574-576
38. **Ranneh** Y, Ali F, Zareia M, Akim AM, Hamid HA, Khazaaib H (2018) Malaysian Stingless Bee and Tualang honeys: A Comparative Characterization of Total Antioxidant Capacity and Phenolic Profile using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *LWT-J. Food SciTechnol*89: 1-9
39. **Rosa** A, Tuberoso CIG, Atzeri A, Melis MP, Bifulco E, Dessí MA (2011) Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chem* 129(3): 1045-1053
40. **Salonen** A, Virjamoja V, Tammela P, Fauchald L, Julkunen-Törö (2017) Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. *Food Chem* 237:214-224
41. **Saxena** S, Gautam S, Sharma A (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem* 118(2): 391-397
42. **Seladji** M, Bekhechi C, Beddou F, Dib H, Bendimerad N (2014) Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic extracts from Algeria. *J Appl Pharm Sci* 4 (2): 012-016
43. **Shrivastava** R (2011) Clinical evidence to demonstrate that simultaneous growth of epithelial and fibroblast cells is essential for deep wound healing. *DiabetRes ClinPrac*92(1): 92-99
44. **Singleton** VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J EnolVitic*16: 44-158
45. **Ulloa** PA, Maia M, Brigas AF (2015) Physicochemical Parameters and Bioactive Compounds of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey. *JChem*2015(3): Article ID 602792
46. **Zhishen** J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64(4): 555-559

# **|Chapitre : 3**

## **Fonction Testiculaire**

# **Partie 1 : Matériels et Méthodes**

### I- Matériels utilisés :

#### 1- Matériels biologiques :

##### + Choix des animaux :

Les rats de la souche *Wistar* ont été sélectionnée cars elle est utilisée dans toutes les disciplines de la recherche médicale et biologique. Sa longévité ainsi que sa pathologie tumorale en font un modèle de choix pour les études à long terme. Toutes expérimentations ont été manipulées selon le comité d'éthiques accordé par notre pays.

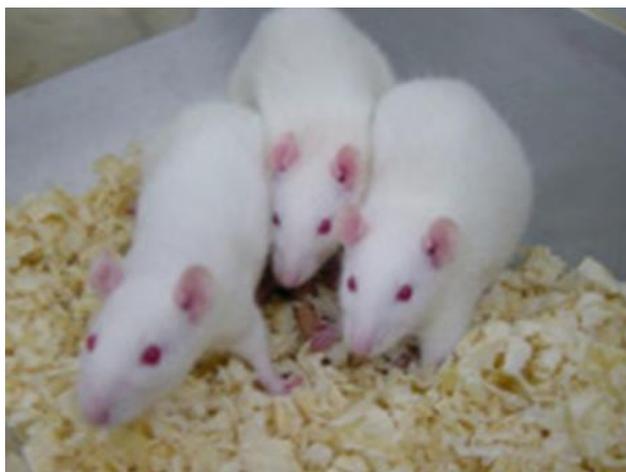


Fig 13 : Des rats males et adultes de la souche *Wistar*.

#### 2- Matériel chimique :

##### + Choix du mercure :

Le chlorure de mercure  $\text{HgCl}_2$  est un solide cristallin blanc. Il est l'une des formes les plus toxiques parce qu'il est plus soluble dans l'eau que la plupart des autres composés du mercure.



Fig 14 : Flacon du Chlorure de mercure.

### ➤ Propriété physico-chimique :

**Tableau 10 :** Propriétés physico-chimique du chlorure du mercure.

|                               | <b>Propriétés physico-chimique</b>            |
|-------------------------------|---|
| <b>Nom</b>                    | Chlorure de mercure                           |
| <b>Formule</b>                | HgCl <sub>2</sub>                             |
| <b>Couleur</b>                | Blanc   |
| <b>Etat physique</b>          | Solide (Cristaux, Granules ou poudres)        |
| <b>Points d'ébullition</b>    | 302°C   |
| <b>Ponts de fusion</b>        | 277°C   |
| <b>Poids moléculaire</b>      | 271,52g/mol                                   |
| <b>Solubilité</b>             | à 20 °C : 69 g/l                              |
| <b>Densité</b>                | 5,4 - 5,6                                     |
| <b>Pression d'évaporation</b> | 0,17 Pa à 20 °C<br>133,32 Pa à 136,2 °C       |
| <b>Dose létale 50</b>         | Voie orale (Rat) :<br>Entre 25.9 et 77 mg /Kg |

### 3- Produit naturel :

#### **Choix du miel :**

Dans cette expérimentation, nous avons choisi un produit naturel très connu pour ses vertus thérapeutiques ; le miel. Cependant, la détoxification par le miel promet être un bon plan grâce à ses composants antioxydants (acides phénoliques, vitamines, enzymes, minéraux...etc.). Ce produit est tant apprécié par la population mondiale grâce à son gout sucré, même si dans la pluparts des cas, nous avons du mal à différencier un type de miel à un autre de différent origine botanique (poly floral ou mono florale), sauf pour les amateurs du miel comme les apiculteurs. En revanche, l'idée que le miel peut avoir un gout amer, ne donne pas envie de le consommé malgré sa composition presque identique aux autres miels. Afin de satisfaire notre curiosité, nous avons voulu comparer l'effet de deux types de miel de différent gout et de différent origine botanique sur la fertilité d'un animale de laboratoire, mais aussi d'évaluer le pouvoir protecteur possible suite à une exposition au mercure très connu pour sa toxicité.

La composition physico-chimique et anti oxydante du miel a été démontré dans le précédant chapitre.

### II- Méthodologie du travail :

#### 1- Entretien et traitement des rats :

Le protocole expérimental appliqué consiste à traiter par voie orale des rats mâles par le mercure et les miels choisis, quotidiennement et durant 10 semaines. Subséquemment, 48 rats mâles provenant de l'Institut Pasteur d'Alger, pesant entre 200-250g à leur arrivée ont été logés dans des cages en polyéthylène, grillagées, munies d'étiquettes mentionnant le nom du lot et le traitement adéquat. Ces cages sont tapissées d'une litière en copeaux de bois et nettoyées régulièrement. L'élevage des rats a été effectué au niveau de l'animalerie de l'Université Badji Mokhtar-Annaba. Avant l'entame du protocole d'expérimentation, les rats ont été soumis à une période d'acclimatation de 4 semaines environ afin de s'accoutumer aux conditions de l'animalerie (photopériode, température et humidité). Les rats ont aussi un accès à l'eau et à la nourriture (20g/rat). Cette dernière est fournie sous forme de croquettes fabriquées par l'entreprise « ONAB Kseur, Bejaïa » (Tableau 11). La consommation de la nourriture et de l'eau est mesurée hebdomadairement.

**Tableau 11 :** Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (ONAB).

| <b>Matière alimentaire</b> | <b>Quantité en g/Kg<br/>d'aliment</b> | <b>Pourcentage (%)</b> |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| <b>Mais</b>                | 620                                   | 62                     |
| <b>Soja</b>                | 260                                   | 26                     |
| <b>Phosphate</b>           | 16                                    | 1.6                    |
| <b>Calcaire</b>            | 9                                     | 0.9                    |
| <b>Cellulose</b>           | 10                                    | 1.0                    |
| <b>Minéraux</b>            | 10                                    | 1.0                    |
| <b>Vitamines</b>           | 10                                    | 1.0                    |

Après cette période d'adaptation, les animaux ont été répartis en six groupes de sept rats chacun formant des lots homogènes. L'administration du chlorure de mercure et le miel a été effectué quotidiennement par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique.

#### Préparation de la solution mercure :

Le chlorure de mercure a été dilué dans de l'eau distillée en respectant la variation du poids corporel des rats du lot où chaque rat reçoit 1ml.

### ✚ Préparation des solutions miels :

Les deux types de miel sucré et amer ont été dilués dans de l'eau distillée juste avant gavage, dans le but d'activer des enzymes secondaires présent dans le miel comme le glucose oxydase afin d'obtenir un meilleur potentiel antioxydant où chaque rat reçoit 1.5 ml.

### ✚ Déroulement de l'expérimentation :

**Tableau 12 :** Les différents groupes de rats de l'expérimentation.

| Groupes   | Traitement   |
|---|--|
| <b>Groupe (1)</b><br><b>Témoin</b>                | Des mâles témoins gavés par l'eau de robinet pendant 10 semaines.                                      |
| <b>Groupe (2)</b><br><b>Miel sucré (MS)</b>       | Des mâles gavés par 3g/kg/jour de miel sucré pendant 10 semaines.                                      |
| <b>Groupe (3)</b><br><b>Miel amer (MA)</b>        | Des mâles gavés par 3g/kg/jour de miel amer pendant 10 semaines.                                       |
| <b>Groupe (4)</b><br><b>HgCl<sub>2</sub> (Hg)</b> | Des mâles gavés par 10 mg/kg/jour du HgCl <sub>2</sub> pendant 10 semaines.                            |
| <b>Groupe (5)</b><br><b>Hg+Miel sucré (Hg+MS)</b> | Des mâles gavés par 10 mg/kg/jour du HgCl <sub>2</sub> + 3g/Kg/jour de miel sucré pendant 10 semaines. |
| <b>Groupe (6)</b><br><b>Hg+Miel amer (Hg+MA)</b>  | Des mâles gavés par 10 mg/kg/jour du HgCl <sub>2</sub> + 3g/Kg/jour de miel amer pendant 10 semaines.  |

### ✚ Le poids corporel :

Tous les rats ont été pesés chaque fin de semaine afin d'évaluer leur variation du poids durant toute la période d'expérimentation.

### ✚ Après -traitement :

Après 10 semaines d'exposition et de traitement, les rats ont été sacrifiés après une nuit de jeûne.

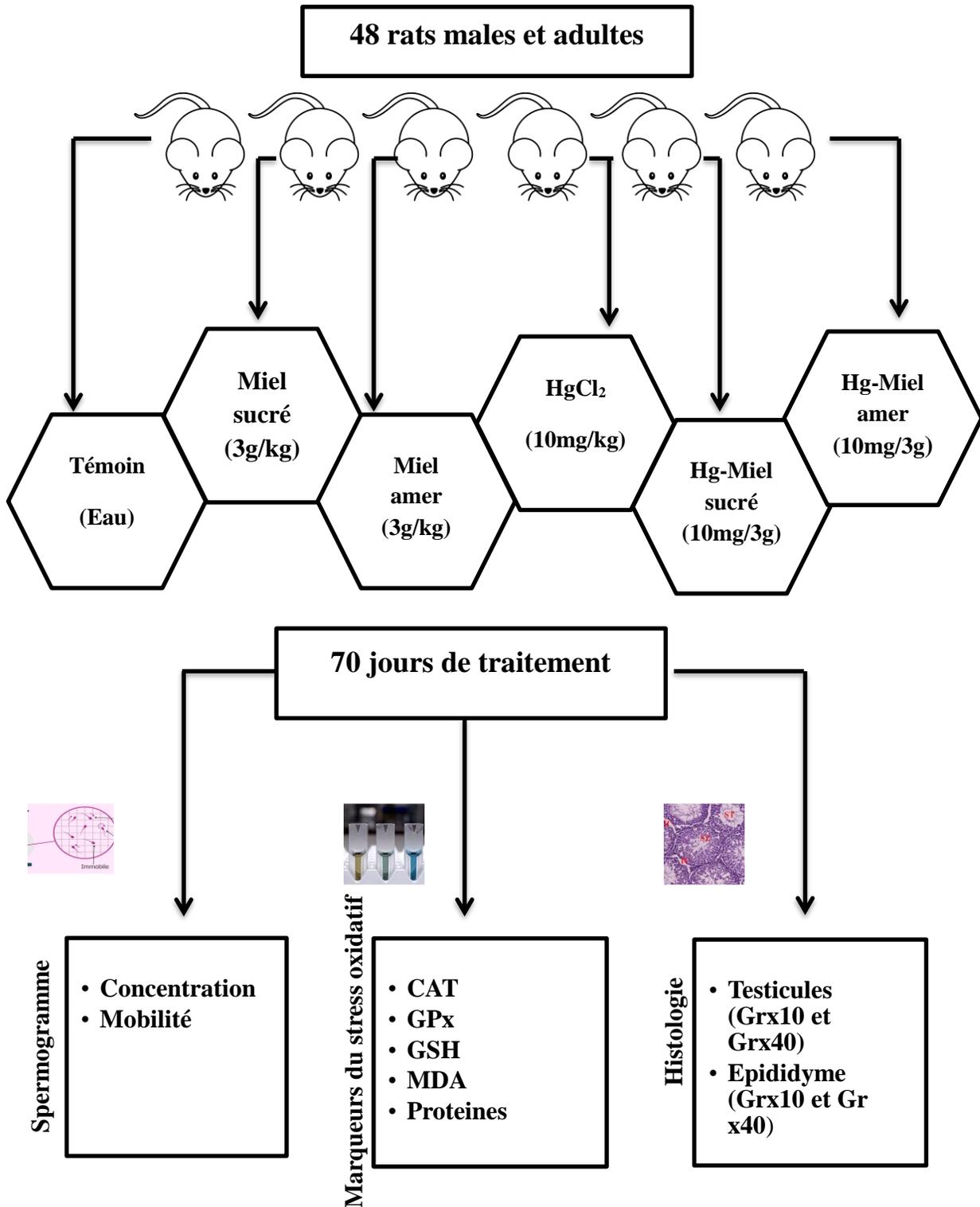


Fig 15 : Synthèse du protocole expérimentale.

### 2- Prélèvement des échantillons :

#### 2-1- Spermogramme :

Le sperme a été recueilli immédiatement après sacrifice à partir de la queue de l'épididyme. Ensuite, 1 µl de la solution épидидymaire du sperme a été suspendue dans 49 µl de solution physiologique (0,9% NaCl) préparée fraîche. Des échantillons de 10 µl de suspension homogène du sperme ont été placés sur la cellule de Malassez (hémocytomètre) pour déterminer le nombre de spermatozoïdes (exprimé en millions de spermatozoïdes par ml de suspension) et la motilité (en pourcentage de spermatozoïdes mobiles) sous un microscope optique (Leica DM LB2) à un grossissement de × 400 (OMS 1993).

#### ➤ Concentration des spermatozoïdes

Nous procédons au comptage des spermatozoïdes dans 05 cellules au grossissement × 400. La concentration des spermatozoïdes est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Concentration (spz. } 10^6 \text{ /ml)} = (\mathbf{D} \times \mathbf{V} \times \mathbf{n}) / \mathbf{N}$$

**D** : coefficient de dilution (50).

**V** : volume de la cellule de Malassez.

**n** : le nombre de spermatozoïdes comptés dans 05 cellules.

**N** : le nombre de petites cellules.

#### ➤ La mobilité des spermatozoïdes

Une goutte du sperme est déposée sur une lame, puis recouverte d'une lamelle. L'observation au microscope se fait au grossissement × 400. Le champ d'observation est divisé en 03 ; le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est calculé pour 100 spermatozoïdes.

### 3- Prélèvement des organes :

Après dissection, les testicules et l'épididyme ont été rapidement prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux et rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl à 0.9%) puis pesés pour déterminer leur poids absolu. L'une des paires de testicules a été maintenue à -20°C pour le dosage des protéines, catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx), glutathion réduit (GSH) et Malon dialdéhyde (MDA). L'épididyme et l'autre paire de testicules ont été fixés dans du formol dilué pour une étude histologique.

#### 3-1- Poids relatif des organes :

Le poids relatif des organes (testicules et épидидymes) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Poids relatif} = (\text{Poids absolu} / \text{Poids corporel}) \times 100.$$

### 3-2- Dosage de l'activité de la Catalase testiculaire :

#### - Préparation de l'homogénat :

Le dosage de l'activité enzymatique du CAT a été fait au niveau des testicules. 500 mg de tissu a été mis en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.5), puis a été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son (WiseTis Homogenizer HG-15A) pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat, ce dernier est centrifugé (Eppendorf Centrifuge 5804 R) à 5000 tours/min pendant 15 minutes.

#### - Principe :

La mesure de l'activité CAT est déterminée selon la méthode de **Clairborne, (1985)**. Elle repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et la décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant 60 secondes (lecture toute les 15 secondes) à la longueur d'onde 240nm par un spectrophotomètre (JENWAY 6305).

#### - Mode opératoire :

- ✓ Prélever 50 µl de l'homogénat dans une cuve en quartz.
- ✓ Ajouter 750 µl de solution tampon phosphate (0.1 M, pH 7.5).
- ✓ Ajouter 200µl de solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ✓ L'activité de la catalase décroît rapidement, il est important de respecter le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- ✓ Lire la densité optique à 240 nm contre le blanc réactif (tampon phosphate).
- ✓ La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

#### - Calcule de l'activité enzymatique du CAT :

L'activité enzymatique de la CAT est calculée par la formule suivante :

$$\text{L'activité de la CAT } (\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéines}) = \frac{\Delta\text{DO}}{0.040 \times \text{mg de proteines}}$$

**ΔDO:** Pente de la droite de régression obtenu après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

**0,040 :** Coefficient d'extinction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**mg de protéines :** quantité de protéines exprimée en mg.

### 3-3- Dosage de l'activité de glutathion peroxydase testiculaire :

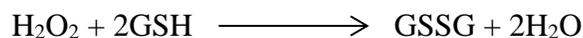
#### - Préparation de l'homogénat :

Le dosage de la glutathion peroxydase a été fait au niveau du testicule. 500 mg du tissu testiculaire a été mis en présence de 5 ml d'une solution TBS (solution saline tamponnée au

Tris) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), puis a été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

### - Principe :

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohé et Günzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de glutathion réduit (GSH) ; ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



### - Mode opératoire

- ✓ Prélever 0.2 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (pH 7.4).
- ✓ Incuber au bain marie à 25 °C, pendant 5 min.
- ✓ Ajouter 0.2ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✓ Prélever 0,48 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- ✓ Ajouter 0,32 ml de DTNB (1 mM).
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

### - Calcul de l'activité enzymatique de la GPx :

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

$$Q = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

**Q** : Quantité de GSH disparue (oxydée).

**DO échantillon** : Densité optique de l'échantillon.

**DO étalon** : Densité optique de l'étalon.

**0.04** : Concentration du substrat (GSH).

L'activité de la GPx (M GSH/min/mg protéines) =  $\frac{Q}{\text{mg de proteines}}$

### 3-4- Dosage de l'activité du glutathion réduit testiculaire :

#### - Principe :

Le dosage du glutathion (GSH) a été réalisé selon la méthode de **Weckbecker & Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5- mercapturique (JENWAY 6300). Ce dernier résulte de la réduction de l'acide DTNB (réactif d'Ellman) par les groupements (-SH) du glutathion (figure 16). Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

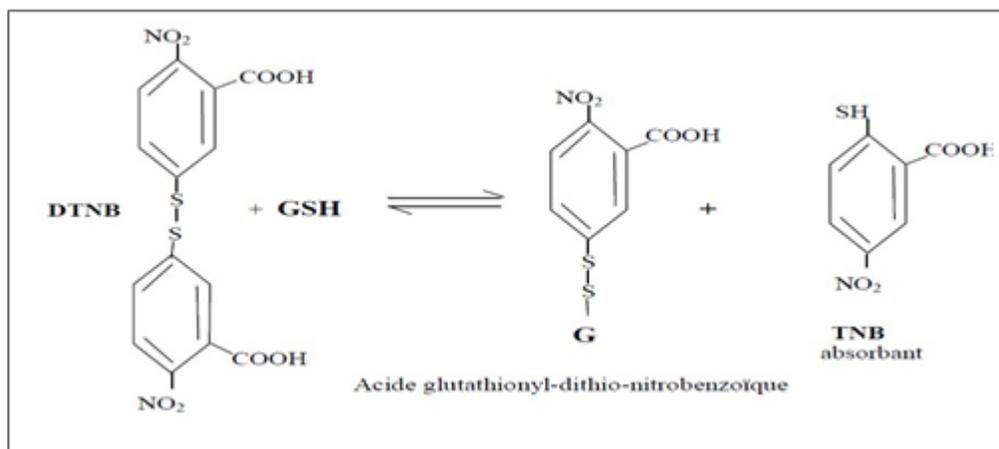


Fig 16 : Principe du dosage du glutathion.

#### - Préparation de l'homogénat :

Le dosage du glutathion a été fait au niveau des testicules. 200 mg du tissu a été mis en présence de 8 ml d'une solution d'acide EDTA à 0,02 M, puis a été broyés à froid (4°C) en utilisant un broyeur ultra son pour obtenir un homogénat.

#### - Mode opératoire :

- ✓ Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- ✓ Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide SSA 0,25 %.
- ✓ Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✓ Prélever 0,5 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris + EDTA (0.02 M d'EDTA), pH 9,6.
- ✓ Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- ✓ Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- ✓ Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

### - Calcul de la concentration :

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times \text{L} \times 10525}{13.1 \times 0.8 \times 0.5 \text{ } \mu\text{mgprotéines}}$$

**DO** : Densité optique.

**L** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat 0.2 ml de l'acide salicylique).

**1,525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant +1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).

**13,1** : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.

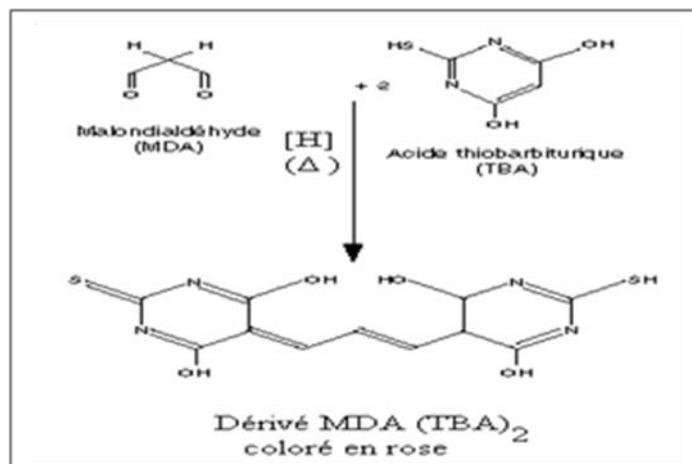
**0.8** : Volume de l'homogénat.

**0.5** : Volume du surnageant.

### 3-5- Dosage du marqueur de l'oxydation des lipides : le malondialdéhyde (MDA) :

#### - Principe :

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des ROS, générées par certains contaminants. Dans notre étude, les taux du MDA testiculaire a été évalués selon la méthode **d'Ohkawa et al., (1979)**. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C) entre le MDA et la TBA d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol (figure 17).



**Fig 17** : Principe du dosage du malondialdéhyde.

### - Préparation de l'homogénat :

500 mg de testicule des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4) pour obtenir un homogénat.

### - Mode opératoire :

- ✓ Prélever 0,5 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0,5 ml d'acide TCA 20 %.
- ✓ Ajouter 1 ml d'acide TBA 0,67 %.
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 100°C durant 15 min.
- ✓ Refroidir et additionner 4 ml de n-butanol.
- ✓ Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min.
- ✓ Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

### - Calcul de la concentration du MDA :

La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de tissu (testicule ou foie). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1',3,3' tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions (figure 18).

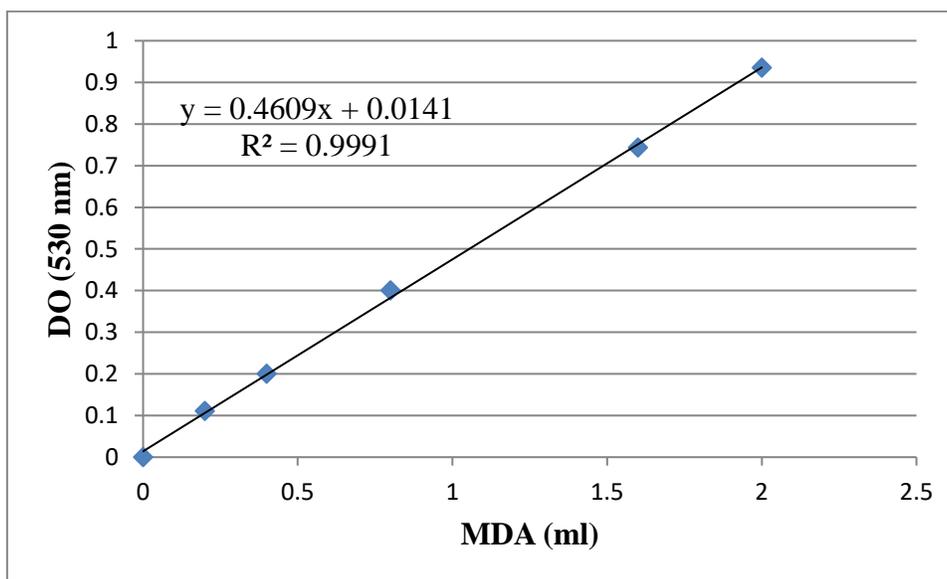


Fig 18 : La courbe d'étalonnage utilisée (nmol/ml) pour le dosage MDA.

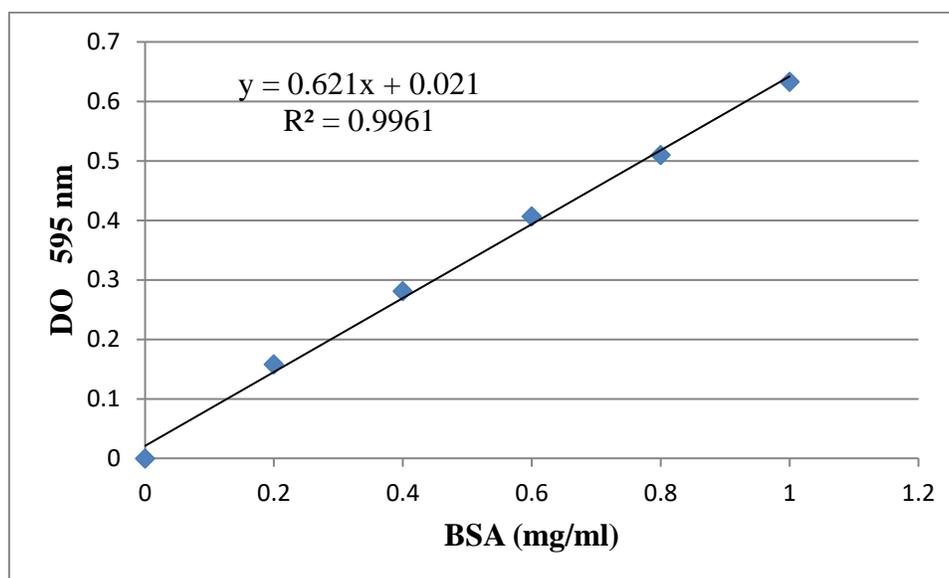
### 3-6- Dosage des protéines tissulaire :

Les protéines tissulaires ont été quantifiées selon la méthode colorimétrique de **Bradford (1976)** qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard. Le BBC réagit avec les groupements

amines (-NH<sub>2</sub>) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines qui est mesurée spectrophotométriquement à 595nm.

- **Mode opératoire :**

- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 5 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G250), comme réactif.
- ✓ Agiter et laisser le mélange à température ambiante pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- ✓ Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595nm contre le blanc contenant l'eau distillée à la place de l'homogénat.
- ✓ La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage (0 à 1 mg/ml de BSA) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (figure 19).



**Fig 19 :** La courbe d'étalonnage de BSA (1mg/ml) utilisée pour le dosage des protéines.

#### 4- Etude histologique :

L'étude histologique a été faite selon la méthode d'hématoxyline & éosine (H & E) selon les étapes suivantes :

- **Fixation des échantillons :**

Après le sacrifice, les testicules et l'épididyme ont été immédiatement préservés dans solution de formol dilué à 10%. La fixation a pour but la conservation des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes activités mitotique et enzymatique. Ainsi que le durcissement de la pièce anatomique.

### - **Déshydratation :**

La déshydratation se fait grâce à un automate circulateur où les échantillons sont immergés dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 95 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique (sortie d'eau brutale) Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe.

### - **Inclusion :**

Les échantillons imbibés de paraffine (résine blanche opaque) liquide fondue à 60° C, sont placés dans des moules appelés les barres de Leuckart, puis sont remplis de paraffine. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour aboutir à la solidification rapide (10 à 15 min) du bloc de paraffine contenant le tissu.

### - **Coupes et colorations :**

Les blocs de paraffine obtenus sont placés dans un microtome un à un afin de réaliser des sections de 5 µm d'épaisseur disposées en séries régulières sous forme d'un ruban. La confection des coupes histologiques comporte alors 3 étapes :

\***L'étalement** de segments de ruban de paraffine sur une lame de verre enduit par une solution de poly-L-lysine (sigma).

\***Le collage** : les lames de verre sont placées sur une plaque chauffante, réglée à une température de 35 °C. La chaleur permet l'étalement des rubans de tranches.

\***Le séchage de la préparation** : en inclinant les lames et en les séchant au moyen de papier buvard absorbant.

Le but de la **coloration** est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires (noyau, membrane plasmique et cytoplasme). Les lames sont mises dans des bains de solvants et de colorants comme indique le tableau suivant :

**Tableau 13** : Les différents produits de la coloration.

| <b>Produits</b> | <b>Temps</b> |
|-----------------|--------------|
| Xylene I        | 5 min        |
| Xylene II       | 5 min        |
| Ethanol 100%    | 5 min        |
| Ethanol 96%     | 5 min        |
| Ethanol 70%     | 5 min        |
| Eau distillé    | 5 min        |
| Hématoxyline    | 5 min        |
| Eau de robinet  | Rinçage      |
| Eosine          | 20 sec       |
| Ethanol 70%     | 5 min        |
| Ethanol 96%     | 5 min        |
| Ethanol 100%    | 5 min        |
| Xylene III      | 5 min        |
| Xylene IV       | 5min         |

- **Montage et observation microscopique :**

Le montage consiste à fixer une lamelle en verre sur les préparations histologiques après coloration grâce à une goutte d'Eukitt. Enfin, nous procédons à l'observation au microscope optique après séchage des lames. Dans notre étude, les photos histologiques, ont été capturé à partir d'un logiciel Qupath.

**5- Etudes statistiques :**

L'analyse statistique des résultats a été analysée en utilisant le Logiciel "GraphPad Prism 7.00 (USA)" (Anova et test t de Student). Les résultats sont significatifs lorsque  $p \leq 0.05$ .

## **Partie 2 : Résultats**

**1- Influence du traitement sur la croissance corporelle et sur le poids relatif des testicules et de l'épididyme :**

Le poids corporel total du groupe Hg a diminué de manière significative par rapport aux groupes témoins et les groupes de combinaison (figures 20 et 21). Le poids relatif des testicules du groupe Hg a diminué de manière significative par rapport au groupe témoin, au groupe MA et aux groupes HgMS et HgMA (figure 22). En ce qui concerne les témoins positifs, le groupe supplémenté en miel amer (MA) a remarquablement augmenté le poids relatif des testicules. Le poids relatif de l'épididyme n'a pas été affecté par tous les traitements, bien que la diminution observée du groupe traité au Hg soit insignifiante (figure 23).

**Tableau 14 :** Variation du poids corporel et du poids relatif des testicules et de l'épididyme chez les rats après 70 jours de traitement (Moyenne ± SD).

|               | <b>Poids corporel (g)</b>  | <b>Testicules (%)</b>        | <b>Epididyme (%)</b> |
|---------------|----------------------------|------------------------------|----------------------|
| <b>Témoin</b> | 330.3 ± 8.744              | 0,5675 ± 0,0085              | 0.2347 ± 0.00584     |
| <b>MS</b>     | 315,3 ± 3,471              | 0.54 ± 0.008                 | 0.2515 ± 0.0175      |
| <b>MA</b>     | 321,8 ± 9,586              | 0.6105 ± 0.0045              | 0.2547 ± 0.008667    |
| <b>Hg</b>     | 245 ± 6 <sup>t,s,a</sup>   | 0.505 ± 0.016 <sup>t,a</sup> | 0.212 ± 0.003        |
| <b>Hg+MS</b>  | 313 ± 8 <sup>h</sup>       | 0.569 ± 0.001 <sup>h</sup>   | 0.241 ± 0.019        |
| <b>Hg+MA</b>  | 324,8 ± 15,76 <sup>h</sup> | 0.608 ± 0.004 <sup>h</sup>   | 0.2425 ± 0.0075      |

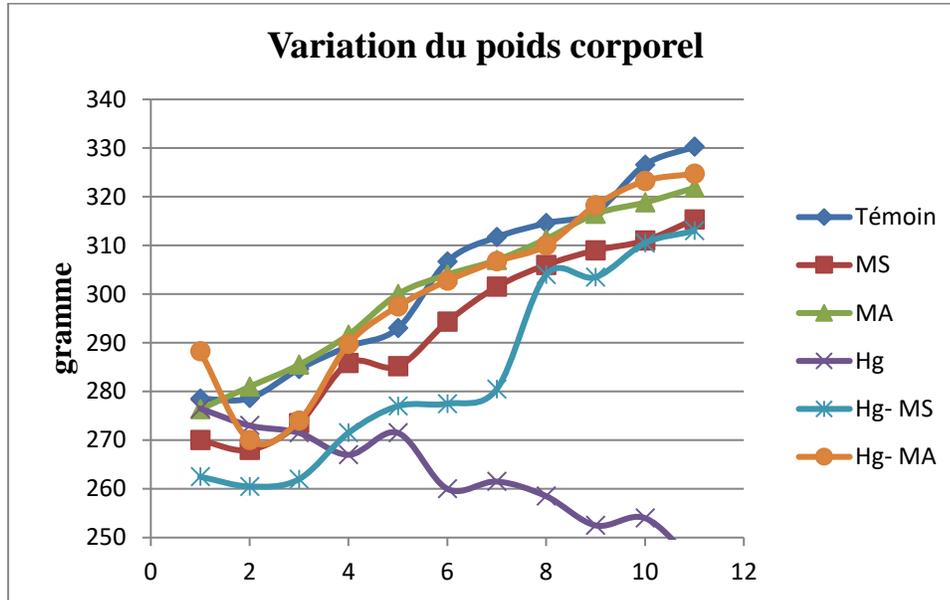


Fig 20 : Variation du poids des rats pendant 70 jours de traitement.

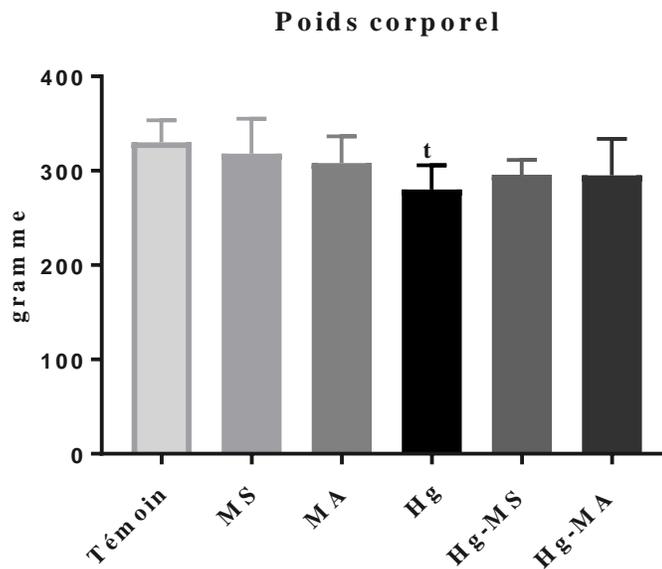
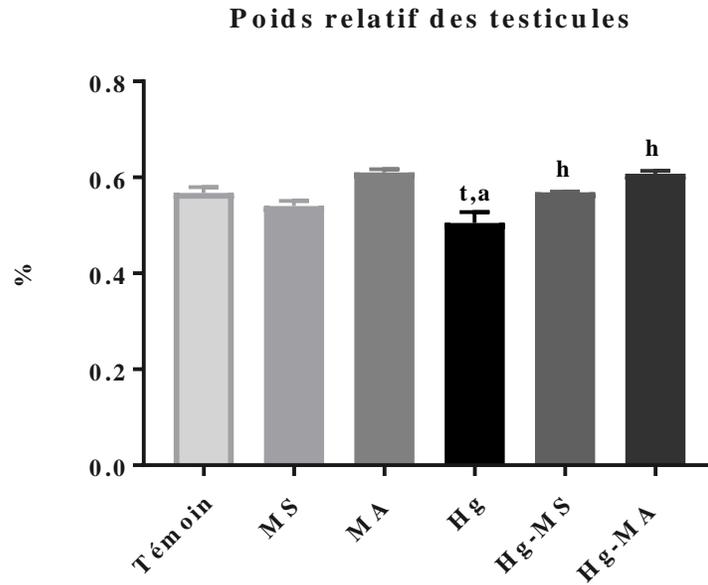
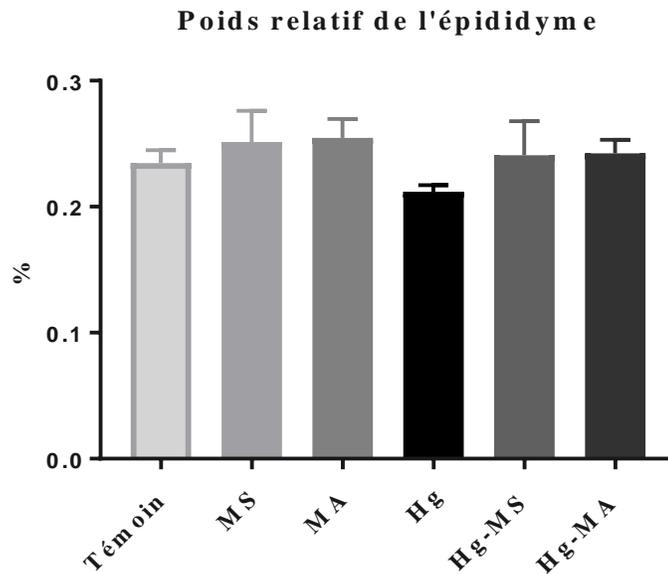


Fig 21 : Poids corporel total (g) du rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le témoin. s : statistiquement différent Vs groupe MS. a : statistiquement différent Vs groupe MA. h : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 22 :** Poids relatif des testicules du rat (moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le témoin. a : statistiquement différent Vs le groupe MA. h : statistiquement différent Vs le groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



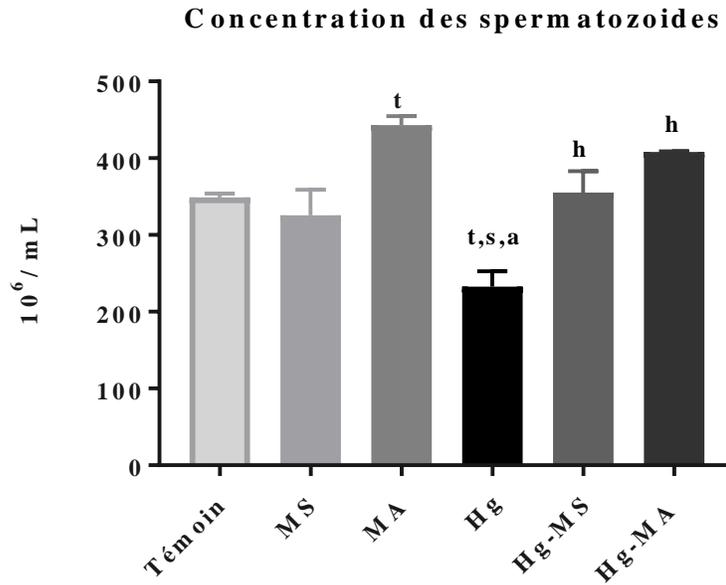
**Fig 23 :** Le poids relatif de l'épididyme du rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

**2- Influence du traitement sur la biologie des spermatozoïdes :**

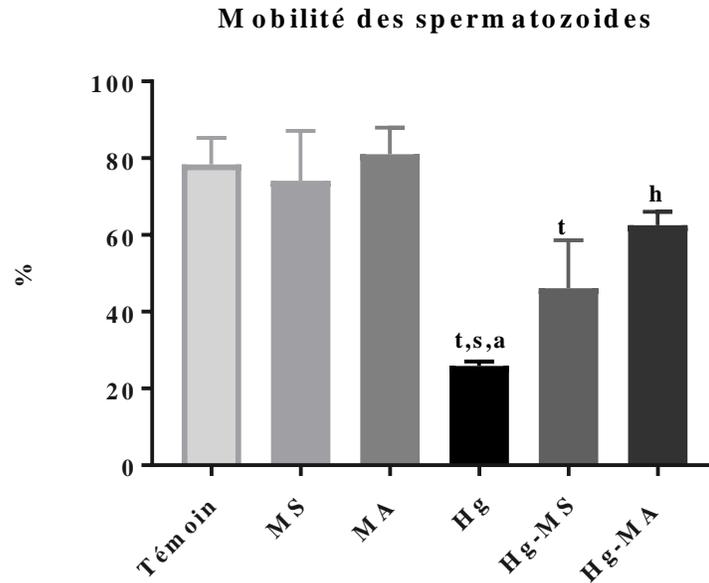
Les rats exposés au mercure ont montré une diminution de la concentration et de la mobilité du sperme dans l'épididyme par rapport aux autres groupes (figures 24 et 25). La supplémentation en MA en tant que témoin positif a augmenté le nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme par rapport au groupe témoin. La co-administration de Hg-MS a montré une augmentation significative de la concentration en spermatozoïdes par rapport au groupe Hg, et de la motilité des spermatozoïdes par rapport au groupe témoin. De plus, l'Hg-MA présente une augmentation significative du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes par rapport au groupe Hg.

**Tableau 15 :** Variation de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes chez les rats pendant 70 jours de traitement (Moyenne ± SD).

|               | <b>Concentration (10<sup>6</sup> /mL)</b> | <b>Mobilité (%)</b>               |
|---------------|---|-----------------------------------|
| <b>Témoin</b> | 348.8 ± 3.75                              | 78.4 ± 4.9                        |
| <b>MS</b>     | 325.8 ± 19.17                             | 74.17 ± 9.165                     |
| <b>MA</b>     | 443,1 ± 8,125                             | 81.08 ± 3.989                     |
| <b>Hg</b>     | 232,5 ± 11,55 <sup>t, s, a</sup>          | 25.57 ± 0.5667 <sup>t, s, a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 355 ± 20 <sup>h</sup>                     | 46.11 ± 7.22 <sup>t</sup>         |
| <b>Hg-MA</b>  | 408,1 ± 0,625 <sup>t, h</sup>             | 62.5 ± 2.5 <sup>h</sup>           |



**Fig 24 :** Concentration de sperme de rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le témoin. s : statistiquement différent Vs groupe MS. a : statistiquement différent Vs groupe MA. h : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 25 :** Mobilité des spermatozoïdes du rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent du groupe témoin. s : statistiquement différent du groupe MS. a : statistiquement différent du groupe MA. h : statistiquement différent du groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

### 3- Influence du traitement sur la variation des marqueurs du stress oxydatif :

L'activité de la CAT testiculaire (Figure 26) a été réduite après 70 jours de traitement par le Hg par rapport aux trois groupes de contrôle. Les groupes combinés Hg-MS et Hg-MA ont montré une augmentation de l'activité de la CAT par rapport au groupe Hg.

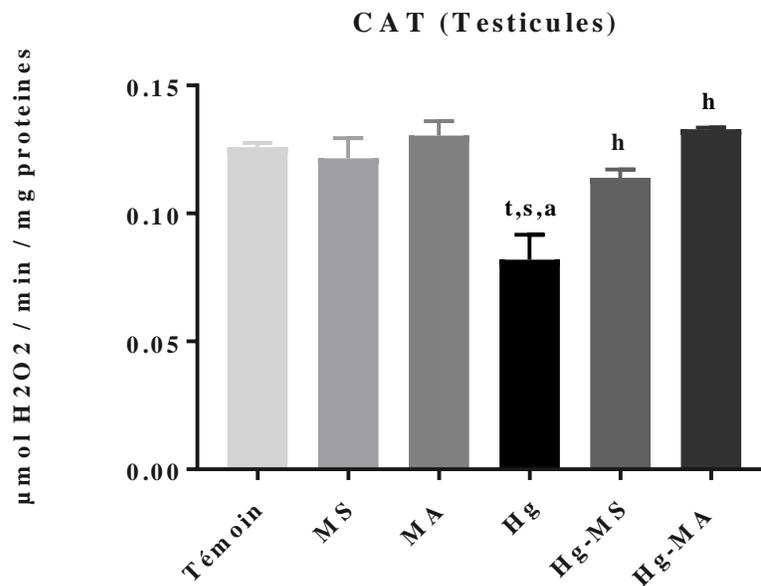
Une diminution remarquable de l'activité GPx testiculaire a été notée chez les deux témoins positifs, avec une diminution non significative dans le groupe Hg, bien que la combinaison Hg-MS et Hg-MA ait augmenté de façon insignifiante l'activité enzymatique par rapport au groupe exposé au Hg (Figure 27).

Le niveau de GSH (figure 28) dans le groupe Hg a diminué de manière significative par rapport à tous les groupes de contrôle, mais son activité a augmenté de manière significative dans les groupes Hg-MS et Hg-MA par rapport au groupe Hg.

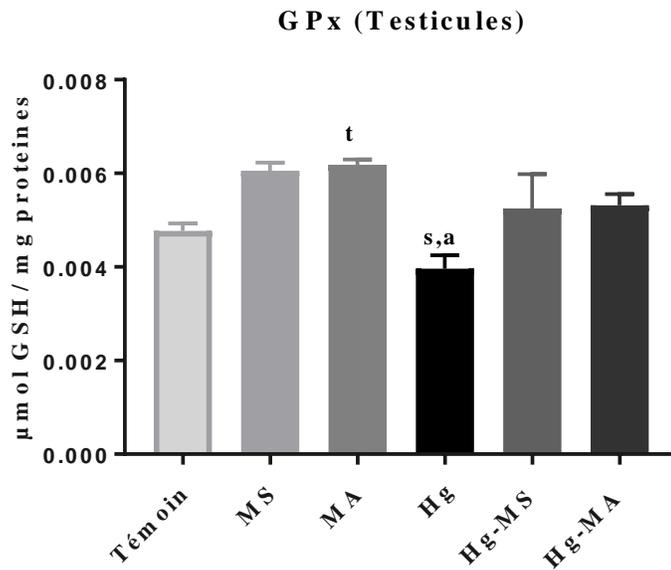
Les résultats de la figure (29) indiquent une augmentation significative de la concentration testiculaire de MDA dans le groupe Hg par rapport au groupe témoin, au groupe MS et au groupe traité au MA. Cette concentration était significativement plus faible dans le traitement combiné Hg-MS et Hg-MA que chez les rats intoxiqués par le Hg.

**Tableau 16 :** Variation des marqueurs du stress oxydatif (CAT, GPx, GSH, MDA) chez les rats pendant 70 jours de traitement (Moyenne  $\pm$  SD).

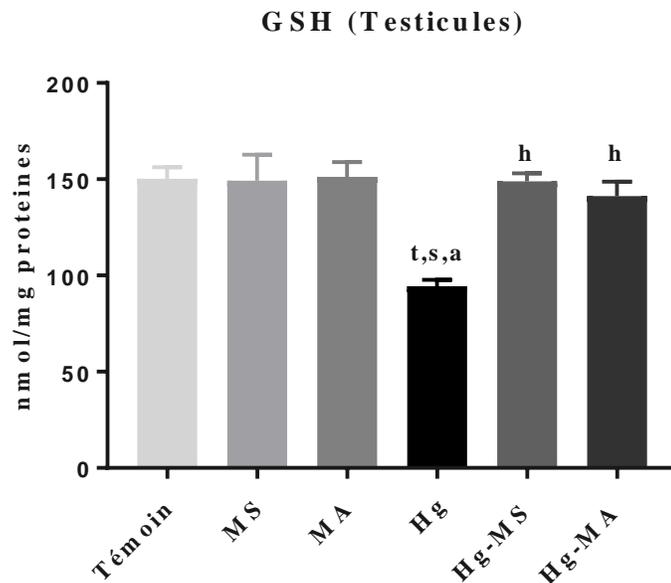
|               | CAT                                    | GPx                                   | GSH                                  | MDA                                    |
|---------------|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| <b>Témoin</b> | 0.126 $\pm$ 0.0008                     | 0.004772 $\pm$ 0.0011                 | 150.3 $\pm$ 2.944                    | 0,4786 $\pm$ 0,0159                    |
| <b>MS</b>     | 0.1215 $\pm$ 0.0035                    | 0.006058 $\pm$ 0.0012                 | 149.2 $\pm$ 7.803                    | 0,4804 $\pm$ 0,0445                    |
| <b>MA</b>     | 0.1304 $\pm$ 0.0025                    | 0.006182 $\pm$ 0.0008 <sup>t</sup>    | 151.2 $\pm$ 3.859                    | 0,4565 $\pm$ 0,0293                    |
| <b>Hg</b>     | 0,0819 $\pm$ 0,0049 <sup>t, s, a</sup> | 0.003966 $\pm$ 0.0020 <sup>s, a</sup> | 94.42 $\pm$ 1.917 <sup>t, s, a</sup> | 0,8886 $\pm$ 0,0038 <sup>t, s, a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 0,114 $\pm$ 0,002256 <sup>h</sup>      | 0.005253 $\pm$ 0.0052                 | 149 $\pm$ 2.342 <sup>h</sup>         | 0,454 $\pm$ 0,0322 <sup>h</sup>        |
| <b>Hg-MA</b>  | 0,133 $\pm$ 0,0004 <sup>h</sup>        | 0.005314 $\pm$ 0.0017                 | 141.3 $\pm$ 3.729 <sup>h</sup>       | 0,446 $\pm$ 0,01901 <sup>h</sup>       |



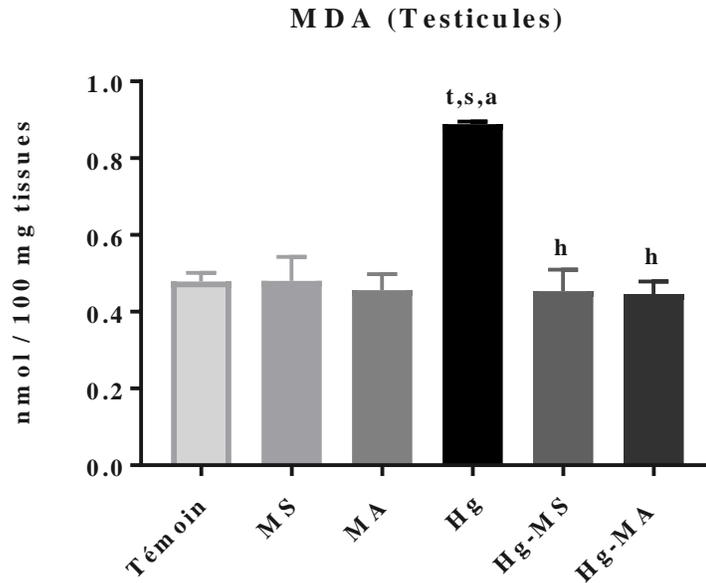
**Fig 26 :** L'activité testiculaire de la CAT du rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le contrôle. s : statistiquement différent Vs groupe MS. a : statistiquement différent Vs groupe MA. h : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 27 :** L'activité de la GPx testiculaire du rat (Moyenne ± SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le témoin. s : statistiquement différent Vs groupe MS. a : statistiquement différent Vs groupe MA. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 28 :** Le niveau du GSH testiculaire du rat (Moyenne ± SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le témoin. s : statistiquement différent Vs groupe MS. a : statistiquement différent Vs groupe MA. h : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 29 :** Le niveau du MDA testiculaire chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. t : statistiquement différent Vs le témoin. s : statistiquement différent Vs groupe MS. a : statistiquement différent Vs groupe MA. h : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS : mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA : mercure inorganique + miel amer.

#### 4- Etude histologique :

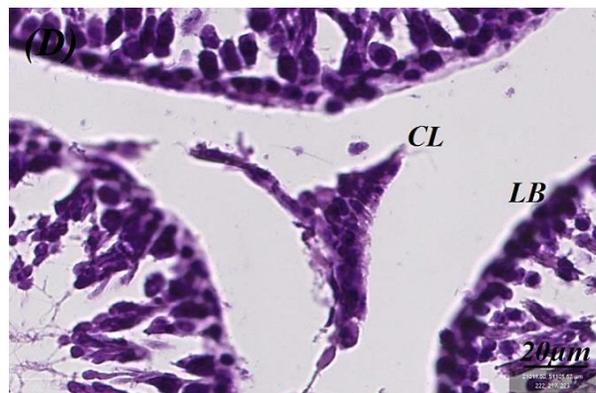
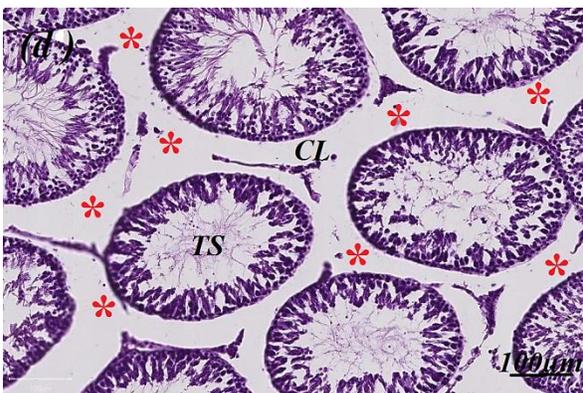
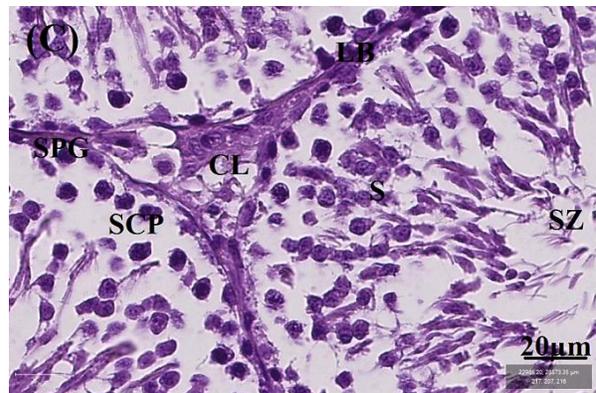
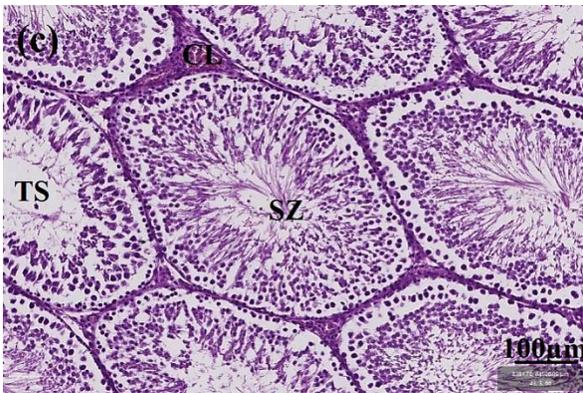
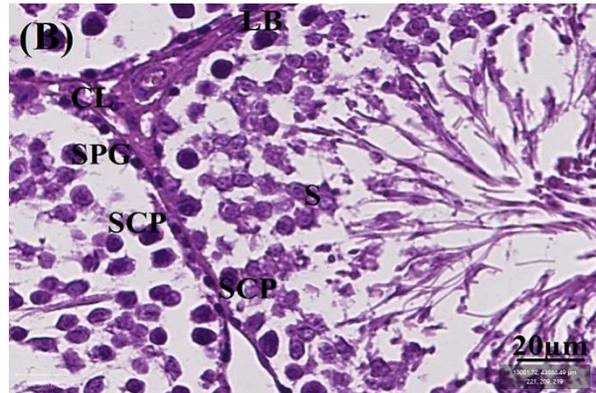
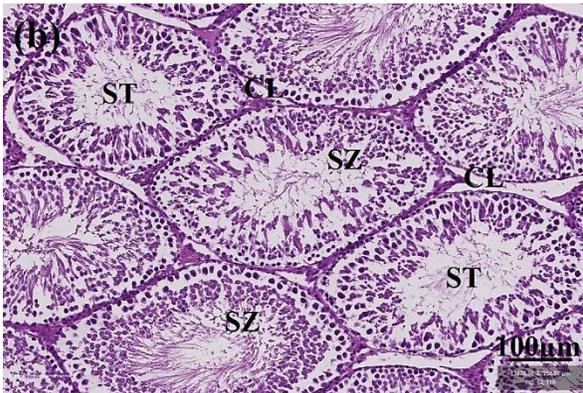
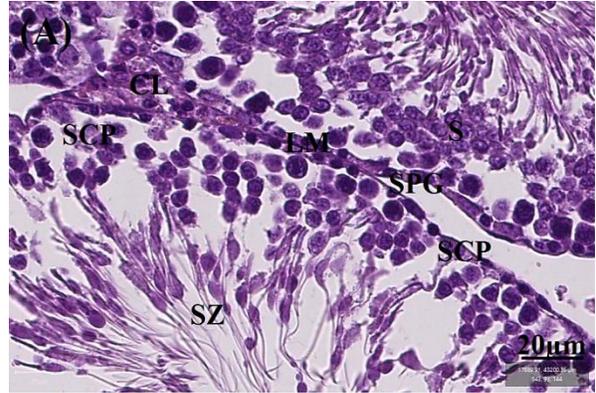
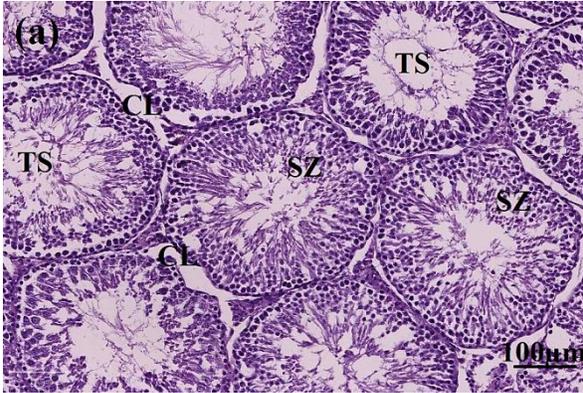
Les microphotographies des sections testiculaires et epididymaire de différents groupes de rats après 70 jours d'essai sont présentées sur (Figure 30 et 31). L'histologie du témoin a montré que le testicule est divisé en lobules ; chaque lobule contient plusieurs tubules séminifères qui sont entourés d'un tissu interstitiel. Chaque tubule est tapissé de cellules germinales à différents stades de spermatogonies, de spermatocytes primaires et secondaires, de spermatides et de spermatozoïdes matures qui occupent le centre du tubule. Les cellules de Sertoli sont situées entre les spermatogonies et reposent sur la lame basale. Dans le tissu de soutien interstitiel, les cellules de Leydig sont les cellules principales ; un type de cellule situé entre les tubules séminaux. Elles se présentent isolément ou en touffes et sont intégrées dans le riche plexus des capillaires sanguins et lymphatiques.

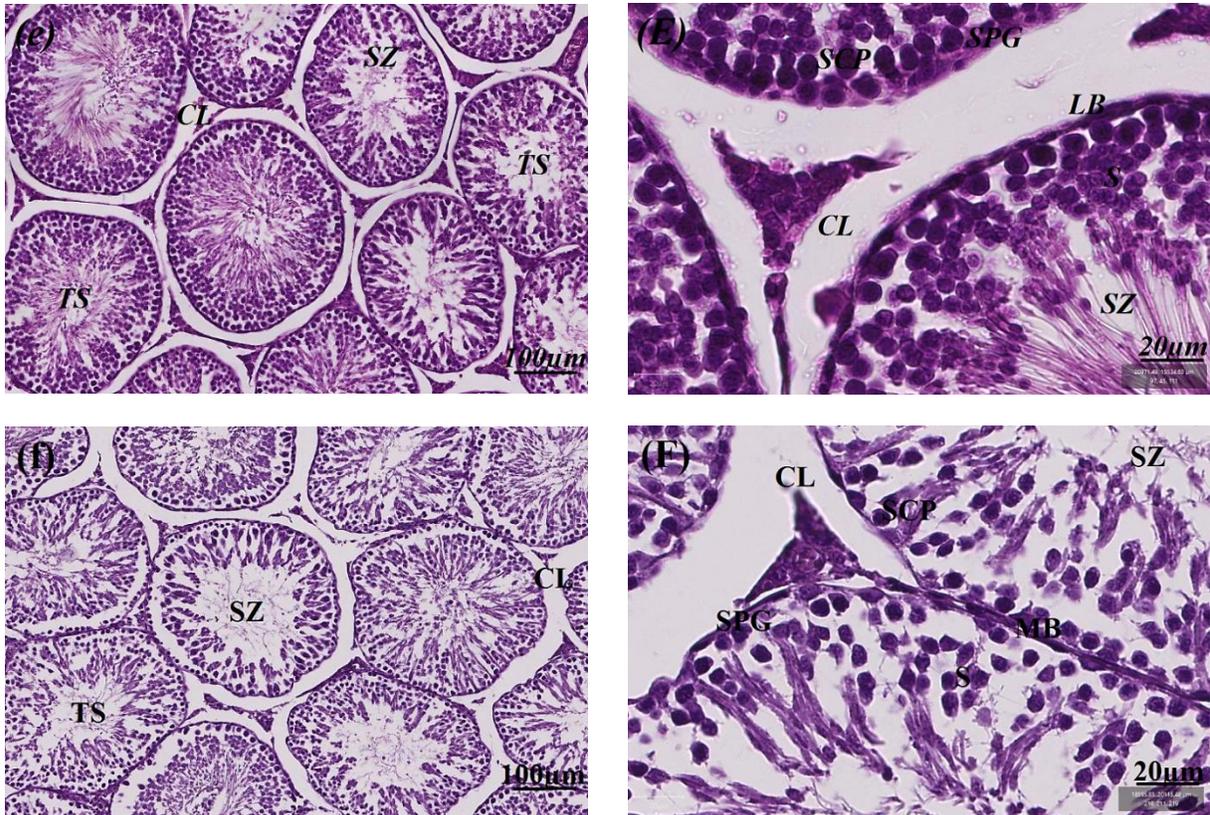
Les profils histologiques obtenus du parenchyme testiculaire et epididymaire du témoin, MS et MA à faible et fort grossissement ont montré que les tubes séminifères sont de taille et de nombre préservés, et remplis de spermatogonies et de spermatocytes à différents stades de différenciation.

Cependant, le parenchyme testiculaire et epididymaire après une exposition chronique au  $HgCl_2$  à faible grossissement a montré que les tubes séminifères ainsi que les conduits epididymaire sont légèrement atrophiés et séparés par du tissu interstitiel oedémateux-

inflammatoire. À fort grossissement, de nombreux corps apoptotiques étaient présents dans les cellules germinales et le nombre de cellules germinales dans les tubes séminifères était réduit. Une disparition presque totale des spermatozoïdes des canaux épидидymaires et un aplatissement de l'épithélium recouvrant les canaux avec un aspect vacuolisé ou coagulé du cytoplasme ont été observés dans le groupe Hg.

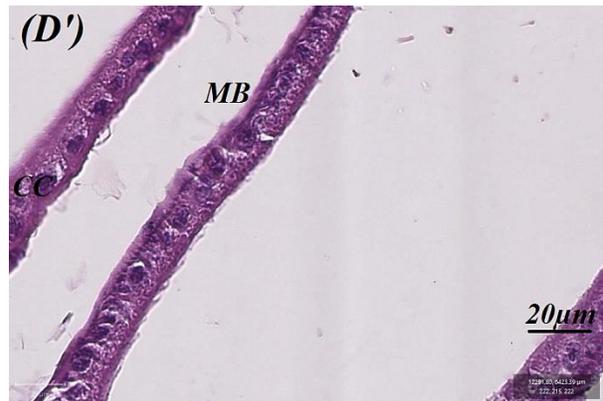
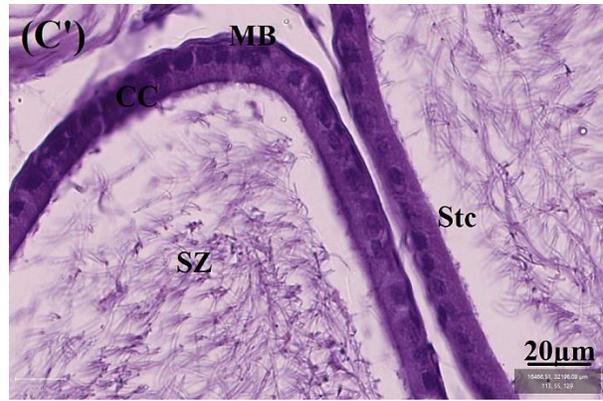
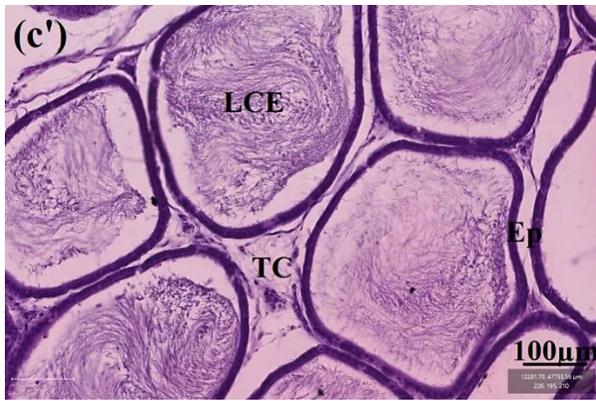
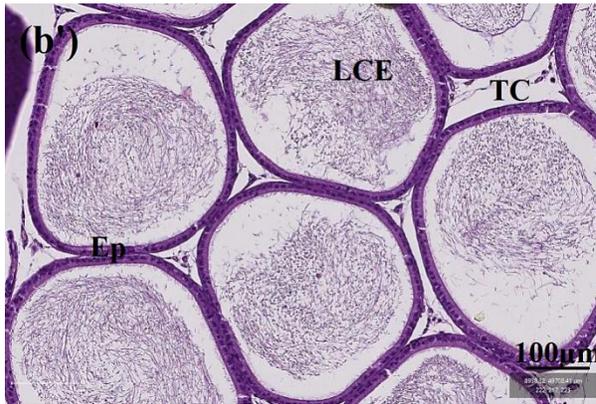
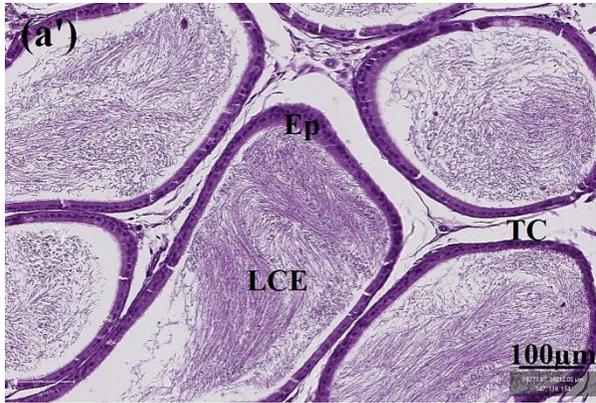
Après administration de  $\text{HgCl}_2$  avec du miel sucré et amer, les résultats ont montré, à faible grossissement, une réduction des phénomènes inflammatoires oedémateux dans le tissu interstitiel du testicule et de l'épididyme. À fort grossissement, on a noté une régénération focale de la spermatogenèse dans les tubes séminifères et une augmentation du nombre de spermatozoïdes dans les conduits de l'épididyme.

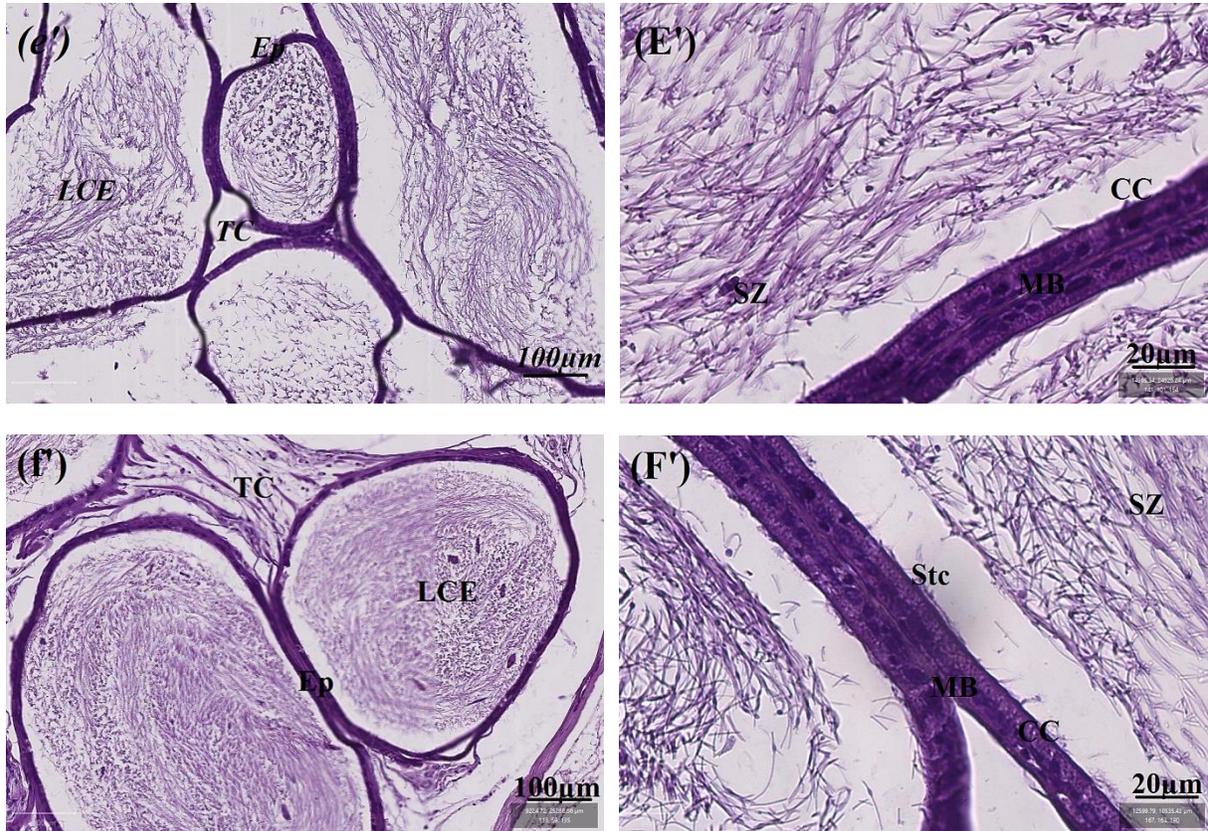




**Fig 30 :** Caractéristiques microscopiques des tubules séminifères de rats dans le groupe témoin (a), le groupe MS (b), le groupe MA (c), le groupe HgCl<sub>2</sub> (d), le groupe Hg-MS (e) et le groupe Hg-MA (f). Coloration H&E avec un grossissement de  $\times 100$  (à gauche) et  $\times 400$  (à droite). Les barres représentent 100 $\mu\text{m}$  et 20 $\mu\text{m}$ .

**CL :** (cellules interstitielles de Leydig), **SCP :** (spermatocytes primaires), **S :** (cellule de Sertoli), **SPG :** (spermatogonies), **TS :** (tubules séminifères), **SZ :** (spermatozoïdes), **LB :** (lame basale de l'épithélium séminifère), **astérisque :** (tissu interstitiel oedémateux inflammatoire).





**Fig 31** : Caractéristiques de l'épididyme du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a'), le groupe MS (b'), le groupe MA (c'), le groupe HgCl<sub>2</sub> (d'), le groupe Hg-MS (e') et le groupe Hg-MA (f'). Coloration H&E avec un grossissement de × 100 (à gauche) et × 400 (à droite). Les barres représentent 100µm et 20µm.

**MB** : membrane basale, **CC** : cellules cylindriques à noyau allongé, **TC** : tissu conjonctif, **EL** : lumière vide, **Ep** : épithélium, **LED** : lumière des canaux efférents, **Stc** : stéréocilie, **SZ** : spermatozoïdes, **LV** : lumière vide.

## **Partie 3 : Discussion**

Cette étude a été établie pour évaluer l'effet chronique du quart de la dose létale de mercure inorganique (**Sheikh et al., 2013**) sur la fonction testiculaire du rat pendant 70 jours, d'une part, et l'éventuelle activité atténuante du miel sucré et amer local, ayant des caractéristiques différentes, contre le mercure, d'autre part, afin de connaître l'état des marqueurs testiculaires après qu'un cycle complet de spermatogenèse a été exposé à ce métal toxique.

La mesure du **poids des organes** reproducteurs mâles est un indicateur sensible pour évaluer le risque de substances toxiques (**Frenedoso da Silva et al., 2014**). Les résultats obtenus après 70 jours d'exposition continue des rats au mercure inorganique ont indiqué une diminution du poids corporel total, en plus du poids relatif des testicules. Auparavant, la diminution du poids des testicules et de l'épididyme des rats était enregistrée après une supplémentation orale chronique en chlorure mercurique (**Heath et al., 2012**) ou en méthylmercure (**Frenedoso da Silva et al., 2014**). De plus, le chlorure mercurique administré aux rats par voie intrapéritonéale a diminué le poids relatif des testicules (**Abarikwu et al., 2016**). D'autre part, les rats ayant pris du chlorure mercurique dans l'eau de boisson ont montré une augmentation dans le poids relatif des testicules, accompagné d'une diminution du poids relatif des glandes sexuelles accessoires (**Boujbiha et al., 2009**). Le poids des testicules reflète l'activité de la spermatogenèse chez les mâles ; il dépend donc de la masse des cellules spermatogènes différenciées (**Siti Balkis et al., 2017**). Le rétrécissement des testicules a probablement été affecté par la génération de ROS qui suppriment la différenciation des spermatogonies (**Lysiak et al., 2002**), et/ou par la réduction du taux de testostérone due à la toxicité du mercure (**Eldesoky et al., 2013**) puisque ce métal est susceptible de traverser la barrière hémato-testiculaire (**Rao & Sharma, 2001 ; Penna et al., 2009**) ainsi que la barrière hémato-épididymaire (**Sharma et al., 1996**). En conséquence, les ions du mercure peuvent alors induire une perturbation fonctionnelle testiculaire, peut-être en inhibant les enzymes ATPase et en modifiant les niveaux d'acide sialique (**Rao & Sharma, 2001 ; Rao & Gangadharan, 2008 ; Penna et al., 2009**).

Concernant les contrôles positifs, le miel amer a augmenté le poids relatif des testicules, ce qui pourrait induire la spermatogenèse et une augmentation du niveau de la testostérone. Ce résultat est presque similaire à celui d'**Abdul-Ghani et al., (2008)** qui ont confirmé une augmentation du poids relatif de l'épididyme du rat après ingestion d'un miel multifloral pendant 20 jours en raison de l'activation de la spermatogenèse. En outre, l'augmentation du poids des animaux supplémentés en propolis pendant 70 jours était probablement due à la forte teneur en flavonoïdes (**El-mazoudy et al., 2011**). Par contre, le miel de Tualang donné aux rats n'a pas affecté le poids corporel après 28 jours de consommation (**Mahanem et al., 2006**) ainsi que pour la gelée royale administré pendant 15 jours (**Gawich et al., 2016**). Des résultats similaires ont été trouvés concernant le poids des testicules et des organes reproducteurs accessoires des rats après 28 jours de supplémentation en miel (**Mahanem et al., 2006**). L'augmentation du poids relatif des testicules dans le groupe du miel amer est probablement

liée à la présence de tanins, connus comme un puissant antioxydant comme a été démontré dans le précédent chapitre. La co-administration du miel avec le mercure a augmenté le poids relatif des testicules, mais il était plus élevé dans le groupe Hg-MS que dans le groupe Hg-MA, ce qui est certainement dû à certains constituants de chaque type de miel. En outre, la prise de poids et les avantages du miel en matière de reproduction semblent être dus au rôle protecteur des catéchines contre le stress oxydatif généré et les troubles neuroendocriniens (Mosbah et al., 2015).

Dans cette étude, la diminution de la **concentration et de la mobilité** du sperme epididymaire des rats exposés au mercure est cohérente avec la réduction du poids relatif des testicules. Des résultats similaires ont été rapportés sur la toxicité du chlorure de mercure sur le sperme de rat après une exposition de 60 jours par voie intramusculaire (Rizzetti et al., 2017), après 45 jours par l'alimentation (Moumen et al., 2011) et après 15 jours par voie intrapéritonéale (Abarikwu et al., 2016). Comme l'épididyme est le site de stockage et de maturation du sperme, les canaux efférents vides observés dans l'épididyme lors de l'exposition au mercure peuvent indiquer une hypospermatogenèse testiculaire (Penna et al., 2009 ; Rizzetti et al., 2017). Cette dernière a été confirmée par une dégénérescence de la spermatogénèse testiculaire marquée au niveau des spermatoocytes chez des rats intoxiqués au mercure inorganique (Martinez et al., 2014 a). En outre, une hypospermatogenèse pourrait résulter de la nécrose des spermatoocytes lors de l'exposition au mercure, entraînant une perturbation de la spermiation (Orisakwe et al., 2001), mais qui peut aussi être observée lors d'une altération de la synthèse de la testostérone (Jewell et al., 1998). La diminution de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes s'est accompagnée d'une réduction de la testostérone chez les rats traités au mercure inorganique (Boujbiha et al., 2011). Entre-temps, la synthèse de testostérone chez le rat peut être altérée par des lésions des tubes séminifères, mais le taux de testostérone reste dans la marge normale (Pectasides et al., 2004). D'autre part, le niveau de testostérone des travailleurs exposés à la vapeur de mercure pendant des années n'a pas été affecté, malgré les symptômes neuropsychologiques observés (Abdennour et al., 2000), de même, la concentration de testostérone se situait dans le niveau physiologique chez les rats traités au mercure, même avec certaines lésions des cellules de Leydig (Mohamed et al., 1987). En outre, la réduction de la spermatogenèse et de la mobilité des spermatozoïdes est peut-être due à la peroxydation des acides gras polyinsaturés au niveau des membranes des spermatozoïdes (Martinez et al., 2014b), et/ou à l'inhibition de certaines enzymes mitochondriales nécessaires à la production d'énergie (Yousef & Salama, 2009).

Les deux types de miel ont atténué l'intoxication au mercure sur la concentration et la mobilité des spermatozoïdes, ce qui signifie que la spermatogenèse a été notamment plus activée et protégée. L'atténuation a été plus efficace avec le miel d'arbousier, ce qui est conforme à celui du poids relatif des testicules. Selon des rapports antérieurs, la spermatogenèse a été améliorée lorsque les rats ont reçu du miel en augmentant le nombre de spermatozoïdes (Sayazana et al., 2011). La raison de la protection du miel contre

l'intoxication au mercure est due à la présence de certains antioxydants, principalement des polyphénols tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques (**Gheldof & Engeseth 2002**). Ainsi, les composés phénoliques ont été suggérés comme étant les principaux antioxydants du miel, car des corrélations significatives entre le contenu phénolique total et les activités antioxydantes et antiradicalaires du miel ont été signalées (**Berreta et al., 2005**). Les antioxydants ont été utilisés pour protéger la mobilité du sperme contre les niveaux élevés des ROS (**Said et al., 2004 ; Sharma & Agarwal 1996**), tout comme la propolis, qui a préservé la concentration et la motilité du sperme de la toxicité de l'AlCl<sub>3</sub> (**Yousef & Salama 2009**).

L'activité de la catalase a diminué lorsque les rats ont été exposés au chlorure de mercure pendant 70 jours, ce qui peut entraîner la formation de grandes quantités de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré par ce métal. On sait que cette enzyme participe à l'élimination des peroxydes. En conséquence, un effet négatif d'une exposition au mercure pendant 60 jours sur l'activité de l'épididyme et des canaux déférents du rat a été enregistré (**Martinez et al., 2014b**). Cette enzyme était plus faible que la SOD dans le tissu testiculaire des rats pendant les sept premiers jours d'exposition à HgCl<sub>2</sub> dans l'eau potable (**Boujbiha et al., 2009**), et après 30 jours lorsqu'elle était administrée aux rats per os (**Muthu & Krishnamoorthy 2012**). Les raisons possibles de la diminution de l'activité testiculaire du CAT étaient soit liées à son inhibition par les ions de mercure (**Bando et al., 2005 ; Martinez et al., 2014 b**), soit à sa saturation en raison d'une charge élevée en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La co-administration du miel avec du Hg pendant 70 jours n'a fait qu'augmenter l'activité de la catalase testiculaire dans le groupe Hg-MA de manière remarquable, avec un effet insignifiant du Hg-MS. Ces résultats concordent avec les études signalées selon lesquelles le miel a pu neutraliser la toxicité pro-oxydante (**Mohamed et al., 2011 ; Muhammad et al., 2015 ; SitiBalkis et al., 2017**). Il a été démontré que le miel réduit la production des ROS et, par conséquent, inhibe les événements proapoptotiques mitochondriaux. Les composés du miel tels que les flavonoles (quercétine, kaempférol), les flavanones (naringine, naringénine), les flavones (apigénine, acétine), les acides phénoliques (acide caféique, acide chlorogénique) et les coumarines jouent un rôle important en tant qu'agents antioxydants (**Gholami et al., 2018**). Dans cette étude, l'efficacité supérieure du miel d'*Arbutus unedo L.* sur l'activité de la CAT pourrait être due à la teneur en polyphénols, notamment l'acide tannique, qui aurait de fortes propriétés antioxydantes (**Gulcin et al., 2010**), et à l'effet chélateur contre les réactions d'oxydation catalysant les métaux (**Winiarska-mieczan, 2013**). En conséquence, les tanins ont été considérés comme de meilleurs antioxydants que d'autres molécules couramment utilisées telles que les vitamines C et E (**Sanchez-Moreno et al., 2000**). On a également signalé que la gelée royale et la propolis stimulent les activités de la catalase testiculaire et de la SOD (**Çilenk et al., 2016 ; Asadi et al., 2019**) ainsi que le miel malaisien qui renforce l'activité de la catalase testiculaire chez les rats exposés à la fumée de cigarette pendant 13 semaines (**Mohamed et al., 2011**).

Notre résultat est en harmonie avec celui d'**Ibrahim et al., (2019)**, qui ont constaté une diminution de l'activité du **GPx** après 30 jours d'exposition des poissons *Clarias gariepinus* au  $\text{HgCl}_2$ , tandis que l'étude de **Mahboob et al., (2001)**, a démontré que l'activité du GPx a augmenté de manière significative dans les testicules et diminué dans l'épididyme des rats traités au Hg pendant 2 semaines par gavage. Dans l'ensemble, la diminution des activités de CAT, SOD et GPx lors d'une intoxication au mercure suggère l'effet générateur de pro-oxydants de ce métal (**Cappello et al., 2016 ; Ibrahim et al., 2019**). La GPx est nécessaire à la protection des organes reproducteurs (**Alvarez et al., 1987**) car la peroxydation des lipides a été augmentée lorsque la GPx du sperme humain a été inhibée in vitro (**Alvarez & Storey, 1989**), en plus de la consommation éventuelle de cette enzyme lors de la conversion des peroxydes (**Ihechiluru et al., 2015 ; Sun et al., 2016**). Le contrôle positif du miel de fraisier a augmenté l'activité de la GPx, ce qui peut être considéré comme un effet bénéfique de ce type de miel. Comme indiqué précédemment, les isoformes GPx1 et GPx4 jouent un rôle dans la toxicité du mercure dans la reproduction, où l'isoforme cytosolique GPx1 est la plus importante, ce qui peut réduire le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et une série de peroxydes organiques par la consommation de molécules de GSH (**Reeves & Hoffmann, 2009**).

Dans la présente étude, le miel sucré et amer combiné au mercure a stimulé l'activité GPx de manière non significative après 70 jours. De même, le miel a été efficace pour restaurer l'activité GPx des rats exposés à la fumée de cigarette, probablement en augmentant le niveau de glutathion et en réduisant la LPO (**Mohamed et al., 2011**). En outre, le miel contient le micronutriment sélénium qui fait partie de la structure du GPx pour maintenir le statut redox et antioxydant des cellules. Le sélénium a une grande affinité avec le mercure pour participer à son excrétion et également à désactiver la formation de radicaux libres (**Rafati-Rahimzadeh et al., 2014 ; Ibrahim et al., 2019**). Par conséquent, le sélénium du miel est probablement responsable de l'augmentation de l'activité du GPx et de la restauration des performances du sperme. Par conséquent, une supplémentation en miel peut être bénéfique pour réduire et ralentir les dommages progressifs des testicules qui sont notamment accélérés par le stress oxydatif.

Les résultats actuels concordent avec ceux de **Martinez et al., (2014b)** et **Muthu & Krishnamoorthy, (2012)** qui ont également constaté une réduction de la concentration du GSH dans les testicules lorsque les rats étaient exposés au mercure inorganique. D'autre part, une augmentation de la concentration du GSH dans les testicules a été signalée, après une exposition de rats à du  $\text{HgCl}_2$  à 25 mg/L dans l'eau potable pendant 10 semaines (**Haouem et al., 2015**). Par conséquent, la raison de l'épuisement du GSH pendant la toxicité du mercure comprend la grande affinité des ROS générés pour les groupes SH (**Hansen et al., 2006 ; Eldesoky et al., 2013**), et/ou les altérations de l'intégrité structurelle de la membrane interne des mitochondries conduisant à la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Kalender et al., 2013**).

Les deux types de miels ont rétabli les niveaux du GSH lorsqu'ils sont combinés avec du mercure inorganique, avec plus d'efficacité pour le miel polyfloral. De même, **Yousef & Salama, (2009)** ont remarqué les propriétés anti-oxydantes de la propolis contre les dommages induits par l' $\text{AlCl}_3$  chez les rats. En outre, on a constaté que les flavonoïdes augmentaient l'expression de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase, une enzyme jouant un rôle dans la synthèse de la GSH (**Moskaug et al., 2005 ; Mohamed et al., 2011**). Par conséquent, comme les flavonoïdes sont présents dans les deux types de miel utilisés dans la présente étude, ils pourraient augmenter l'expression de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase chez les rats. En outre, nos résultats sont en accord avec **Falnoga & Tušek-Žnidarič, (2007)** et **Hamza & Al-Harbi, (2014)** qui ont rapporté l'effet protecteur de la co-administration du Hg soit avec du Se soit avec de la vitamine E, ces deux dernières étant des composants du miel. Les tanins sont des composés actifs présents dans les plantes qui présentent des caractéristiques phénoliques en donnant un goût amer (**Susetyarini, 2015**). Ainsi, l'acide tannique est un antioxydant qui a été utilisé pour atténuer divers cas de stress oxydatif (**Loh et al., 2005 ; Gulcin et al., 2010**), où son action antioxydante est censée stimuler la synthèse du GSH pour piéger les ERO (**Maqsood et al., 2012**).

Il est très clair, d'après les données actuelles, que le mercure était nocif pour les tissus testiculaires des rats, en augmentant remarquablement la concentration de **MDA**. Dans ce contexte, les présents résultats ont confirmé la conclusion précédente qui faisait état de l'augmentation de la concentration de MDA dans les testicules de rats exposés à  $\text{HgCl}_2$  (**Boujbiha et al., 2011 ; Kalender et al., 2013 ; Haouem et al., 2015 ; Rizzetti et al., 2017**). L'augmentation du niveau de MDA dans le groupe exposé au Hg est conforme à la diminution observée de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes, qui confirme la sensibilité des membranes des spermatozoïdes au stress oxydatif (**Sener et al., 2003**), en particulier les membranes sont riches en acides gras polyinsaturés (**Orisakwe et al., 2001 ; Kalender et al., 2013 ; Rizzetti et al., 2017**). En raison du stress oxydatif, la membrane plasmique perd sa capacité à maintenir un transport efficace, ce qui peut affecter la morphologie des spermatozoïdes (**Eldesoky et al., 2013**), leur mobilité (**Baumber et al. 2000**) et même l'intégrité de l'ADN (**Park & Park, 2007**), entraînant la formation de spermatozoïdes anormaux, en particulier la tête et la queue (**Eldesoky et al., 2013 ; Rizzetti et al., 2017**). En conséquence, il y avait une corrélation positive entre le niveau de MDA et les complications de la toxicité induite par le mercure (**Heath et al., 2010**), d'une part, et une corrélation négative entre le taux de peroxydation des lipides et le pourcentage de vitalité des spermatozoïdes (**Arabi, 2005**), d'autre part.

Les enzymes antioxydantes sont conçues pour contrecarrer les radicaux libres et les peroxydes générés dans des conditions physiologiques cellulaires normales, mais en cas de stress oxydatif élevé, le mécanisme de protection risque d'être affaibli. Dans l'expérience actuelle, le traitement combiné de mercure et de miel a conduit à une réduction remarquable de l'effet nocif du mercure, reflété par une diminution du niveau de MDA testiculaire avec des

pourcentages presque similaires. Par conséquent, le miel n'est pas seulement utile pour atténuer la toxicité du mercure, mais il est nécessaire pour améliorer les performances et l'intégrité du sperme, même dans des conditions physiologiques ordinaires. De plus, la propolis, l'un des produits de la ruche riche en flavonoïdes, a remarquablement stimulé l'activité de la CAT et de la GPx, d'une part, et diminué le niveau de MDA, d'autre part (**Jasprica et al., 2007**). C'est probablement la raison pour laquelle la propolis est considérée comme l'un des produits actifs pour lutter contre l'infertilité masculine (**Yousef & Salama, 2009**). La gelée royale contiendrait de nombreux composés antioxydants, dont les vitamines C et E, capables de protéger la peroxydation des lipides et de faire baisser le niveau d'MDA (**Asadi et al., 2019**). Les catéchines étaient également utiles pour protéger et améliorer la qualité du sperme du sanglier (**Boonsorn et al., 2010**).

**Les structures histologiques testiculaires** ont connu certaine détérioration après 70 jours d'intoxication au mercure. Selon **Frenedoso da silva et al., (2014)**, l'évaluation histologique du système de reproduction mâle nécessite une bonne compréhension de la forme et de la fonction des organes afin de distinguer les changements de la morphologie normale en corrélation avec l'état de reproduction de l'animal. De nombreuses études ont rapporté des altérations du mercure sur l'architecture histologique des testicules par une diminution du diamètre des tubules séminifères, une désorganisation de la membrane basale et de la spermatogenèse (**Penna et al., 2009 ; Boujbiha et al., 2011 ; Rizzetti et al., 2017**), en plus de la dilatation des vaisseaux sanguins du tissu interstitiel et de la présence d'espaces vides dans l'épithélium germinatif (**Massanyi et al., 2007**). Conformément à notre étude, d'autres auteurs ont signalé un nombre accru de canaux efférents vides dans l'épididyme après exposition au Hg, ce qui était lié à l'hypospermatogenèse testiculaire des rats traités au chlorure mercurique (**Penna et al., 2009**). Cet effet spermio toxique est probablement dû à l'effet oxydatif et inflammatoire du Hg sur les testicules et l'épididyme (**Rizzetti et al., 2017**). En outre, le méthylmercure a augmenté la vacuolisation des séminifères des animaux, avec l'absence de cellules germinales, ce qui est probablement dû à l'augmentation de l'indice apoptotique des cellules germinales (**Frenedoso da silva et al., 2014**).

La supplémentation en miel sucré et amer a rétabli les dommages testiculaires induits par le mercure, qui étaient causés par ses constituants qui pouvaient protéger les cellules germinales du stress oxydatif. Comme l'ont indiqué par **Mohamed et al., (2011)**, le miel a amélioré de façon remarquable la spermatogenèse. Ainsi, la spermatogenèse a été positivement facilitée par le miel qui a agi comme modulateur physiologique des proliférations de cellules spermatogènes et a activé les cellules de Sertoli (**Sayazana et al. 2011**).

## **Partie 4: Références**

1. **Arabi M (2005)** Bull spermatozoa under mercury stress. *ReprodDomestAnim* 40(5): 454-459
2. **Abarikwu SO, Benjamin S, Ebah SG, Obilor G, Agbam G (2016)** Oral administration of Moringaoleifera oil but not coconut oil prevents mercury-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia* 49(1):1-13
3. **Abdennour C, Boulakoud MS, Khelili K., Bellil T, Nezzal A (2000)** Mercury vapour and some reproductive parameters in human. *Comp Rend AcadBulgSci* 53 (12): 91-94
4. **Abdennour C, Khelili K, Boulakoud MS, Nezzal A, Boubsil S, Slimani S (2002)** Urinary markers of workers chronically exposed to mercury vapor. *Environ Res* 89 (3): 245-249
5. **Abdul-Ghani AS, Dabdoub N, Muhammad R, Abdul-Ghani R, Qazzaz M (2008)** Effect of Palestinian honey on spermatogenesis in rats. *J Med Food* 11(4): 799-802
6. **Ahmed MM, El-Shazly SA, Alkafafy ME, Mohamed AA , Mousa, AA (2018)** Protective potential of royal jelly against cadmium-induced infertility in male rats. *Andrologia* 50(5): e12996
7. **Alvarez JG, Storey BT (1989)** Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 23(1): 77-90
8. **Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987)** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 8(5): 338-348
9. **Asadi N, Arash K, Gholami M, Saidi SH, Mirhadi SA (2019)** Effect of royal jelly on testicular antioxidant enzymes activity, MDA level and spermatogenesis in rat experimental Varicocele model. *Tissue Cell* 57: 70-77
10. **Bando I, Reus MIS, Andrés D, Cascales M. (2005)** Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication. *J BiochemMolToxicol* 19(3): 154-161
11. **Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG (2000)** The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 21(6): 895-902
12. **Beigi Boroujeni MB, Shahrokhi SS, Birjandi M, Abbaszadeh A, Beyranvand F, Hamoleh S, Zandbaf Z, Gholami M (2017)** Effects of pomegranate peel extract on histopathology, testosterone levels and sperm of testicular torsion–detorsion induced in adult Wistar rats. *J Complement Integr Med* 14(4): 1-7
13. **Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM (2005)** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal ChimActa* 533(2): 185-191
14. **Boonsorn T, Kongbuntad W, Nakkong N, Aengwanich W (2010)** Effects of Catechin Addition to Extender on Sperm Quality and Lipid Peroxidation in Boar Semen. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 7(3): 283-288
15. **Boujbiha MA, Hamden K, Guermazi F, Bouslama A, Omezzine A, Kammoun A, El Feki A (2009)** Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. *ReprodToxicol* 28(1): 81-89
16. **Boujbiha MAM, Hamden K, Guermazi F, Bouslama A, Omezzine A, El Feki A (2011)** Impairment of Spermatogenesis in Rats by Mercuric Chloride: Involvement of Low 17 $\beta$ -Estradiol Level in Induction of Acute Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res* 142(3): 598-610

16. **Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72(1-2):248–254
17. **Cappello T, Brandão F, Guilherme S, Santos MA, Maisano M, Mauceri A, Canario J, Paacheco M, Pereira P (2016)** Insights into the mechanisms underlying mercury induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining <sup>1</sup>H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. *Sci Total Environ* 548-549: 13-24
18. **Chen CH, Liu TZ, Chen CH, Wong CH, Chen CH, Lu FJ, Chen SC (2007)** The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *MolNutr Food Res* 51(8): 962-968
19. **Çilenk KT, Öztürk İ, Sönmez MF (2016)** Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *ExpMolPathol* 101(2): 207-213
20. **Clairborne A (1985)** Catalase activity. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greewald AR (ed). CRC Press Boca Raton FL, USA: 237-242
21. **El-Desoky GE, Bashandy SA, Alhazza IM, Al-Othman ZA, Aboul-Soud MAM, Yusuf K (2013)** Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by *Spirulina platensis* in Rats. *PLoS ONE* 8(3): e59177
22. **ElMazoudy RH, Attia AA, El-Shenawy NS (2011)** Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. *PesticBiochemPhys* 101(3):175-181
23. **Ernst E, Moller-Madsen B, Danscher G (1991)** Ultrastructural demonstration of mercury in sertoli and Leydig cells of the rat following methyl mercuric Chloride or mercuric chloride treatment. *ReprodToxicol* 5(3):205-209
24. **Falnoga I, Tušek-Žnidarič M (2007)** Selenium–Mercury Interactions in Man and Animals. *Biol. Trace Elem Res* 119 (3):212–220
25. **Flohé L, Günzler W A (1984)** Assays of Glutathione Peroxidase. *Method Enzymol* 105: 114-121
26. **Frenedoso da Silva R, Missassi G, dos Santos Borges C, Silva de Paula E, HornosCarneiro MF, Grotto D, Barbosa Junior F., De Grava Kempinas W (2014)** Phytoremediation Potential of *Maná-Cubiu* (*Solanum sessiliflorum* Dunal) for the Deleterious Effects of Methylmercury on the Reproductive System of Rats. *Hindawi Publishing Corporation, Biomed Res Int* 2014: 309631
27. **Gawish AM, ElFiky S, Therase M, AbdElraaof A, Khalil W, Mohamed KA (2016)** Sperm abnormality toxicity due to cyclosporine A and the ameliorative effect of royal jelly in male rats. *J Basic Appl Zool* 76: 60-73
28. **Gharagozloo P, Aitken RJ (2011)** The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 26(7): 1628-1640
29. **Gheldof N, Engeseth NJ (2002)** Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem* 50(10):3050-3055
30. **Gholami M, Abbaszadeh A, KhanipourKhayat Z, Anbari K, Baharvand P, Gharravi AM (2017)** Honey improves spermatogenesis and hormone secretion in testicular ischaemia-reperfusion-induced injury in rats. *Andrologia* 50(1), e12804: 1-6

31. **Gholami M**, Abbaszadeh A, Baharvand P, Hasanvand A, Hasanvand A, Gharravi AM (2018) Protective effects of persian honey, *ApisMelliferaMedaSkorikov* on side effects of chemotherapy and ischemia/reperfusion induced testicular injury. *J Complement Integr Med* 15 (4): 1-7
32. **Gil-Guzman E**, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AT Jr, Agarwal A (2001) Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 16(9):1922-1930
33. **Gülçin I**, Huyut Z, Elmastas M, Aboul-Enein HY (2010) Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem* 3(1): 43-53
34. **Hales DB**, Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH (2005) Mitochondrial Function in Leydig Cell Steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1061: 120-134
35. **Hamza RZ, AL-Harbi MS** (2014) Monosodium glutamate induced testicular toxicity and the possible ameliorative role of vitamin E or selenium in male rats. *Toxicol Rep* 1: 1037-1045
36. **Hansen JM**, Zhang H, Jones DP (2006) Differential oxidation of thio-redoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free RadicBiol Med* 40(1): 138-145
37. **Haouem S**, Dardouri K, El Hani A (2015) Simultaneous effect of cadmium and mercury on some biochemical parameters of testis function in male rats. *J CurrChem Pharm Sc* 5(1):1-6
38. **Heath JC**, Abdelmageed Y, Braden TD, Goyal HO (2012) The Effects of Chronic Ingestion of Mercuric Chloride on Fertility and Testosterone Levels in Male Sprague Dawley Rats. *J Biomed Biotechnol*2012: 815186
39. **Heath JC**, Banna KM, Reed MN, Pesek EF, Cole N, Li J, Newland MC (2010) Dietary selenium protects against selected signs of aging and methylmercury exposure. *Neurotoxicology* 31(2): 169-179
40. **Hemadi M**, Saki G, Rajabzadeh A, Khodadadi A, Sarkaki A (2013) The effects of honey and vitamin E administration on apoptosis in testes of rat exposed to noise stress. *J Hum ReprodSci* 6(1): 54-58
41. **Ibrahim ATA**, Banaee M, Sureda A (2019) Selenium protection against mercury toxicity on the male reproductive system of *Clariasgariepinus*. *Comp BiochemPhysiol C ToxicolPharmacol Part C*, 225:108583
42. **Ihechiluru NB**, Henry AN, Taiwo IE (2015) Heavy metal bioaccumulation and oxidative stress in *Austroaeschnainermis* (Dragon fly) of the Lagos Urban ecosystem. *J Environ ChemEcotoxicol* 7(1): 11-19
43. **Jasprica I**, Mornar A, Debeljak Z, Smolic-Bubalo A, Medic-Saric M, Mayer L, Romic Z, Bucan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V (2007) In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethno pharmacol* 110(3):548-554
44. **Jewell WT**, Hess RA, Miller MG (1998) Testicular toxicity of molinate in the rat: metabolic activation via sulfoxidation. *ToxicolApplPharmacol* 149(2):159-166
45. **Joshi D**, Srivastav SK, Belemkar S, Dixit VA (2017) Zingiberofficinale and 6-gingerol alleviate liver and kidney dysfunctions and oxidative stress induced by mercuric chloride in male rats: A protective approach. *Biomed Pharmacother* 91: 645-655
46. **Kadirvelu A**, Gurtu S (2013) Potential benefits of honey in type 2 diabetes mellitus: A review. *Int J Collab Res Intern Med Public Health* 5(4): 199-206

47. **Kalender S**, Uzun FG, Demir F, Uzunhisarcıklı M, Aslanturk A (2013) Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem Toxicol* 55: 456-462
48. **Khan AT**, Atkinson A, Graham TC, Thompson SJ, Ali S, Shireen KF (2004) Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. *Food Chem Toxicol* 42(4): 571-577
49. **Loh SP**, Hishamuddin O, Abdul Salam A, Rehir D, Maznah I (2005) The Effect of Calcium, Ascorbic Acid and Tannic Acid on Iron. *Malays J Nutr* 11(2): 177-188
50. **Lysiak JJ**, Nguyen QA, Turner TT (2002) Peptide and non-peptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl* 23(3): 400-409
51. **Mahanem M.**, SitiAmrah S, Yatiban MK, Hasnan J (2006) Effect of 'Tualang Honey' on Spermatogenesis in Rats. Proceedings of 1st International Conference on the Medicinal Uses of Honey (from Hive to Therapy). Kota Bharu Kelantan, Malaysia
52. **Mahboob M**, Shireen KF, Atkinson A, Khan A T (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Heal B* 36 (5):687-697
53. **Maqsood S**, Benjakul S, Balange AK (2012) Effect of tannic acid and kiam wood extract on lipid oxidation and textural properties of fish emulsion sausages during refrigerated storage. *Food Chem* 130(2): 408-416
54. **Martinez CS**, Escobar AG, Torres JG, Brum DS, Santos FW, Alonso MJ, Salaices M., Vassallo DV, Peçanha FM, Leivas FG, Wiggers GA (2014a) Chronic exposure to low doses of mercury impairs sperm quality and induces oxidative stress in rats. *J Toxicol Environ Health A*, 77(1-3): 143-154
55. **Martinez CS**, Torres JGD, Peçanha FM, Anselmo-Franci JA, Vassallo DV, Salaices M, Alonso MJ, Wiggers GA (2014b) 60-Day Chronic Exposure to Low Concentrations of HgCl<sub>2</sub> Impairs Sperm Quality: Hormonal Imbalance and Oxidative Stress as Potential Routes for Reproductive Dysfunction in Rats. *PLoS ONE* 9(11): e111202
56. **Martinez CS**, Pecanha FM, Brum DS, Santos FW, Franco JF, Zemolin APP, Anselmo-Franci JA, Junior FB, Alonso MJ, Salaices M, Vassallo DV, Leivas FG, Wiggers GA (2016) Reproductive dysfunction after mercury exposure at low levels: evidence for a role of glutathione peroxidase (GPx) 1 and GPx4 in male rats. *ReprodFertilDev* 29(9): 1803-1812
57. **Maryann N** (2000) Honey as medicine has a long history – New Zealand honey is focus of intensive research. *Health Facts* 25: 4-5
58. **Massanyi P**, Lukac N, Slivkova J, Kovacic J, Makarevich AV, Chrenek P, Toman R, Forgacs Z, Somosy Z, Stawarz R, Formicki G (2007) Mercury-induced alterations in rat kidneys and testes in vivo. *A J Environ Sci Health ATox Hazard Subst Environ Eng* 42(7): 865-870
59. **Mohamed M**, Burbacher T, Mottet M (1987) Effects of methyl mercury on testicular functions in *Macaca fascicularis* monkey. *Pharmacol Toxicol* 60(1): 29-36
60. **Mohamed M**, Sulaiman SA, Jaafar H, Sirajudeen KNS (2011) Antioxidant Protective Effect of Honey in Cigarette Smoke-Induced Testicular Damage in Rats. *Int J MolSci* 12(9): 5508-5521
61. **Mosbah R**, Yousef MI, Mantovani A (2015) Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative e damage, histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green tea extract. *Exp Toxicol Pathol* 67(3): 253-259

62. **Moskaug** JO, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr* 81 (1 Suppl): 277-283
63. **Moumen** Y, Abdennour C, Loudjani F (2011) Influence of palm date and vitamin C supplementation on testicular functions of domestic rabbit *Oryctolagus Cuniculus* under mercury exposure. *Ann Biol Res* 2 (3):359-367
64. **Muhammad** A, Odunola OA, Gbadegesin MA, Adegoke AM, Olugbami JO, Uche NS (2015) Modulatory role of Acacia honey from north-west Nigeria on sodium arsenite-induced clastogenicity and oxidative stress in male Wistar rats. *Nat Prod Res* 29(4): 321-326
65. **Muthu** K, **Krishnamoorthy** P (2012) Effect of Vitamin C and Vitamin E on Mercuric Chloride -Induced Reproductive Toxicity in Male Rats *Biochem Pharmacol* 1(7):102
66. **Ohkawa** H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351-358
67. **Ollero** M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JJG (2001) Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16(9): 1912-1921
68. **Orisakwe** OE, Afonne OJ, Nwobodo E, Asomugha L, Dioka C E (2001) Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95(1): 92-96
69. **Park** EJ, **Park** K (2007) Induction of reactive oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercuric chloride. *Tox In Vitro* 21(5): 789-794
70. **Pectasides** D, Pectasides M, Farmakis D, Nikolaou M, Koumpou M, Kostopoulou V, Mylonakis N (2004) Testicular function in patients with testicular cancer treated with bleomycin-etoposide-carboplatin (BEC90) combination chemotherapy. *Eur Urol* 45(2): 187-193
71. **Penna** S, Pocino M, Marval MJ, Lloreta J, Gallardo L, Vila J (2009) Modifications in Rat Testicular Morphology and Increases in IFN- $\gamma$  Serum Levels by the Oral Administration of Subtoxic Doses of Mercuric Chloride. *Syst Biol Reprod Med* 55(2-3): 69-84
72. **Rafati-Rahimzadeh** M, Rafati-Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia A (2014) Current approaches of the management of mercury poisoning: need of the hour. *DARU J Pharm Sci* 22(1): 46
73. **Rao** MV, **Sharma** PSN (2001) Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reprod Toxicol* 15(6):705-712
74. **Rao** MV, **Gangadharan** B (2008) Antioxidative potential of melatonin against mercury induce intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol In Vitro* 22(4): 935-942
75. **Reeves** MA, **Hoffmann** PR (2009) The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci* 66(15): 2457-2478
76. **Rizzetti** DA, Martinez CS, Escobar AG, da Silva TM, Uranga-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Castro MM, Wiggers GA (2017) Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food Chem Toxicol* 100: 253-264
77. **Said** TM, Agarwal A, Sharma RK, Mascha E, Sikka SC, Thomas AJ Jr (2004) Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertil Steril* 82(4): 871-877

78. **Sánchez-Moreno C**, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F (2000) Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of polyphenols. *Nutr Res* 20(7): 941-953
79. **Sener G**, Sehirlı AO, Ayanoglu-Dulger G (2003) Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *PharmacolToxicol* 93(6): 290-296
80. **Shahrour A**, Zowail M, Sharafeldin KM (2016) The protective role of honey against cytotoxicity of cadmium chloride in mice. *Afr J Biotechnol* 15(46): 2620-2626
81. **Sharma AK**, Kapadia AG, Fransis P, Rao MV (1996) Reversible effects of mercuric chloride on reproductive organs of male mouse. *ReprodToxicol* 10(2): 153-159
82. **Sharma RK**, **Agarwal A** (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48(6): 835-850
83. **Sheikh TJ**, Patel BJ, Joshi DV, Patel RB, Jegoda MD (2013) Repeated dose oral toxicity of inorganic mercury in wistar rats: biochemical and morphological alterations. *Vet World* 6(8): 563-567
84. **Siti Balkis B**, FatinFarhana J, SitiNurFarahana MNA, Nur Liyana MY, Izatus Shima T, Jamaludin M (2017) Kelulut honey supplementation prevents sperm and testicular oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *JurnalTeknologi (Sciences & Engineering)* 79(3): 89-95
85. **Sun H**, Wu W, Guo J, Xiao R, Jiang F, Zheng L, Zhang G (2016) Effects of nickel exposure on testicular function, oxidative stress, and male reproductive dysfunction in *Spodopteralitura Fabricius*. *Chemosphere* 148: 178-187
86. **Susetyarini RE** (2015) The Level of Glutamic Acid in the Semen of Male White Rat (*Ratusnorwegicus*) after Being Treated with Tannin of *Plucheaindica*. *Procedia Chem* 14: 152-156
87. **Syazana NS**, Hashida NH, Majid AM, DuriyyahSharifah HA, Kamarudin MY (2011) Effects of Gelam Honey on Sperm Quality and Testis of Rat. *Sains Malays* 40(11): 1243-1246
88. **Vernet P**, Aitken RJ, Drevet JR (2004) Antioxidant Strategies in the Epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol* 216(1-2): 31-39
89. **Weckbecker G**, **Cory JG** (1988) Ribonucleotide Reductase Activity and Growth of Glutathione-Depleted Mouse Leukemia L1210 Cells In Vitro. *Cancer Lett* 40(3): 267-264
90. **WHO** (World Health Organization) (1999) Laboratory Manual for Examination of human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 4th Edition. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge.
91. **Winiarska-Mieczan A** (2013) Protective effect of tannic acid on the brain of adult rats exposed to cadmium and lead. *Environ Toxicol Pharmacol* 36(1): 9-18
92. **Wu LT**, Chu CC, Chung JG, Chen CH, Hsu LS, Liu JK, Chen SC (2004) Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutat Res* 556 (1-2): 75-82
93. **Yousef MI**, **Salama AF** (2009) Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem Toxicol* 47(6): 1168-1175

# **|Chapitre 4 :**

## **Fonction Hépatique et Rénale**

# **Partie 1 : Matériels et Méthodes**

### **I- Matériels utilisés :**

Le matériel utilisé (rat, mercure, miel sucré et amer) est le même que celui du précédent chapitre.

### **II- Méthodologie de travail (suite) :**

#### **1- Mesure de la glycémie :**

La glycémie des rats est mesurée par un glucomètre qui utilise des bandelettes réactives (Accu-Chek). Ces dernières sont destinées à un usage diagnostique in vitro (externe) pour le test de la glycémie. Elles sont conçues pour mesurer le glucose dans le sang total capillaire.

#### **2- Prélèvement sanguin :**

Les tubes de sang des rats collecté vont subir une centrifugation 3000 tours/min pendant 15 min, puis on récupère le sérum résultant. Les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur, à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques (urée, créatinine, bilirubine, cholestérol, triglycérides, transaminases et phosphatase alcaline...) à partir d'un automate biochimique (Diatron Pictus 200) et un analyseur d'électrolytes automatique (JOKOH).

#### **3- Prélèvement des organes :**

Une partie du foie et des reins ont été pesés puis conservés au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydatif et l'autre partie dans du formol dilué pour l'étude histologique ultérieurement.

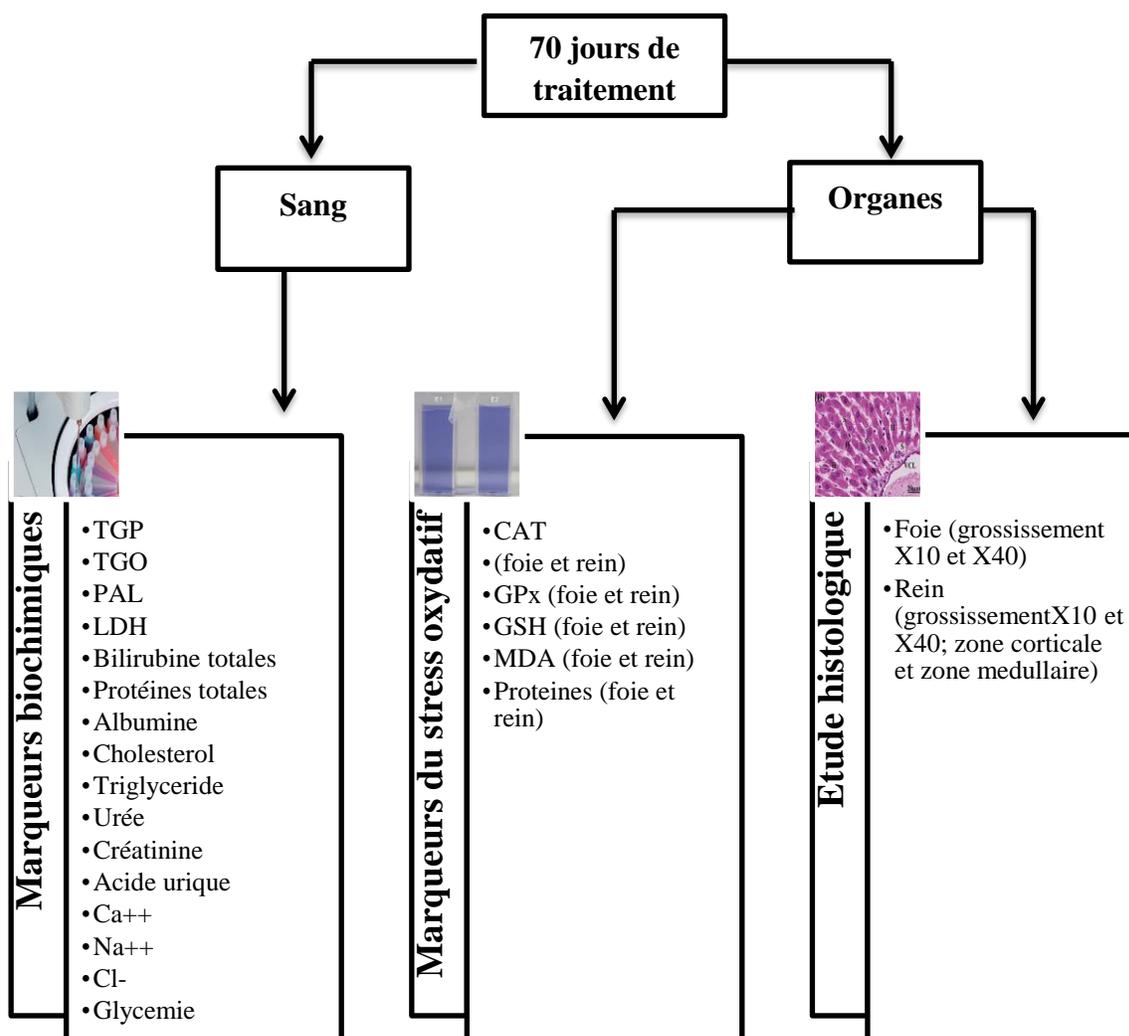


Fig 32 : Protocole expérimentale (2<sup>ème</sup> partie).

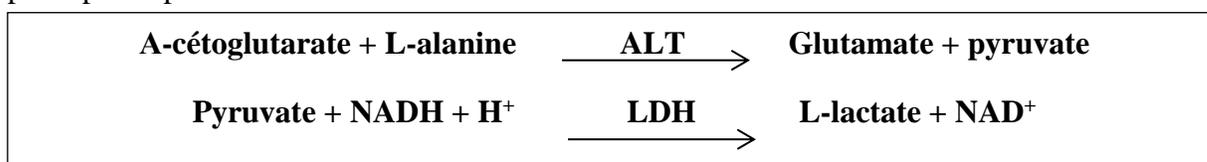
#### 4- Dosage des marqueurs biochimiques :

Le dosage des marqueurs biochimiques sont réalisés selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

##### 4-1- Mesure de l'alanine aminotransférase (ALAT/GPT) :

###### ➤ Principe :

Le principe est présenté selon le schéma réactionnel suivant :

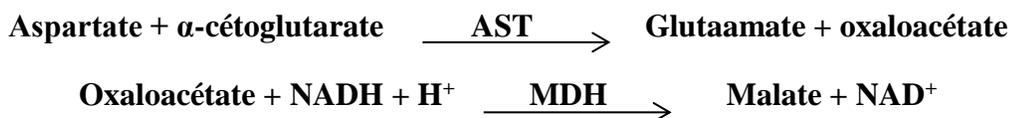


La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (sérum) (Murray, 1984c).

### 4-2- Mesure de l'aspartate aminotransférase (ASAT / GOT) :

#### ➤ Principe :

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au  $\alpha$ -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H<sup>+</sup>. Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'aspartate aminotransférase dans l'échantillon (sérum) (Murray, 1984b).



### 4-3- Mesure de la phosphatase alcaline (PAL) :

#### ➤ Principe :

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10,4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate. La formation de p-nitrophénol est mesurée par spectrophotométrie, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon (sérum) (Wenger et al., 1984).



### 4-4- Mesure du lactate déshydrogénase (LDH) :

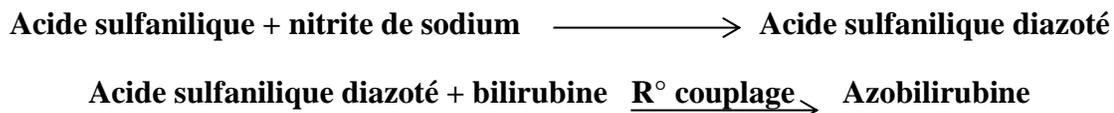
#### ➤ Principe :

La détermination cinétique de l'activité enzymatique de (LDH) basée sur la réaction citée ci-dessous. Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de LDH dans l'échantillon (Pesce, 1984).

### 4-5- Mesure de la bilirubine directe et totale :

#### ➤ Principe :

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment dans le sérum réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine quantifiable par spectrophotométrie.



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon (sérum) (**Kaplan et al., 1984a**).

### 4-6- Mesure des protéines totales plasmatiques :

#### ➤ Principe :

Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (**Koller, 1984 ; Burtis et al., 1999**).

### 4-7- Mesure de l'albumine :

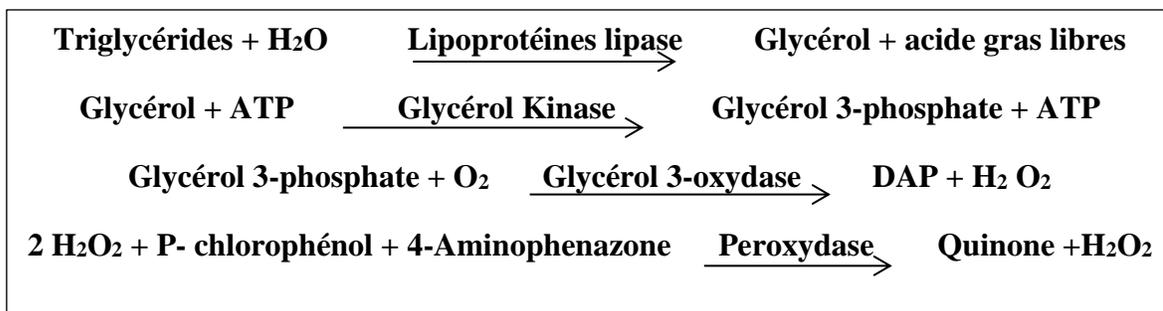
#### ➤ Principe :

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG) pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par le tampon. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 628 nm (**Doumas, 1971**).

### 4-8- Mesure de triglycéride :

#### ➤ Principe :

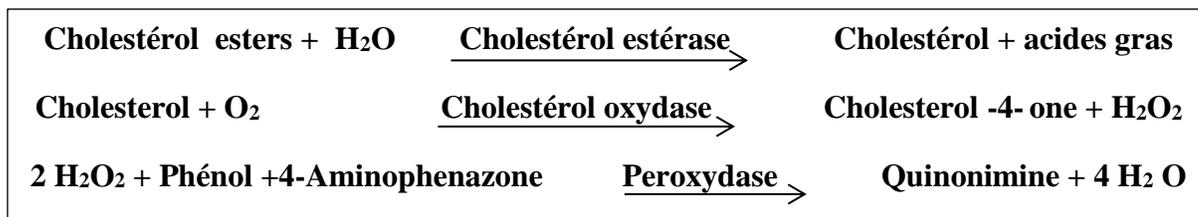
Les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré, l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (sérum) (**Buccolo et al., 1973**).



#### 4-9- Mesure du cholestérol :

##### ➤ Principe :

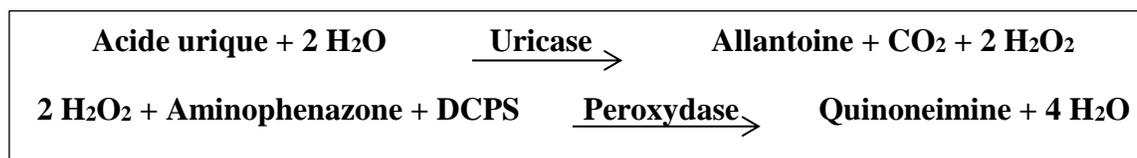
Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon la réaction ci-dessous, L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (sérum) (Naito, 1984).



#### 4-10- Mesure de l'acide urique :

##### ➤ Principe :

L'acide urique présent dans l'échantillon donne selon la réaction décrite ci-dessus un complexe coloré, quantifiable par spectrophotométrie :

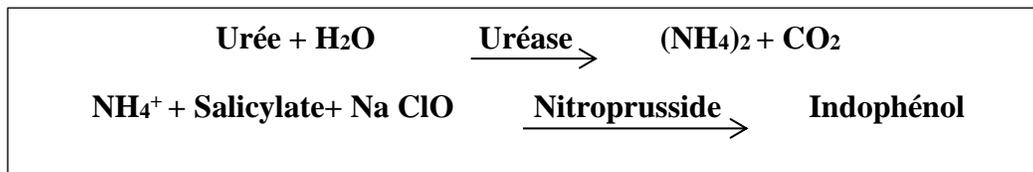


L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon (sérum) (Schultz, 1984).

#### 4-11- Mesure de l'urée :

##### ➤ Principe :

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode enzymatique utilisant l'uréase selon la réaction suivante :



Les ions d'ammonium peuvent réagir avec le salicylate et l'hypochlorite de sodium pour former un complexe coloré en vert, l'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée présentée dans l'échantillon (sérum) (**Fawcett & Scott, 1960**).

#### 4-12- Mesure de la créatinine :

##### ➤ Principe :

La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (sérum) (**Murray, 1984a**).



#### 4-13- Mesure du Calcium plasmatique :

##### ➤ Principe :

La mesure du calcium dans l'échantillon est basée sur la formation d'un complexe de couleur entre le calcium et la o-crésolphtaléine en milieu alcalin :



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de calcium dans l'échantillon (**Farell et al., 1984**).

#### 4-14- Mesure du sodium, chlore et potassium :

##### ➤ Principe :

Les ions ont été traités par méthodes semi-automatiques, par potentiométrie (sodium, chlore et potassium) à l'aide de l'appareil (EX-D Jokoh ELECTROLYTE ANALYZER, Japon).

### 5-15- Mesure de la glycémie :

#### ➤ Principe :

La bandelette réactive contient de la glucose-oxydase, une enzyme qui oxyde le glucose dans le sang et qui produit de l'acide D-gluconique et du peroxyde d'hydrogène.

#### - Mode opératoire :

- ✓ Le lecteur se met en marche automatiquement par simple insertion de la bandelette réactive **Accu-Chek** (dans le sens des flèches et jusqu'à la butée).
- ✓ Le symbole d'une goutte clignote.
- ✓ Déposer la goutte de sang sur la zone de dépôt orange de la bandelette. Le résultat s'affiche en 5 secondes.
- ✓ La glycémie est donnée en g/dl.

### 5- Dosage des marqueurs du stress oxydatif :

Les marqueurs : CAT, GPx, GSH, MDA et les protéines ont été dosé dans le foie et les reins selon la description de la méthode de mesure de chaque paramètre dans le précédent chapitre.

### 6- Etude histologique :

Le foie et les reins ont subi la même méthode histologique faite dans le précédent chapitre. Les photos capturées sont de deux grossissements différents ( $\times 10$  et  $\times 40$ ), pour les reins nous avons pris en considération les deux zones du rein (le cortex et la médulla).

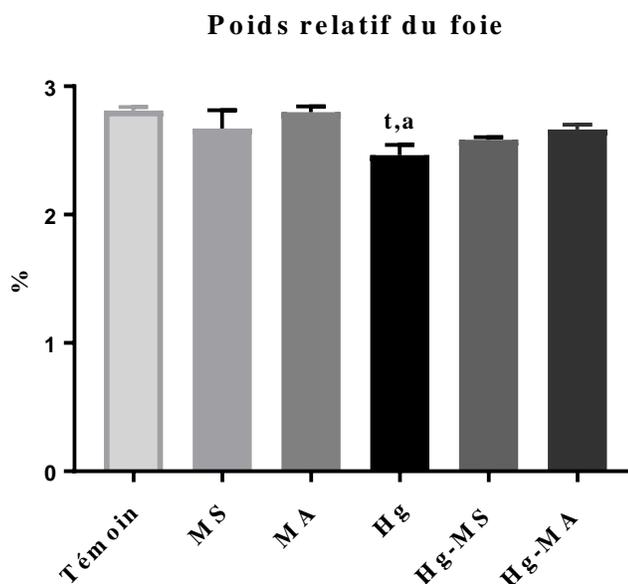
## **Partie 2 : Résultats**

### 1- Influence du traitement sur le poids relatif du foie et des reins :

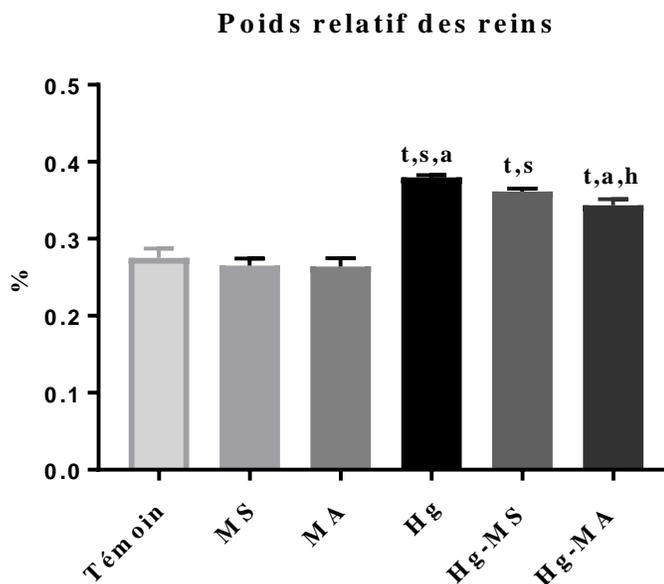
Le poids relatif du foie du groupe Hg a diminué de manière significative par rapport au groupe témoin et au groupe de miel amer (MA) (figure 33). Le poids relatif des reins a augmenté significativement chez les rats intoxiqués par le chlorure de mercure par rapport aux groupes témoins et témoins positif (figure 34).

**Tableau 17 :** Variation du poids relatif du foie et des reins chez les rats pendant 70 jours de traitement.

|               | Foie (%)                     | Rein (%)                           |
|---------------|------------------------------|------------------------------------|
| <b>Témoin</b> | 2,81 ± 0,01667               | 0,2754 ± 0,005259                  |
| <b>MS</b>     | 2,67 ± 0,08319               | 0,265 ± 0,004123                   |
| <b>MA</b>     | 2,798 ± 0,02232              | 0,2638 ± 0,0044                    |
| <b>Hg</b>     | 2,465 ± 0,055 <sup>t,a</sup> | 0,3797 ± 0,001856 <sup>t,s,a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 2,584 ± 0,0145               | 0,3615 ± 0,0025 <sup>t,s</sup>     |
| <b>Hg-MA</b>  | 2,663 ± 0,027                | 0,3437 ± 0,004485 <sup>t,a,h</sup> |



**Fig 33 :** Poids relatif du foie du rat (moyenne ± écart-type) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **a** : statistiquement différent Vs le groupe MA. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 34 :** Poids relatif des reins du rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

### 2- Influence du traitement sur le profil hépatique :

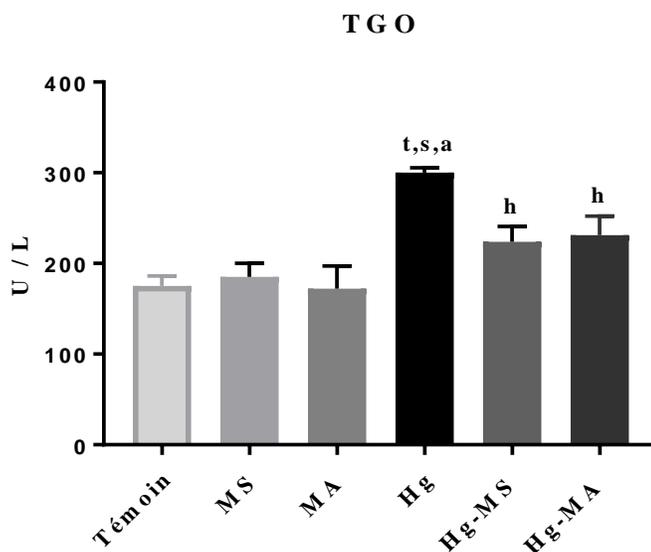
Les rats exposés au mercure ont montré une augmentation des transaminases (TGO, TGP), la phosphatase alcalines (PAL), lactate déshydrogénase (LDH) et de la bilirubine par rapport aux autres groupes (figures 35, 36, 37, 38 et 39). En revanche, le taux de la bilirubine directe est insignifiant en comparaison avec tous les groupes (figure 40). La supplémentation en MS et MA en tant que témoin positif a gardé le taux des enzymes sériques constant par rapport au groupe témoin. La co-administration de Hg-MS a montré une diminution significative du taux des enzymes sériques par rapport au groupe Hg. De plus, l'Hg-MA présente une diminution significative des précédents marqueurs par rapport au groupe Hg sauf pour le taux du LDH (figure 38).

Le taux des protéines totales (figure 41) et de l'albumine (figure 42) a connu une diminution significative chez les rats intoxiqués par le HgCl<sub>2</sub> comparativement aux rats témoins et aux rats traité par le miel sucré. Le taux des protéines totales a augmenté significativement dans les groupes de combinaison Hg-MS et Hg-MA par rapport au groupe Hg. Tant dit que le taux d'albumine a augmenté dans le groupe de Hg-MA par rapport au groupe témoin.

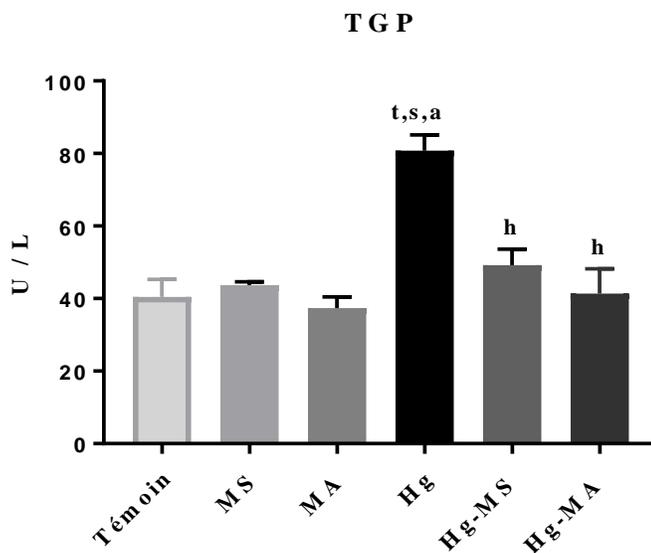
## Fonction Hépatique et Rénale : Résultats

**Tableau 18 :** Variations des enzymes sériques, de la bilirubine totale et directe, des protéines totales et de l'albumine chez les rats pendant 70 jours de traitement.

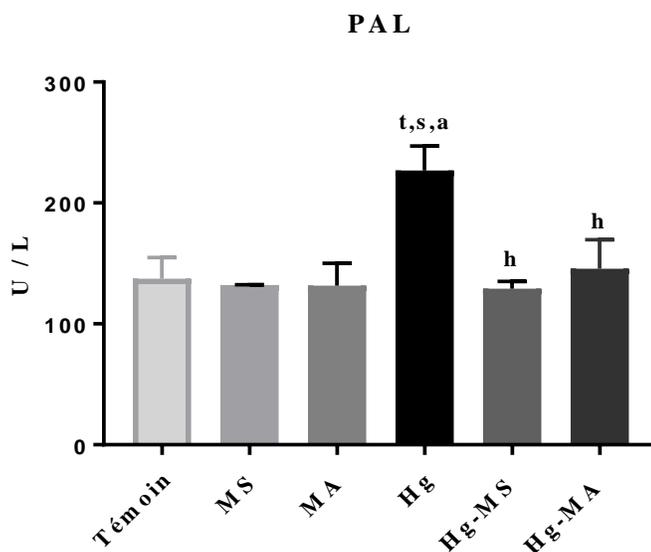
|               | <b>TGO (U/L)</b>                    | <b>TGO (U/L)</b>                     | <b>PAL (U/L)</b>                   | <b>LDH (U/L)</b>             |
|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| <b>Témoin</b> | 175 ± 8                             | 40,42 ± 3,42                         | 137,4 ± 12,4                       | 0,165 ± 0,015                |
| <b>MS</b>     | 185,2 ± 10,6                        | 43,73 ± 0,655                        | 132,1 ± 0,15                       | 0,14 ± 0,03                  |
| <b>MA</b>     | 172,3 ± 17,7                        | 37,35 ± 2,17                         | 131,6 ± 9,294                      | 0,205 ± 0,025                |
| <b>Hg</b>     | 300,2 ± 3,75 <sup>t,s,a</sup>       | 80,77 ± 3,065 <sup>t,s,a</sup>       | 226,9 ± 8,263 <sup>t,s,a</sup>     | 0,34 ± 0,03 <sup>t,s,a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 224 ± 12,05 <sup>h</sup>            | 49,21 ± 3,125 <sup>h</sup>           | 129,2 ± 4,25 <sup>h</sup>          | 0,19 ± 0,02082 <sup>h</sup>  |
| <b>Hg-MA</b>  | 231,2 ± 14,9 <sup>h</sup>           | 41,4 ± 4,84 <sup>h</sup>             | 145,6 ± 16,95 <sup>h</sup>         | 0,285 ± 0,005                |
|               | <b>Bilirubine<br/>Totale (mg/L)</b> | <b>Bilirubine<br/>directe (mg/L)</b> | <b>Protéines totales<br/>(g/L)</b> | <b>Albumine<br/>(g/L)</b>    |
| <b>Témoin</b> | 5,39 ± 0,1386                       | 0,5 ± 0,1                            | 100,7 ± 3,077                      | 38,25 ± 1,75                 |
| <b>MS</b>     | 4,505 ± 0,2742                      | 0,4333 ± 0,03333                     | 96,22 ± 7,085                      | 36,5 ± 0,866                 |
| <b>MA</b>     | 4,745 ± 0,1415                      | 0,4 ± 0,05774                        | 106,9 ± 4,285                      | 34,67 ± 0,6667               |
| <b>Hg</b>     | 5,605 ± 0,205 <sup>s</sup>          | 0,6 ± 0,1                            | 70,95 ± 1,547 <sup>t,s,a</sup>     | 30,5 ± 0,5 <sup>t,s</sup>    |
| <b>Hg-MS</b>  | 4,5 ± 0,1947 <sup>t,h</sup>         | 0,4 ± 0,1                            | 96,64 ± 2,455 <sup>h</sup>         | 33,25 ± 1,25                 |
| <b>Hg-MA</b>  | 4,64 ± 0,06351 <sup>h</sup>         | 0,3333 ± 0,06667                     | 102,7 ± 5,446 <sup>h</sup>         | 32,5 ± 0,5 <sup>t</sup>      |



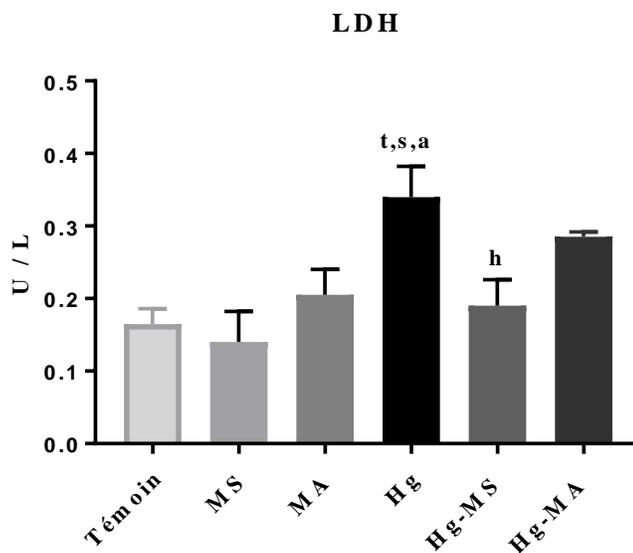
**Fig 35 :** Taux de la TGO chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



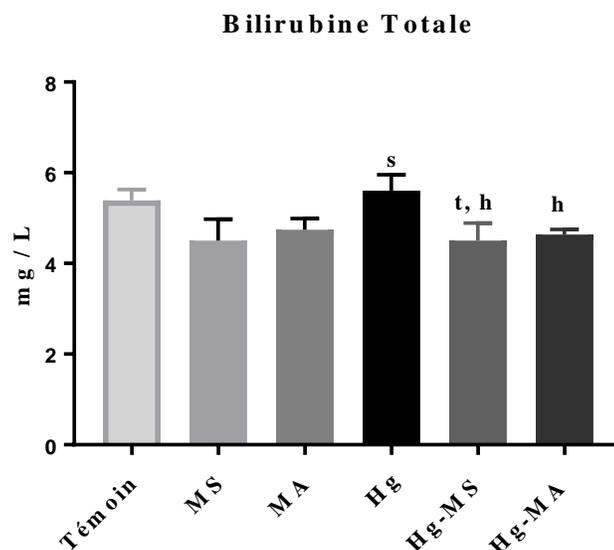
**Fig 36 :** Taux de la TGP chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



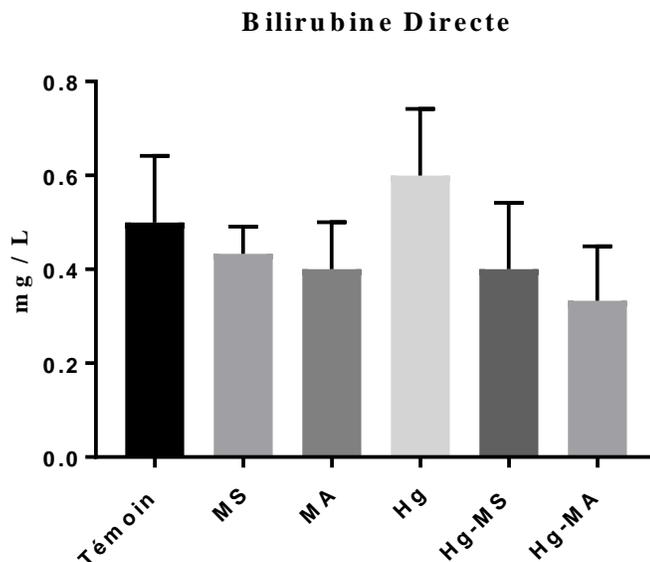
**Fig 37 :** Taux du PAL chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



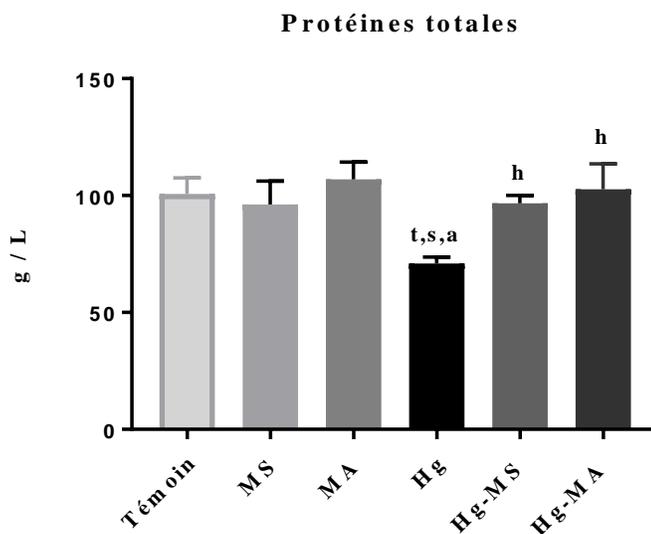
**Fig 38 :** Taux du LDH chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



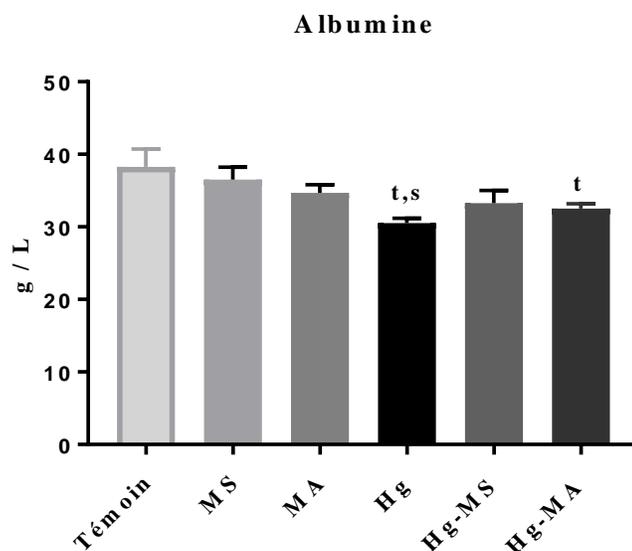
**Fig 39** : Taux de la bilirubine totale chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 40** : Taux de la bilirubine directe chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 41 :** Taux des protéines totales chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



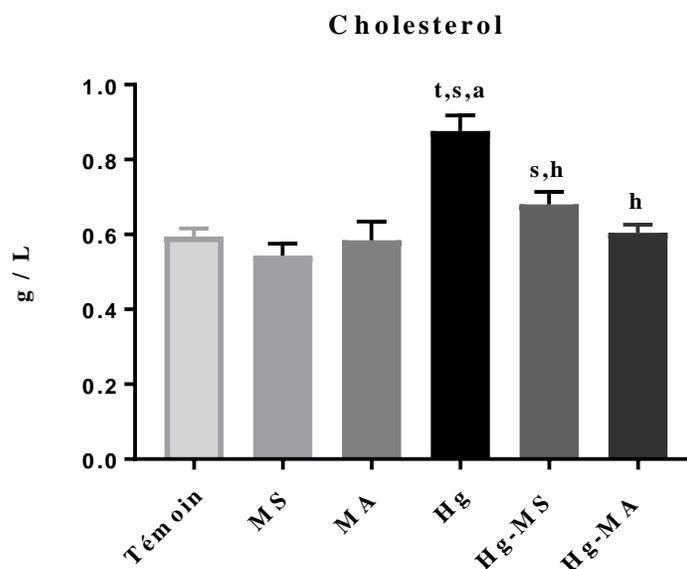
**Fig 42 :** Taux de l'albumine chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

### 3- Influence du traitement sur le profil lipidique :

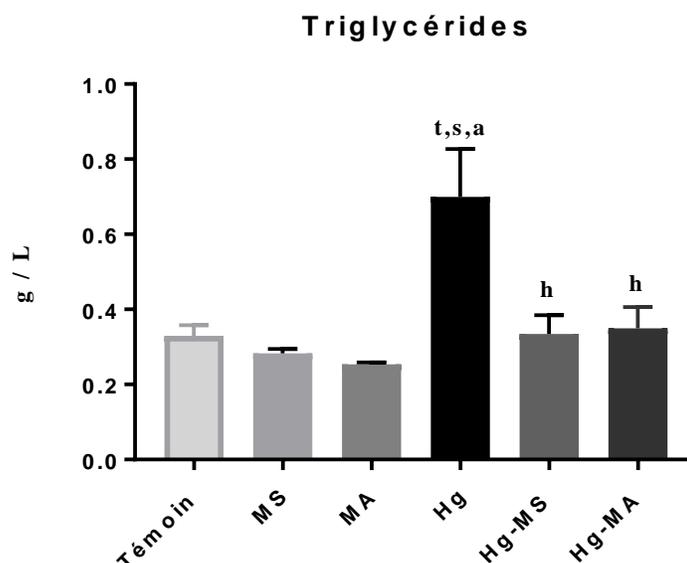
L'intoxication au mercure a montré une augmentation de la concentration du cholestérol et des triglycérides par rapport aux autres groupes (figures 43 et 44). La supplémentation en MS et MA en tant que témoins positifs n'a pas changé le taux du cholestérol et des triglycérides par rapport au groupe témoin. La co-administration de Hg-MS a montré une diminution significative de la concentration du cholestérol par rapport au groupe Hg et MS, et des triglycérides par rapport au groupe Hg uniquement. De plus, l'Hg-MA présente une diminution significative du cholestérol et des triglycérides par rapport au groupe Hg.

**Tableau 19** : Variations du cholestérol et des triglycérides chez les rats pendant 70 jours de traitement.

|               | Cholestérol (g/L)                 | Triglycérides (g/L)         |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <b>Témoin</b> | 0,595 ± 0,015                     | 0,33 ± 0,02                 |
| <b>MS</b>     | 0,5433 ± 0,01856                  | 0,2833 ± 0,006667           |
| <b>MA</b>     | 0,585 ± 0,035                     | 0,2533 ± 0,003333           |
| <b>Hg</b>     | 0,8767 ± 0,02404 <sup>t,s,a</sup> | 0,7 ± 0,09 <sup>t,s,a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 0,68 ± 0,01683 <sup>s,h</sup>     | 0,335 ± 0,035 <sup>h</sup>  |
| <b>Hg-MA</b>  | 0,605 ± 0,015 <sup>h</sup>        | 0,35 ± 0,04 <sup>h</sup>    |



**Fig 43** : taux du cholestérol chez le rat (Moyenne ± SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 44 :** Taux des triglycérides chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

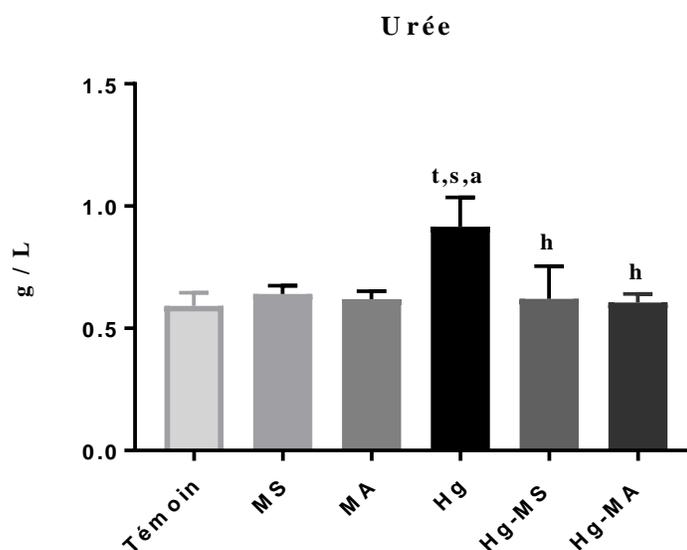
#### 4- Influence du traitement sur le profil rénal :

Les marqueurs rénaux du groupe Hg ont augmenté de manière significative par rapport aux autres groupes (figures 45, 46 et 47). En ce qui concerne les témoins positifs, les groupes supplémentés en MS et MA n'ont pas mentionné aucun changement de ces paramètres par rapport au groupe témoin.

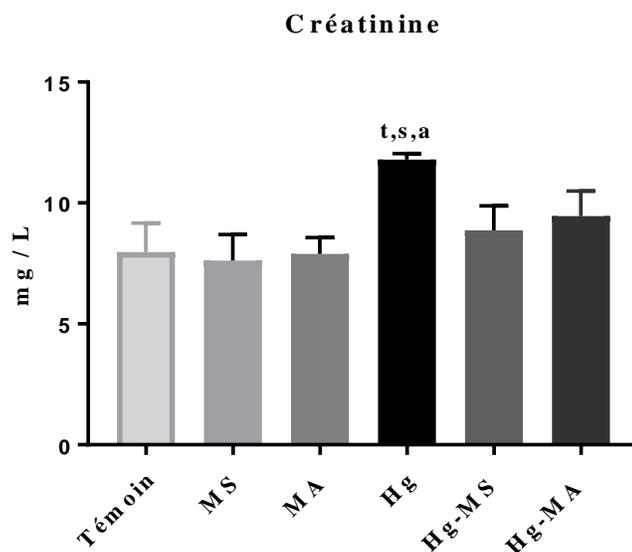
Pour les groupes Hg-MS et Hg-MA, l'acide urique a connu une augmentation significative par rapport aux groupes témoin, MS et MA. Tant dit que pour le groupe Hg, ils ont connu une diminution significative de l'urée pour les deux combinaisons et de l'acide urique pour le groupe Hg-MS uniquement.

**Tableau 20** : Variations des marqueurs rénaux chez les rats pendant 70 jours de traitement.

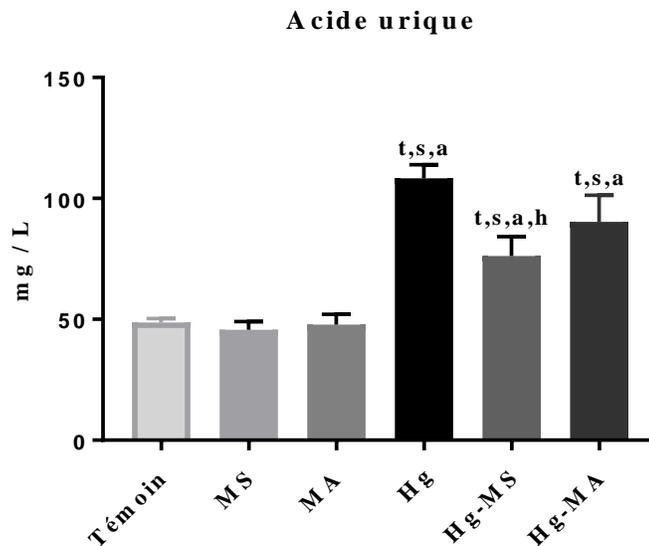
|               | Urée (g/L)                     | Créatinine (mg/L)             | Acide urique (mg/L)              |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <b>Témoin</b> | 0,592 ± 0,02417                | 7,97 ± 0,5992                 | 48,67 ± 1,13                     |
| <b>MS</b>     | 0,64 ± 0,02                    | 7,618 ± 0,5364                | 45,71 ± 2,355                    |
| <b>MA</b>     | 0,6188 ± 0,01156               | 7,893 ± 0,2763                | 47,82 ± 3                        |
| <b>Hg</b>     | 0,915 ± 0,085 <sup>t,s,a</sup> | 11,8 ± 0,175 <sup>t,s,a</sup> | 108,3 ± 2,503 <sup>t,s,a</sup>   |
| <b>Hg-MS</b>  | 0,62 ± 0,06721 <sup>h</sup>    | 8,865 ± 0,715                 | 76,17 ± 4,657 <sup>t,s,a,h</sup> |
| <b>Hg-MA</b>  | 0,605 ± 0,01432 <sup>h</sup>   | 9,45 ± 0,605                  | 90,34 ± 7,74 <sup>t,s,a</sup>    |



**Fig 45** : Taux de l'urée chez le rat (Moyenne ± SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel.  
**t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** :  
 statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure  
 inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA  
 ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 46 :** Taux de la créatinine chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



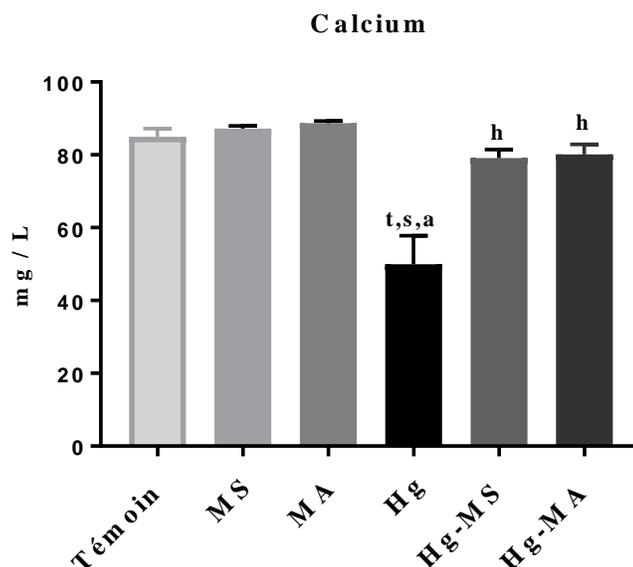
**Fig 47 :** Taux de l'acide urique chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

### 5- Influence du traitement sur les minéraux :

Le taux du calcium et du sodium a connu une diminution significative dans le groupe Hg (figures 48 et 49). En revanche, le taux du chlore et du potassium reste insignifiant (figure 50 et 51). La combinaison avec le MS et MA a montré une augmentation significative du calcium comparativement au groupe Hg. La supplémentation des miels seuls a apporté une légère augmentation mais de façons non significatives.

**Tableau 21 :** Variation du calcium, du sodium du chlore et du potassium chez les rats pendant 70 jours de traitement.

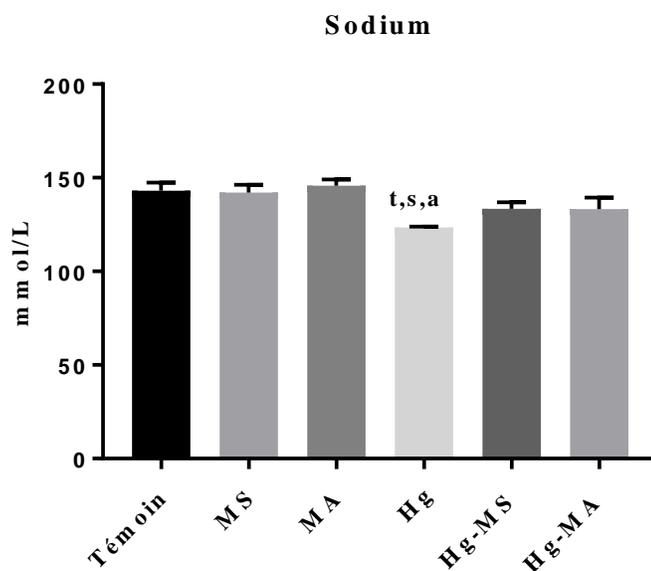
|               | Calcium (mg/L)                 | Sodium(mmol/L)               | Chlore (mmol/L) | Potassium (mmol/L) |
|---------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------------|
| <b>Témoin</b> | 84,97 ± 1,279                  | 143 ± 3,1                    | 98,35 ± 1,25    | 6,973 ± 0,292      |
| <b>MS</b>     | 87,17 ± 0,4378                 | 142,2 ± 2,95                 | 106,5 ± 2,829   | 6,485 ± 0,545      |
| <b>MA</b>     | 88,73 ± 0,3171                 | 145,8 ± 2,3                  | 106 ± 2,45      | 7,25 ± 0,2468      |
| <b>Hg</b>     | 49,98 ± 4,514 <sup>t,s,a</sup> | 123,4 ± 0,4 <sup>t,s,a</sup> | 112,6 ± 6,95    | 6,035 ± 1,035      |
| <b>Hg-MS</b>  | 79,1 ± 1,695 <sup>h</sup>      | 133,4 ± 1,964                | 108 ± 2,1       | 6,285 ± 0,685      |
| <b>Hg-MA</b>  | 80,13 ± 1,945 <sup>h</sup>     | 133,2 ± 3,103                | 107,9 ± 1,068   | 6,023 ± 0,1233     |



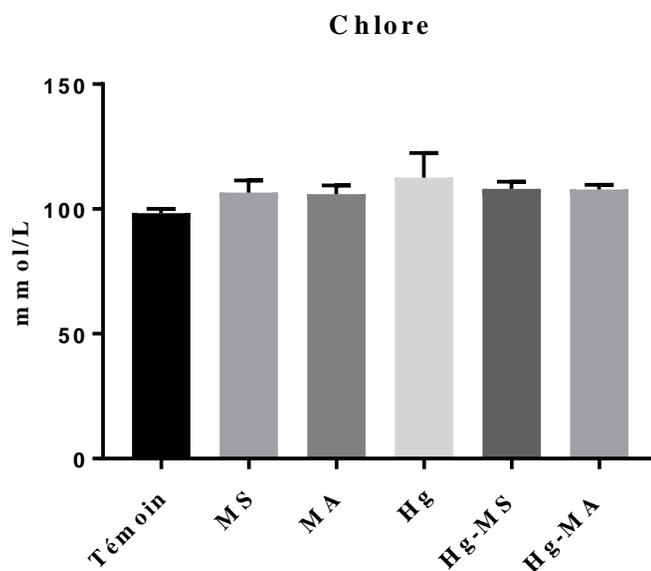
**Fig 48 :** Taux du calcium chez le rat (Moyenne ± SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure

## Fonction Hépatique et Rénale : Résultats

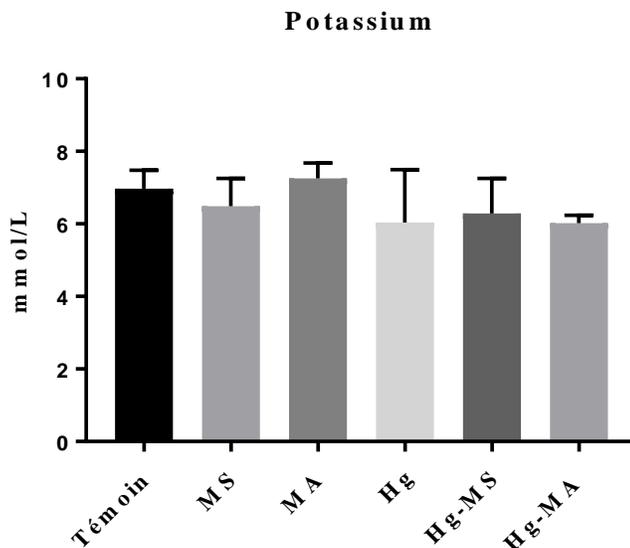
inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 49 :** Taux du sodium chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 50 :** Taux du chlore chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



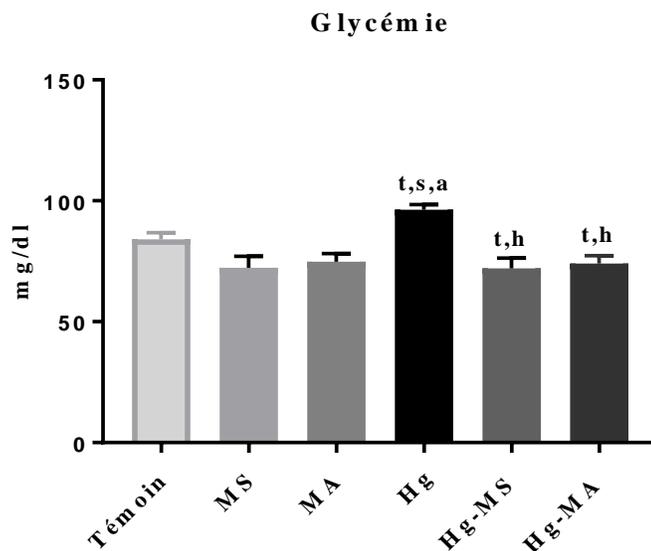
**Fig 51 :** Taux du potassium chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

### 6- Influence du traitement sur la glycémie :

La glycémie des rats traités par le mercure a augmenté de façon significative par rapport aux groupes témoin, MS et MA (figure 52). La supplémentation du MS et MA avec le mercure a montré une diminution significative par rapport aux rats témoins et aux rats exposé au Hg. Le taux de la glycémie dans les groupes Hg-MS et Hg-MA a diminué significativement comparativement au groupe témoin et Hg.

**Tableau 22 :** Variation de la glycémie chez les rats pendant 70 jours de traitement.

|               | Glycémie (mg/dL)                   |
|---------------|------------------------------------|
| <b>Témoin</b> | 84 $\pm$ 2                         |
| <b>MS</b>     | 72,33 $\pm$ 2,728                  |
| <b>MA</b>     | 74,75 $\pm$ 1,702                  |
| <b>Hg</b>     | 96,33 $\pm$ 1,202 <sup>t,s,a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 72 $\pm$ 2,517 <sup>t,h</sup>      |
| <b>Hg-MA</b>  | 74 $\pm$ 1,483 <sup>t,h</sup>      |



**Fig 52 :** Taux de la glycémie chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-SH ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

### 7- Influence du traitement sur les marqueurs du stress oxydatif :

L'activité de la CAT hépatique et rénale (Figure 53) a été réduite après 70 jours de traitement par le Hg par rapport aux trois groupes de témoin. Les groupes combiné (Hg-MS) et (Hg-MA) a montré une augmentation de l'activité de la CAT par rapport au groupe Hg et témoin.

Une diminution remarquable de l'activité GPx du foie et des reins a été notée dans le groupe Hg, bien que la combinaison Hg-MS et Hg-MA a augmenté l'activité enzymatique par rapport au groupe exposé au Hg et témoin (Figures 54).

Le niveau de GSH (figures 55) dans le groupe Hg a diminué de manière significative par rapport à tous les groupes de contrôle, mais son activité a augmenté de manière significative dans les groupes Hg-MS et Hg-MA par rapport au groupe Hg.

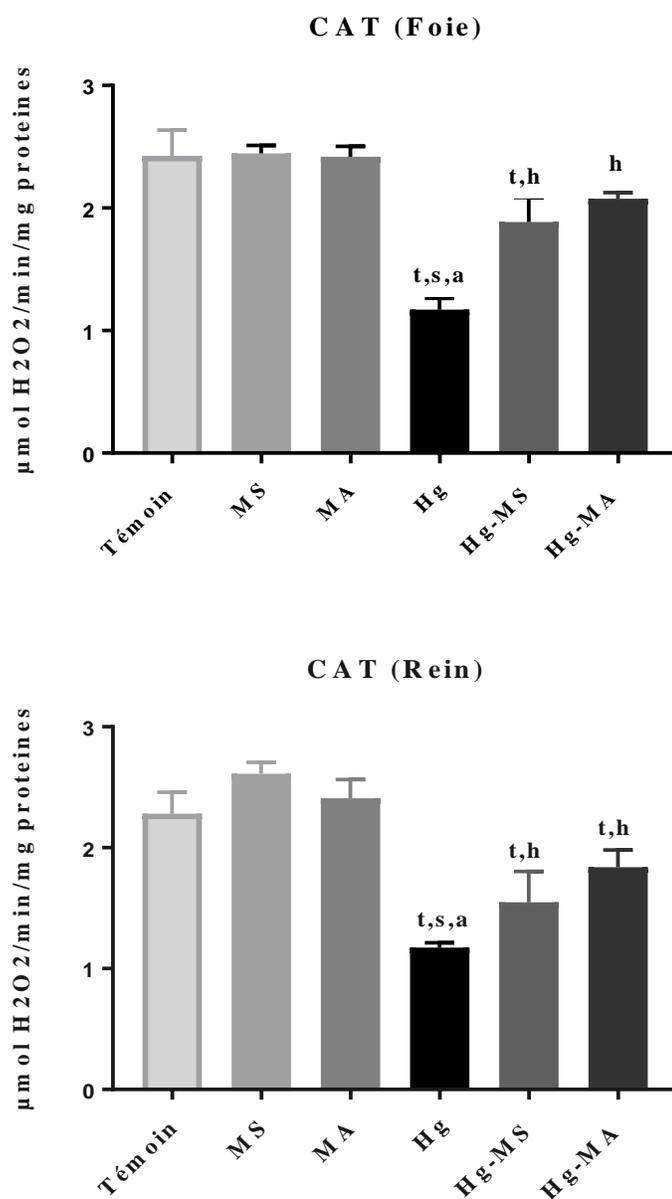
Les résultats de la figure 56 indiquent une augmentation significative de la concentration hépatique et rénal du MDA dans le groupe Hg par rapport au groupe témoin, au groupe MS et au groupe traité au MA. La concentration de la GPx dans le foie et les reins était

## Fonction Hépatique et Rénale : Résultats

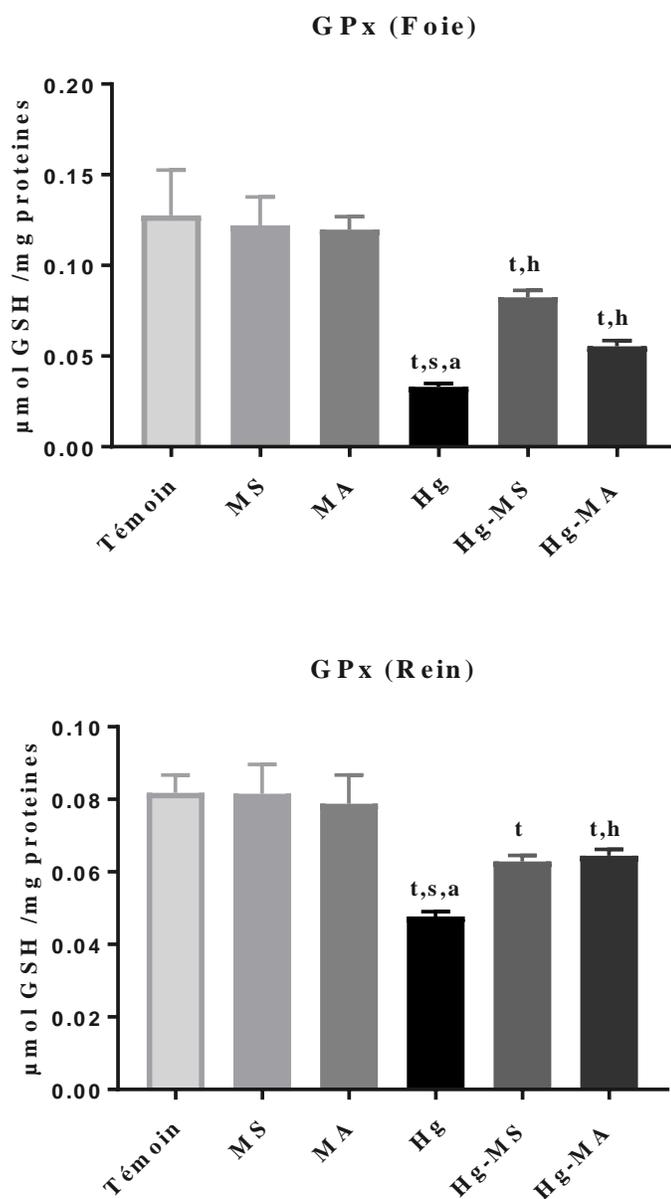
significativement plus faible dans le traitement combiné Hg-MS et Hg-MA que chez les rats intoxiqués par le Hg.

**Tableau 23 :** Variation des marqueurs du stress oxydatif chez les rats pendant 70 jours de traitement.

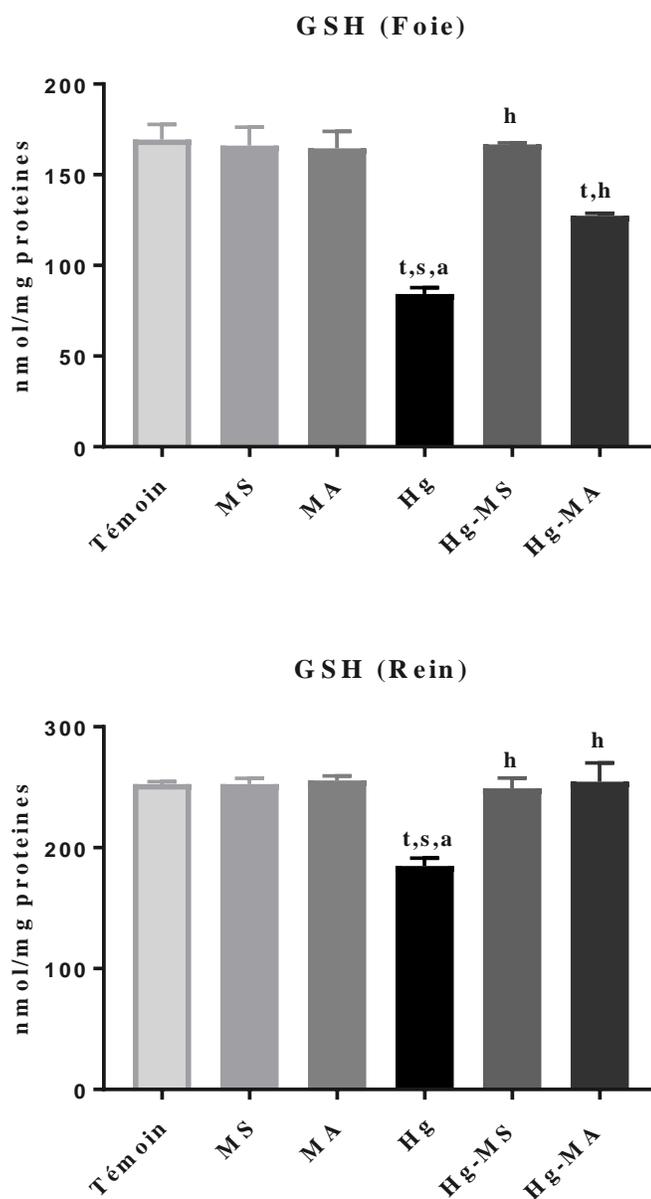
|               | CAT (foie)                      | CAT (rein)                       | GPx (foie)                         | GPx (rein)                          |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Témoin</b> | 2.426 ± 0.1476                  | 2.281 ± 0.1025                   | 0.1275 ± 0.01256                   | 0.08177 ± 0.002017                  |
| <b>MS</b>     | 2.447 ± 0.03727                 | 2.612 ± 0.04767                  | 0.1221 ± 0.01107                   | 0.08157 ± 0.003594                  |
| <b>MA</b>     | 2.418 ± 0.0603                  | 2.408 ± 0.07756                  | 0.1198 ± 0.004105                  | 0.07876 ± 0.005621                  |
| <b>Hg</b>     | 1.17 ± 0.06611 <sup>t,s,a</sup> | 1.174 ± 0.02037 <sup>t,s,a</sup> | 0.0331 ± 0.001007 <sup>t,s,a</sup> | 0.04773 ± 0.000650 <sup>t,s,a</sup> |
| <b>Hg-MS</b>  | 1.887 ± 0.1149 <sup>t,h</sup>   | 1.548 ± 0.1276 <sup>t,h</sup>    | 0.08234 ± 0.002238 <sup>t,h</sup>  | 0.06286 ± 0.001205 <sup>t</sup>     |
| <b>Hg-MA</b>  | 2.076 ± 0.03598 <sup>h</sup>    | 1.84 ± 0.08153 <sup>t,h</sup>    | 0.05534 ± 0.001476 <sup>t,h</sup>  | 0.06442 ± 0.001274 <sup>t,h</sup>   |
|               | GSH (foie)                      | GSH (rein)                       | MDA (foie)                         | MDA (rein)                          |
| <b>Témoin</b> | 169.4 ± 4.19                    | 252.7 ± 1.29                     | 0.8926 ± 0.04231                   | 0.4196 ± 0.0857                     |
| <b>MS</b>     | 166.1 ± 4.535                   | 252.7 ± 2.374                    | 0.9892 ± 0.008679                  | 0.4728 ± 0.004339                   |
| <b>MA</b>     | 164.6 ± 4.619                   | 255.6 ± 2.219                    | 0.8514 ± 0.03797                   | 0.5335 ± 0.00217                    |
| <b>Hg</b>     | 84.3 ± 1.513 <sup>t,s,a</sup>   | 184.8 ± 4.686 <sup>t,s,a</sup>   | 1.126 ± 0.01085 <sup>t,a</sup>     | 1.129 ± 0.003254 <sup>t,s,a</sup>   |
| <b>Hg-MS</b>  | 166.7 ± 0.6085 <sup>h</sup>     | 249 ± 5.012 <sup>h</sup>         | 0.846 ± 0.04556 <sup>h</sup>       | 0.4912 ± 0.01627 <sup>h</sup>       |
| <b>Hg-MA</b>  | 127.4 ± 0.798 <sup>t,h</sup>    | 254.6 ± 10.99 <sup>h</sup>       | 0.7505 ± 0.02821 <sup>h</sup>      | 0.501 ± 0.09764 <sup>h</sup>        |



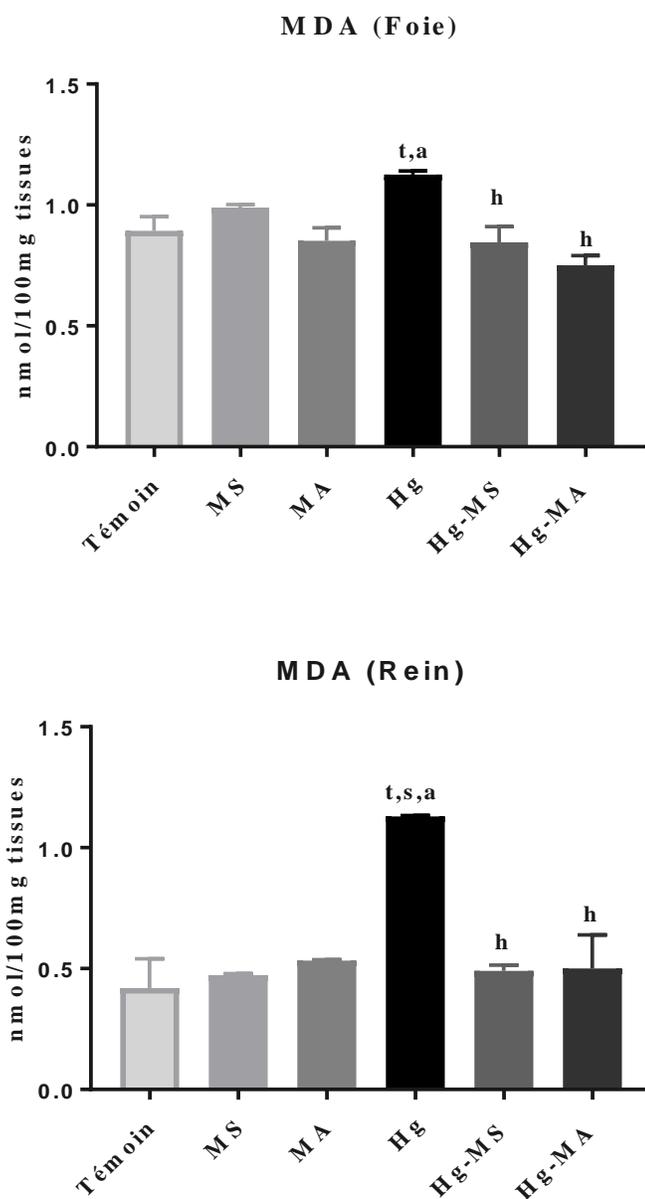
**Fig 53 :** Le niveau de l'activité de la CAT hépatique et rénal chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 54 :** Le niveau du GPx hépatique et rénal chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 55** : Le niveau du GSH hépatique et rénal chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.



**Fig 56 :** Le niveau du MDA hépatique et rénal chez le rat (Moyenne  $\pm$  SD) après 70 jours de traitement au mercure et au miel. **t** : statistiquement différent Vs le témoin. **s** : statistiquement différent Vs groupe MS. **a** : statistiquement différent Vs groupe MA. **h** : statistiquement différent Vs groupe Hg. Hg : mercure inorganique ; MS : miel sucré ; MA : miel amer ; Hg-MS ; mercure inorganique + miel sucré ; Hg-MA ; mercure inorganique + miel amer.

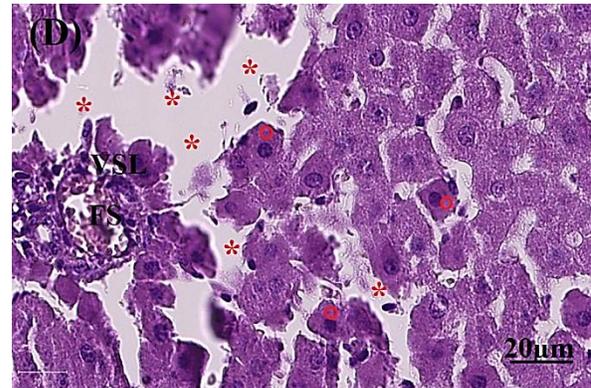
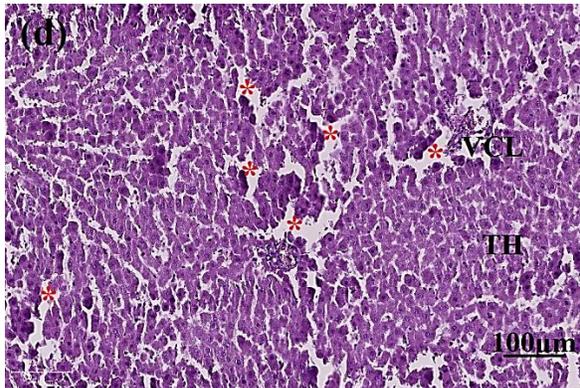
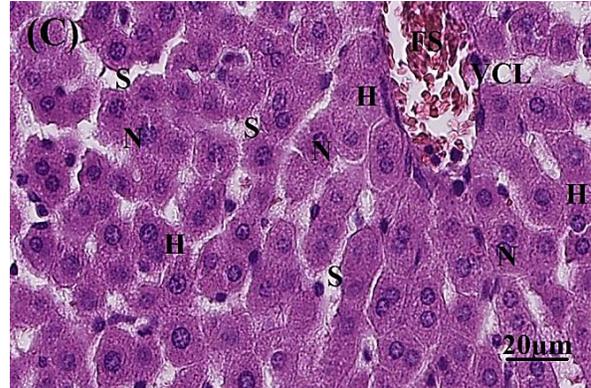
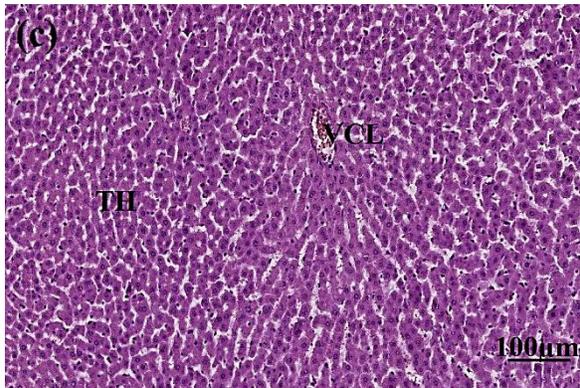
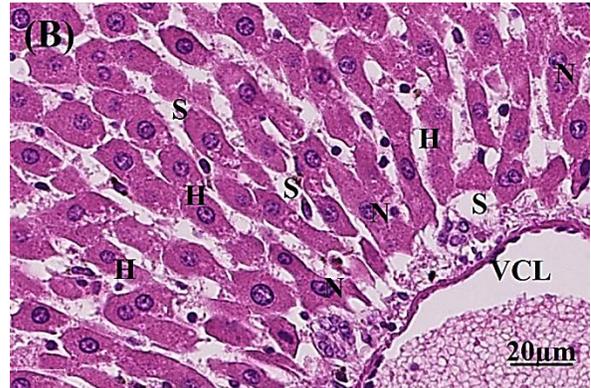
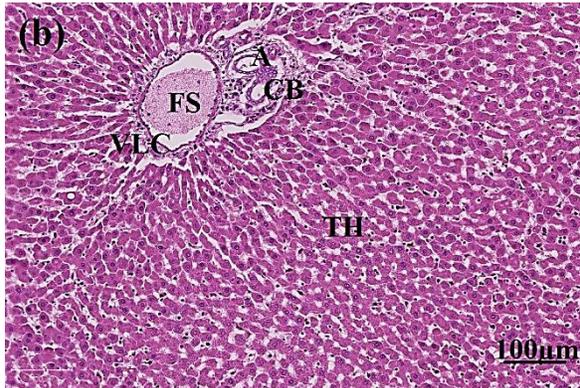
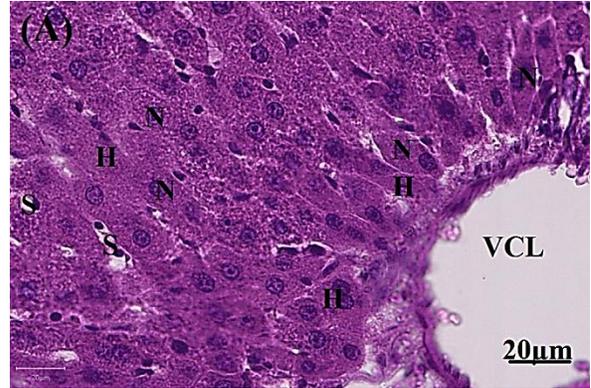
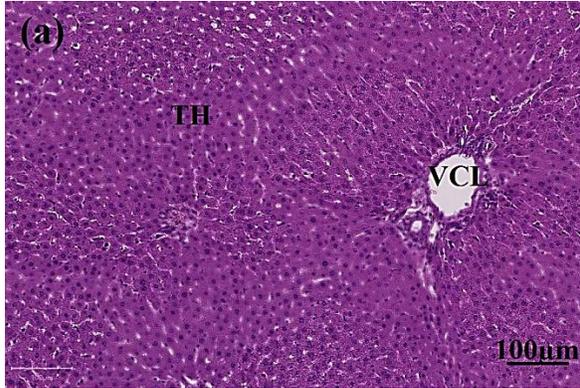
### 8- Influence du traitement sur l'architecture des tissus hépatiques et rénaux :

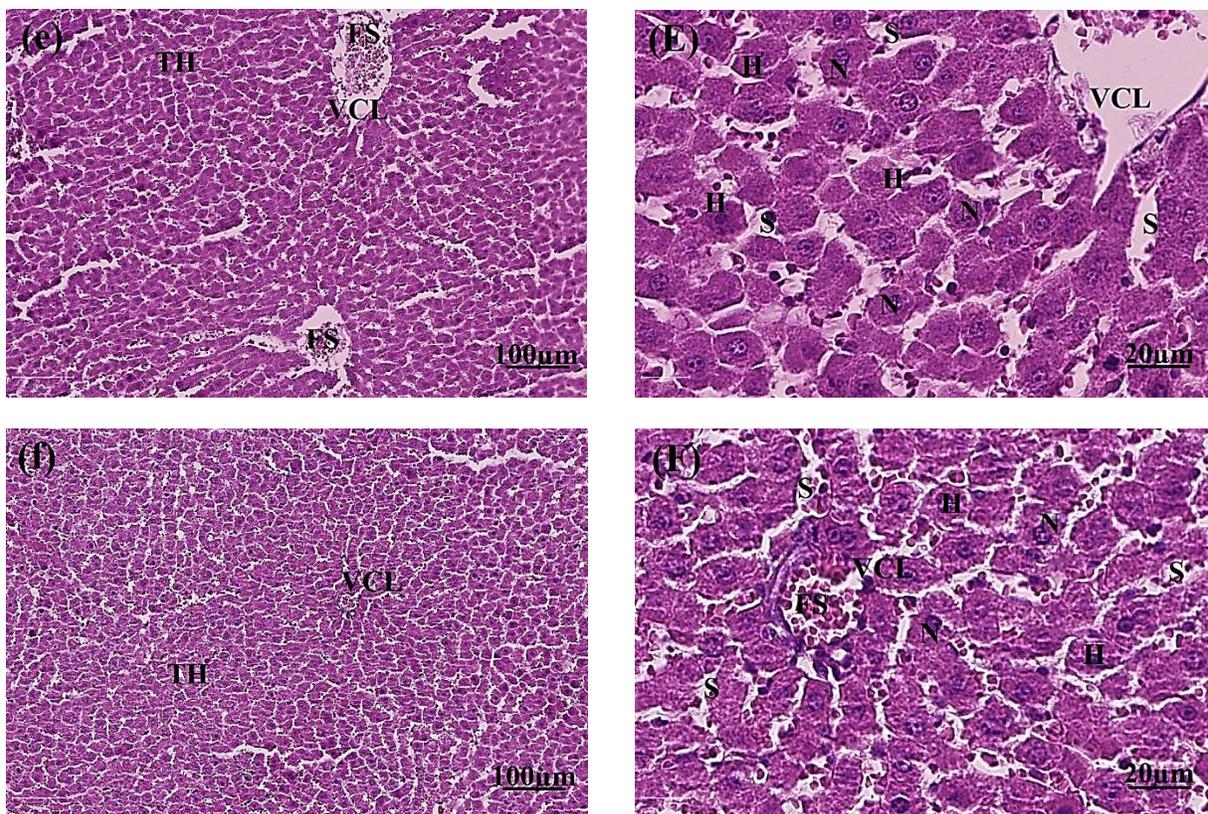
#### Le foie :

Les microphotographies des sections hépatiques des différents groupes de rats après 70 jours d'essai sont présentées sur (Figure 57). L'histologie du témoin a montré que le parenchyme hépatique est fait d'hépatocytes réguliers à disposition trabéculaire qui se concentrent de façon radiaire vers la veine Centro lobulaire (Gr x10). Les hépatocytes polyédriques à cytoplasme granulaire éosinophile et aux noyaux arrondis réguliers parfois nucléolès (Gr x40). Dans les groupes MS et MA ont montré au faible grossissement, un discret œdème interstitiel. Le groupe MS a présenté au fort grossissement, un œdème inter-hépatocytaire avec vacuolisation focale des hépatocytes. Ailleurs, les hépatocytes sont réguliers dans les groupes MS et MA.

Cependant, le tissu hépatique après une exposition chronique au  $\text{HgCl}_2$  à faible grossissement a montré un important œdème interstitiel avec dilatation sinusoidale. A fort grossissement, on a remarqué une infiltration minime par des cellules inflammatoires mononuclées type lymphocytaire ainsi qu'une ballonnisation des hépatocytes ou bien nécrose hépatocytaire avec rétraction du cytoplasme et condensation chromatienne des noyaux.

Après administration de  $\text{HgCl}_2$  avec du miel sucré et amer, les résultats ont montré, à faible grossissement, une réduction minime des signes histologiques dans le groupe Hg-MS par contre une diminution de signe oedemato-inflamatoires dans le groupe Hg-MA. Au fort grossissement, une régénération presque complète des hépatocytes : cellules polyédriques à cytoplasme abondant et aux noyaux arrondies légèrement atypiques dans le groupe Hg-MA.





**Fig 57:** Caractéristiques du foie du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a), le groupe MS (b), le groupe MA (c), le groupe HgCl<sub>2</sub> (d), le groupe Hg-MS (e) et le groupe Hg-MA (f). Coloration H&E avec un grossissement de  $\times 100$  (à gauche) et  $\times 400$  (à droite). Les barres représentent 100 $\mu\text{m}$  et 20 $\mu\text{m}$ .

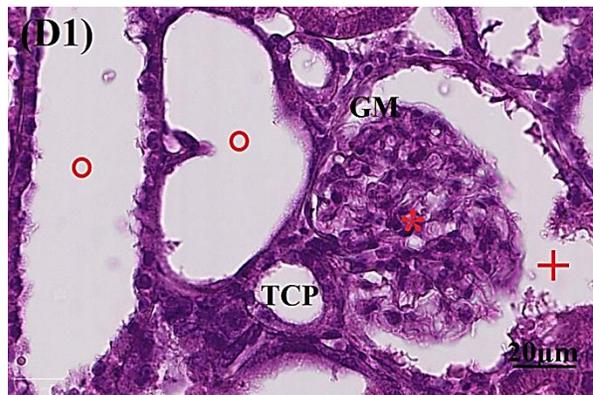
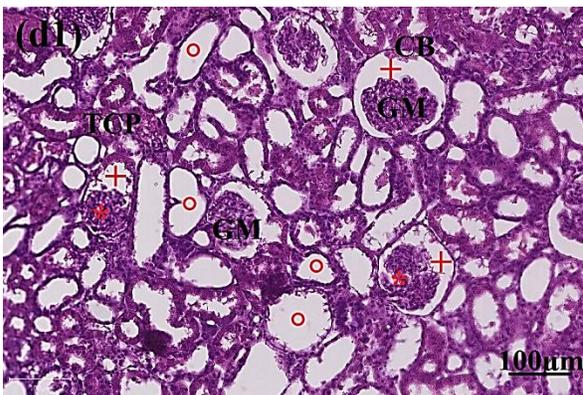
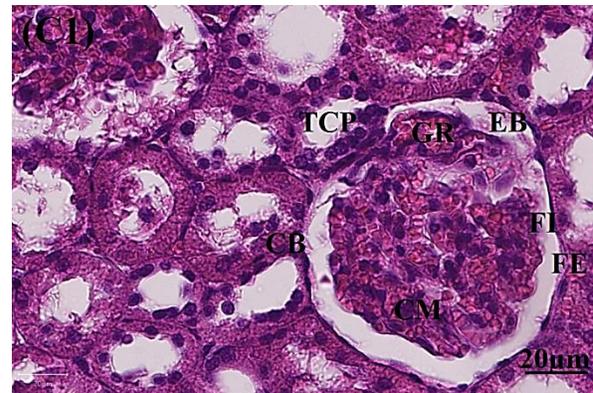
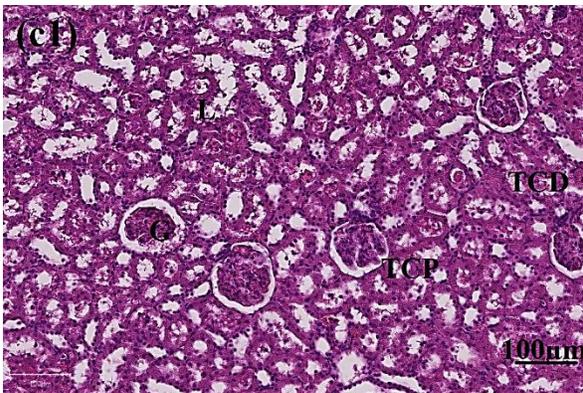
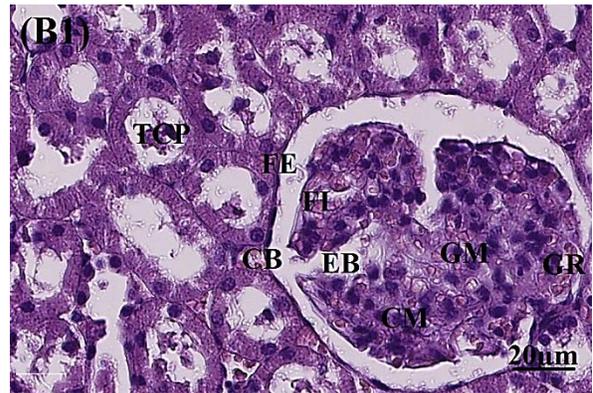
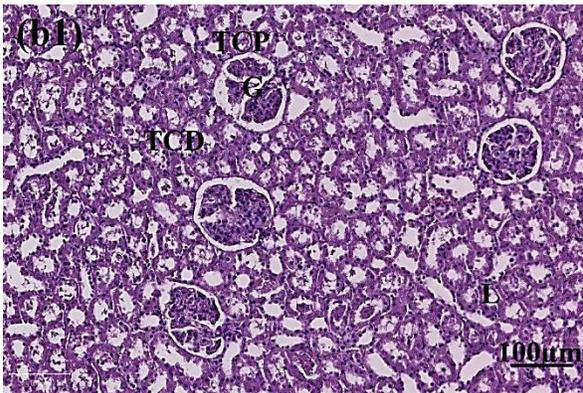
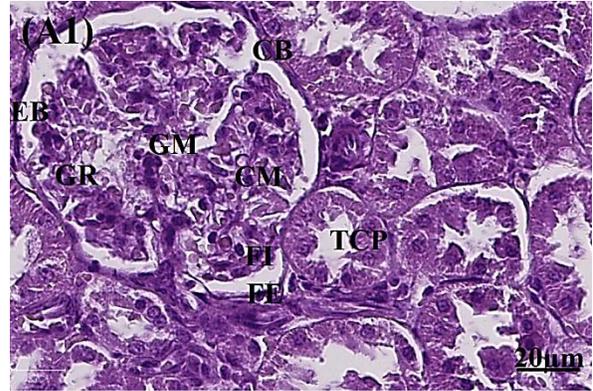
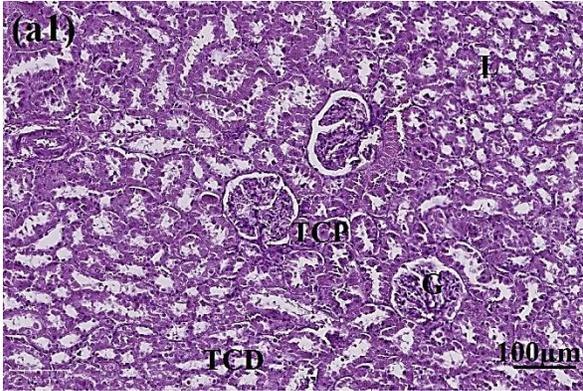
**VCL :** veine centrolobulaire, **TH :** travée hépatique, **FS :** flux sanguin, **N :** noyau, **H :** hépatocyte, **S :** sinusoïde, **A :** artère hépatique, **CB :** canal biliaire. (\*) : œdème interstitiel avec dilatation sinusoidale, (°) : nécrose hépatique.

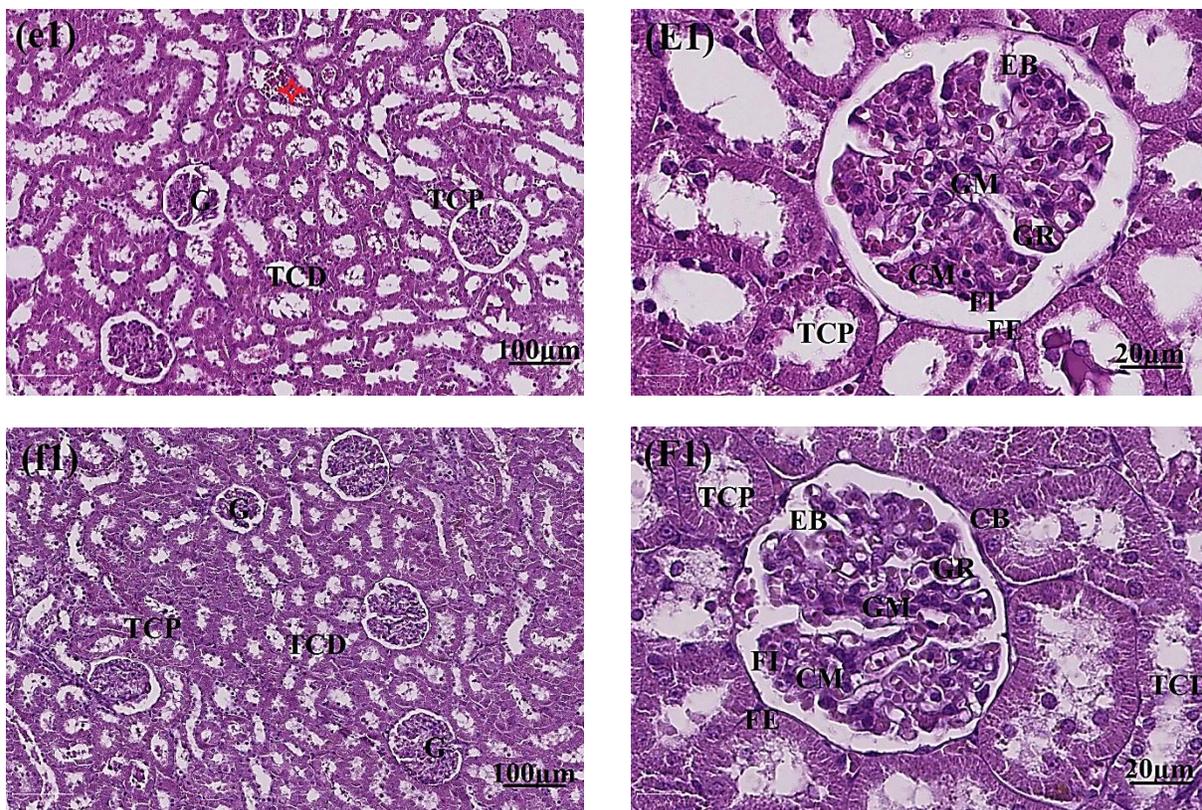
### Les reins :

Les microphotographies des sections rénales des différents groupes de rats après 70 jours d'essai sont présentées sur (Figure 58 et 59). L'histologie de la zone corticale du témoin a montré que les glomérules rénaux situés au centre de la photographie, sont entourés par des tubes contournés proximaux et quelques tubes proximaux distaux au faible et fort grossissement. En outre, la zone médullaire est faite essentiellement de tubes collecteurs normaux séparés par un tissu fibreux. Les groupes MS et MA ont montré au faible et fort grossissement, que la zone corticale présente un parenchyme rénal fait de glomérules d'aspect normal avec des tubes proximaux normaux et que ces tubes sont bordés par un épithélium cubique normal. Les glomérules sont entourés par la capsule de Bowman. Et comblés par un peloton capillaire normal. La zone médullaire recouvre tubes collecteurs normaux.

Cependant, le tissu rénal après une exposition chronique au  $\text{HgCl}_2$  à faible grossissement a montré une atrophie glomérulaire modérée avec une dilatation de la chambre urinaire dans la zone corticale. A fort grossissement, on a noté une dilatation des tubes contournés qui sont bordés d'un épithélium aplati fait de cellules à noyaux pycnotique et à cytoplasme rétracté. La zone médullaire présente des tubes collecteurs de taille variable parfois dilaté et à contenu hémorragique. Ses derniers sont séparés par un tissu fibro-inflamatoire d'abondance minime.

Après administration de  $\text{HgCl}_2$  avec du miel sucré et amer, les résultats ont montré, à faible grossissement, que la zone corticale présente des tubes proximaux et glomérules de taille conservé à part une discrète hémorragie de quelques tubes. Au fort grossissement, on a observé une régénéscence minime de cellules tubulaires. Dans la zone médullaire, les tubes collecteurs normaux sont entourés par un tissu œdémateux.



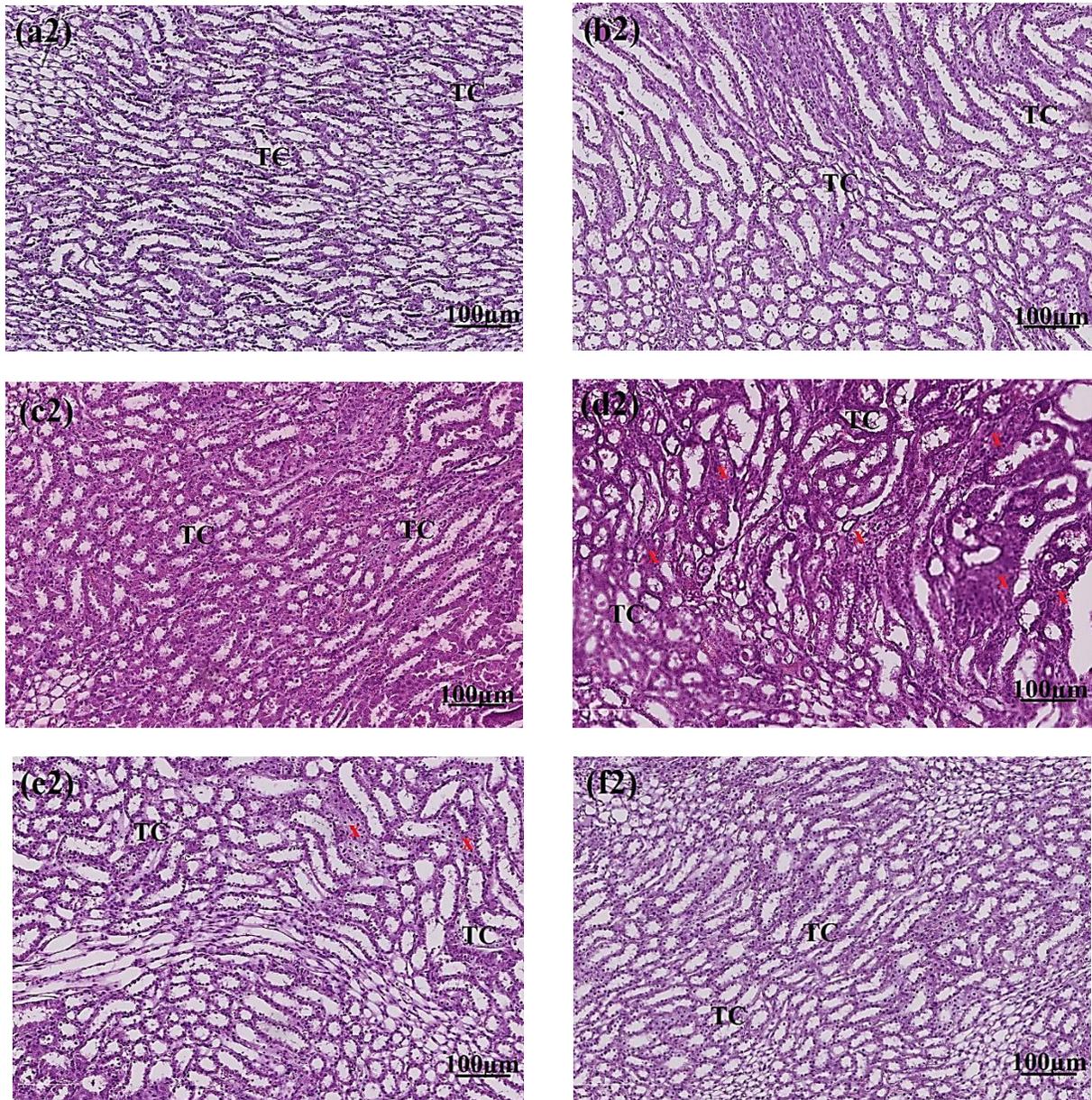


**Fig 58 :** Caractéristiques de la zone corticale des reins du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a1), le groupe MS (b1), le groupe MA (c1), le groupe HgCl<sub>2</sub> (d1), le groupe Hg-MS (e1) et le groupe Hg-MA (f1). Coloration H&E avec un grossissement de × 100 (à gauche) et ×400 (à droite).

Les barres représentent 100µm et 20µm.

**G :** glomérule, **TCP :** tubes contournés proximaux, **TCD :** tubes contournés distaux, **L :** labyrinthe, **GM :** glomérule de Malpighi, **CB :** capsule de Bowman, **EB :** espace de Bowman, **FI :** feuillet interne de Bowman, **FE :** feuillet externe de Bowman, **CM :** cellule Mésangiale, **GR :** globule rouge, **(\*) :** atrophie des glomérules, **(+)** : dilatation de la chambre urinaire, **(°)** : dilatation des tubes contournés,

**(↗)** : discrète hémorragie.



**Fig 5:** Caractéristiques de la zone médullaire des reins du rat au microscope optique dans le groupe témoin (a2), le groupe MS (b2), le groupe MA (c2), le groupe HgCl<sub>2</sub> (d2), le groupe Hg-MS (e2) et le groupe Hg-MA (f2). Coloration H&E avec un grossissement de  $\times 100$ . Les barres représentent 100µm.

TC : tubes collecteurs, (x) : tissu fibro-inflammatoire.

## **Partie 3 : Discussion**

**Le poids corporel** est utilisé comme indicateur de l'état de santé général du rat, ainsi que les changements du poids des organes qui sont importants pour l'évaluation de leurs toxicité (**Uzunhisarcikli et al., 2016**). Les résultats obtenus après 70 jours d'exposition continue des rats au mercure inorganique ont indiqué une diminution du poids corporel total et du poids relatif du foie et une augmentation du poids relatif des reins. Auparavant, une diminution du poids corporel des rats a été enregistré après une administration du Hg (**Peixoto et al., 2008 ; Majelsi et al., 2017**). D'autres parts, les rats ayant pris du HgCl<sub>2</sub> par gavage ont présenté un gain de poids corporel significativement plus faible que les témoins (**Mahboob et al., 2001 ; Uzunhisarcikli et al., 2016**). La perte de poids est connue pour être l'aspect fondamental de la toxicité du Hg qui peut être attribuée soit à la réduction de la consommation alimentaire des animaux (**Jaiswal et al., 2013**), soit par un catabolisme accru des protéines (**Abdel-Salam et al., 2010**).

La diminution du poids relatif du **foie** dans notre étude, n'a pas encore trouvé une similarité dans la littérature scientifique. Dans une étude de **Hazlhoff & Torres, (2018)**, le rapport entre le poids du foie et le poids du corps n'ont pas été affectés par l'administration du HgCl<sub>2</sub>, comme dans le cas d'autres études (**Abarikwu, et al., 2016 ; Liu et al., 2016**). En revanche, **Institóris et al., (2001)** ont rapporté une augmentation significative du poids relatif du foie des rats après exposition au HgCl<sub>2</sub>. **Uzunhisarcikli et al., (2016)** traduit l'augmentation du poids hépatique par un mécanisme d'adaptation de l'organisme pour combattre la toxicité systémique et que la biochimie du sérum et les résultats histopathologiques sont l'indicateur de l'état fonctionnel du foie. Une augmentation du poids relatif des **reins** a été noté également dans l'étude de **Peixoto et al., (2008)**. **Institóris et al., (2001) et Abarikwu et al., (2016)** ont notés un déficit du poids rénal après une intoxication au HgCl<sub>2</sub> chez le rat. On pense que la position anatomique du rein influence la toxicocinétique des produits chimiques qui lui sont délivrés par la circulation systémique et peut prédisposer le rein aux effets toxiques du Hg plus que le foie (**Abarikwu, 2014**). L'augmentation du poids relatif observés, peut confirmer la sensibilité du rein aux effets toxiques du Hg (**Jin et al., 2009**). Ainsi que, la voie d'administration (intra péritonéale, gavage...ect) et d'absorption, la dose et la période d'exposition peuvent influencer le poids des organes suite à une exposition.

**Les témoins positifs du miel** n'ont entraîné aucun changement notable que ce soit une prise ou une perte de poids significative. Ce résultat est presque similaire à celui de **Sahhugi et al., (2014)** et qui a justifié ce changement par la quantité de calories ingérée suite à la supplémentation en miel de Gelam chez les rats jeunes ou âgé pendant 8 mois. Ceci a été confirmé par **Chepulis, (2007)** qui a rapporté que la supplémentation en miel n'a pas augmenté le poids corporel des jeunes rats et des rats âgés (**Sahhugi et al., 2014**). Le miel peut également empêcher la prise de poids en aidant à maintenir le poids corporel actuel lors d'une étude réalisée par **Samat et al., (2017)**, sur des rats obèses traité par le miel de Gelam et miel d'Acacia. Le miel de trèfle des USA a également été signalé comme capable de réduire la

prise de poids excessive et a montré une antihyperlipidémie in vivo (**Nemoseck et al., 2011**). **Romero-Silva et al., (2011)** ont révélé que des rats nourris avec un régime alimentaire contenant du miel présentait une réduction significative de la taille des adipocytes après deux mois de traitement, par rapport aux rats nourris au sucre, ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle le miel possède des propriétés amaigrissantes. L'apport du miel de jujubier (Sidr) pendant 4 semaines a montré une amélioration du poids du foie et des reins (**EI-Denshary et al., 2012**), ce qui peut être attribué soit à la teneur en nutriments du miel, soit à l'augmentation de la synthèse globale des protéines (**Tanvir et al., 2015**).

**Les aminotransférases** étant une importante classe d'enzymes reliant le métabolisme des glucides et des acides aminés (**Sridhar et al., 2013**). Les deux enzymes sont considérées comme des marqueurs des lésions hépatiques puisque le foie est le principal site du métabolisme (**Liss et al., 1985**). Dans cette étude, nous avons constaté une augmentation significative des transaminases **TGP** et **TGO** chez les rats traités par le chlorure de mercure. Le même résultat est confirmé par **Joshi et al., (2012)** ; **Necib et al., (2013)** ; **Siouda & Abdennour, (2015)** ; **Liu et al., (2016)** ; **Elblehi et al., (2019)**. Le foie est considéré comme un deuxième dépôt cible pour le mercure en termes de quantité totale, indépendamment des voies d'administration (**Said et al., 2008**). L'augmentation des activités enzymatiques peut être expliqué par un dysfonctionnement du foie lié à un dommage oxydatif des tissus induit par le mercure avec une nécrose hépatocellulaire en provoquant une augmentation de perméabilité de la membrane cellulaire entraînant la fuite de ces enzymes cytosoliques du foie dans le flux sanguin (**Jagadeesan & Sankarsami Pillai, 2007** ; **Uzunhisarcikli et al., 2016**). Ça peut être la cause de l'accumulation de Hg dans les tissus hépatiques et à la perturbation de la biosynthèse de ces enzymes due au blocage des sites actifs en raison de la toxicité (**Ansar & Igbal, 2016** ; **Caglayan et al., 2019**). Il a été rapporté que les niveaux de TGP plasmatique augmentent aux premiers stades de la lésion hépatocellulaire et que les niveaux de TGP diminuent dans la mesure où la fibrose progresse (**Kim et al., 2008**).

**La phosphatase alcaline (PAL)** est une enzyme localisée à la membrane plasmique et liée au transport de divers métabolites ; elle est également vulnérable à l'action mercurielle organique et inorganique (**Lakshmi et al., 1991**). Nos résultats montrent une augmentation significative de la phosphatase alcaline chez les rats exposés à l' $\text{HgCl}_2$ . Des études antérieures ont indiqué que l'intoxication au Hg avait entraîné une élévation significative de cette enzyme sérique (**Bando et al., 2005** ; **Jagadeesan & Sankarsami Pillai, 2007** ; **Uzunhisarcikli et al., 2016**). En revanche, **Agarwal et al., (2010)**, a obtenu une diminution de la PAL chez les rats exposé au mercure. Selon **Haouem et al., (2013)**, l'exposition des rats au mercure a conduit à une diminution d l'activité du PAL ce qui est en désaccord avec nos résultats où il a noté que cette diminution est peut-être due à des perturbations dans l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de l'enzyme. Selon **Ravichandra et al., (2013)**, la synthèse de la PAL dépend de la libération des TGP et TGO en raison des lésions du parenchyme hépatique causées par la toxicité du foie. La raison de l'augmentation de la PAL pourrait être due au fait que le

dommage oxydatif a fait perturber la perméabilité membranaire causant ainsi une fuite des molécules de l'enzyme vers le plasma. Il a été noté que les perturbations de transport cellulaire se produit lorsque la concentration des ROS ( $O_2$ ,  $H_2O_2$  et  $OH$ ) dépasse la capacité antioxydante de la cellule (**Winterbourn 1993 ; Sridhar et al., 2013**).

**Le lactate déshydrogénase (LDH)** est impliqué dans la production d'énergie (**El-Demerdash, 2001**), et le taux sérique de LDH est un indicateur de nombreux états pathologiques (**Deng et al., 2011**). Les résultats obtenus ont remarqué une augmentation significative de LDH chez les rats intoxiqués par le Hg. Nos résultats sont en accord avec de nombreuses études réalisées sur le mercure **Agarwal et al., (2010); Deepmala et al., (2013) ; Joshi et al., (2017) ; Abarikwu et al., (2018)**. **El-Demerdash et al., (2001)** ont noté que lorsque les canards colverts ont été traités au méthylmercure, le niveau de LDH a augmenté dans le plasma, ce qui montre que des lésions biologiques se produisent au niveau du cœur et du foie. Cette élévation peut se produire en raison de la détérioration de la membrane plasmique des hépatocytes qui entraîne une fuite de LDH dans le sang (**Deng et al., 2011 ; Mumtaz et al., 2019**).

**Le taux de la bilirubine (Bil)** sérique a été augmenté chez les rats intoxiqué au mercure en comparaison avec les témoins et les témoins positifs. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Joshi et al., (2010); Othman et al., (2014) ; Joshi et al., (2014) ; Joshi et al., (2017) ; Majelsi et al., (2017) ; Abarikwu et al., (2018) ; Mumtaz et al., (2019)**. La bilirubine est le produit de la dégradation de l'hème, elle est conjuguée par les cellules du parenchyme hépatique, et puis excrétée dans la bile. En cas de toxicité hépatique, la concentration de bilirubine sérique augmente significativement (**Ravichandra et al., 2013**).

**Le co-traitement au miel sucré et amer**, a montré un retour aux normes de l'activité des enzymes sériques (ALAT, ASAT, PAL, LDH, Bil) comparativement au groupe témoins et au groupe exposé au Hg. L'administration de miel de jujube pendant 12 semaines a supprimé de manière significative les activités accrues de TGP et de TGO et a inhibé la formation de MDA dans le foie par rapport au groupe présentant des dommages chroniques dus à l'alcool (**Cheng et al., 2014**). L'étude de **Afroz et al., (2014)**, ont induit l'effet inverse, en réduisant sensiblement les niveaux des bio marqueurs par un prétraitement au miel de Sundarban par rapport au sérum des rats traité par le paracétamol. De plus, le traitement par la gelée royale a enregistré une diminution significative de la valeur moyenne des enzymes ALAT, ASAT et PAL par rapport au groupe traité par le  $HgCl_2$  (**Jalili et al., 2019**). La supplémentation en miel naturel et le post-traitement au miel naturel ont considérablement réduit les activités de TGP, de TGO et de la PAL par rapport aux régimes alimentaires contaminés par l'essence et le kérosène (**Achuba & Nwokogba, 2015**). La thérapie par le miel de caroube à donner un effet protecteur sur la fonction hépatique suite à la diminution du taux des enzymes sériques TGP, TGO, PAL et LDH comparativement aux rats traités par le Carbon tetrachloride ( $CCl_4$ ) (**El-Haskoury et al, 2018**). Les antioxydants le plus abondant dans les pépins de raisin ainsi dans le miel d'arbousier (amer) sont les proanthocyanidines (des flavonoïdes de type tannins

condensés) qui donne ce gout amer. Il s'est avéré que l'extrait de pépins de raisin réduit l'augmentation des marqueurs hépatique comme TGO, TGO, LDH causée par la cisplatine (Yousef et al., 2009), on peut cependant comparer ce résultat par rapport aux résultats du miel amer.

L'efficacité du miel dépend de la teneur spécifique en monosaccharides et en substances antioxydantes, en particulier les acides phénoliques et les flavonoïdes qui jouent un rôle important dans son effet car ils inhibent les prostaglandines (marqueur de l'oxydation des lipides) et augmentent la production de monoxyde d'azote (NO) (Henriques et al., 2006 ; Oguz et al., 2018). Ces derniers confèrent des effets protecteurs sur le foie en préservant l'intégrité de la membrane (Afroz et al., 2014). Cela peut se résumer par le rôle important du miel dans la protection de l'intégrité des cellules (Johnston et al., 2005 ; Atagana & Asagba, 2014).

L'administration des deux formulations d'apithérapie (une mixture de propolis, pollen, Apilarnil, et miel, avec/sans gelée royale) aux groupes atteints d'hépatopathie induite expérimentalement, améliorent les niveaux de bilirubine qui sont dépendants de l'albumine (Andrițoiu et al., 2014). De plus, une diminution significative du taux du flux biliaire chez les rats nourris au miel par rapport aux rats témoins a été observée (Alagwu et al., 2010). Cette protection avec le traitement au miel est due à sa capacité à réduire les intermédiaires réactifs de l'oxygène chez les rats mâles (El Rabay et al., 2019).

**Les protéines sériques** sont synthétisées principalement par les hépatocytes comme l'albumine et  $\alpha$  et  $\beta$ -globuline. Dans cette étude, les niveaux des protéines totales et d'albumine ont diminué chez les rats traités au  $HgCl_2$ , ce qui suggère que le mercure peut influencer la synthèse des protéines hépatiques et /ou à l'augmentation du taux d'excrétion due aux lésions rénales (Said et al., 2008). En comparant nos résultats avec d'autres recherches, nous avons constaté également une diminution que ce soit pour les protéines totales ou l'albumine (Reus et al., 2003 ; Said et al., 2008 ; Oda & El-Ashmawy ; 2012 ; Ravichandra et al., 2013). Il existe des interactions entre les ions de mercure et plusieurs thiols (Zalups, 2000). Selon ObeadAbdAllh, (2014), la lésion initiale produite est localisée dans le réticulum endoplasmique qui entraîne la perte des enzymes du cytochrome P-450, ce qui conduit à son échec fonctionnel avec une diminution de la synthèse des protéines. L'albumine possède un groupe sulfhydryle libre sur un résidu cystéinyle terminal auquel les ions mercuriques peuvent se lier (Reus et al., 2003 ; Uzunhisarcikli et al., 2016). Ainsi, le Hg se trouve dans les cellules fixées à des thiols contenant des protéines et des thiols de faible poids moléculaire comme le GSH.

**L'administration orale de miel sucré et amer** a augmenté les teneurs sériques en protéines totales et en albumine chez les rats ayant reçu le chlorure de mercure. Sadek et al., (2016) a enregistré également une élévation d'albumine après un traitement avec du lait de chamelle et du miel d'abeille suite à une cirrhose du foie pendant 8 semaines. Une autre étude

qui a noté le rôle bénéfique du miel, en augmentant le taux de l'albumine sérique après l'injection de CCl<sub>4</sub> (Al-Waili et al., 2006a). Bakour et collaborateurs, (2017) ont suggéré que le pain d'abeille pourrait améliorer le taux d'albumine par son activité antioxydante. Parmi les composants du miel, la vitamine E qui a augmenté le taux de protéines totales et d'albumine suite à une exposition à l'HgCl<sub>2</sub> (Uzunhisarcikli et al., 2016). Le zinc également montré des effets préventifs sur l'intoxication au mercure où ont été associés à la capacité de ce métal à induire la synthèse de protéines détoxifiantes, telles que les métallothionéines (Peixoto & Pereira, 2007).

Le Cholestérol et triglycérides ont été augmentés chez les rats du groupe Hg. Parallèlement, Wang et al., (2013) et Su et al., (2017), qui ont trouvé aussi une augmentation du taux de lipides sériques (CHOL et TG) chez les rats traités au Cinabre (HgS). Par contre, le niveau de CHOL et TG a été significativement réduit chez les animaux traités au HgCl<sub>2</sub> (Uma et al., 2012 ; Siouda & Abdennour, 2015 ; Abarikwu et al., 2018). Également, les taux de CHOL, TG et de cholestérol VLDL ont diminué de manière significative chez les rats exposés au mercure avec la présence de lésions hépatiques (Wadaan, 2009 ; Uzunhisarcikli et al., 2016). Le taux de cholestérol est un déterminant majeur qui affecte la fluidité des membranes. De plus, l'alimentation en cholestérol peut modifier le statut antioxydant (Farina et al., 2003). Ainsi, la formation d'une stéatose des lipides gras après une administration aiguë de mercure est principalement due à l'accumulation des triglycérides (Joshi et al., 2010).

Le miel sucré et amer ont complètement rétablis les concentrations du CHOL et des TG. Subséquemment, l'ingestion de produits apicoles a réduit les niveaux du cholestérol sanguin et des triglycérides (Al-Waili, 2003 ; Tanvir et al., 2015 ; El Shafey et al., 2015). Le venin d'abeille a également réduit les taux de CHOL et TG plasmatiques (Abdel Gawad et al., 2016). La même chose observée lors d'une api thérapie administré sous deux formulations (une mixture de propolis, pollen, Apilarnil, et miel, avec/sans gelée royale) à des groupes atteints d'hépatopathie induite expérimentalement (Andrițoiu et al., 2014). Les monosaccharides principaux du miel (glucose et fructose) peuvent avoir un pouvoir de réduction (Al-Waili & Boni, 2003 ; El Rabey et al., 2019). Toutefois, il est possible que des ingrédients naturels présents dans le miel soient capables de réduire le cholestérol ou les triglycérides sériques (Al-Waili & Boni, 2003). D'après Cheng et al., (2014), les composés phénoliques peuvent inhiber l'oxydation des lipoprotéines (LDL) en agissant comme piègeurs de radicaux libres ou comme agents de chélation des métaux. La diminution de la concentration sérique du cholestérol et du LDL pourrait également être le résultat d'un catabolisme accru des LDL par des voies indépendantes des récepteurs, comme la voie du piégeage, qui n'est pas régulée (El Shafey et al., 2015). Cependant, Hossen et al., (2017) a mentionné que la quercétine (un flavonoïde) réduit l'oxydation des LDL stimulée par les macrophages en empêchant la génération de la peroxydation lipidiques. D'autre part, une augmentation du HDL plasmatique a été observée chez les rats traités par le miel Nigérian (Alagwu et al., 2009). Les composants du miel ont prouvé éventuellement leurs effets pour

prévenir l'hyperlipidémie et la formation de cholestérol chez des rats sains en surpoids (**Al-Waili, 2004**).

**L'urée, la créatinine et l'acide urique sérique** dans cette étude, ont connu une augmentation significative chez les rats intoxiqués par le mercure. Nos résultats sont en accord avec des études précédentes (**Said et al., 2008 ; Vijayaprakash et al., 2013 ; ObeadAbdAllh, 2014 ; Siouda & Abdennour, 2015 ; Joshi et al., 2017**). L'effet néphrotoxique observé après l'exposition au mercure inorganique est supposé être lié au fait que le rein accumule le mercure (**Said et al., 2008**). En fait, en une heure seulement, 50% d'une dose administrée de mercure inorganique est présente dans le rein (**Zalups, 1993**). Dans le rein, la majorité des ions mercuriques ont été détectés dans le cortex, qui est le principal site d'accumulation des ions mercuriques (**Zalups, 2000 ; Oda & El-Ashmawy, 2012 ; ObeadAbdAllh, 2014**). En effet, l'élévation de l'acide urique, créatinine et de l'urée pourrait être due à des lésions produites dans les tubules rénaux, ce qui a été confirmé par des altérations marquées des tissus rénaux dans d'autres études (**Othman et al., 2014 ; Aslanturk et al., 2014**), ce qui confirme que le Hg s'accumule davantage dans l'épithélium rénal (**Franciscato et al., 2011**). Des obstructions et des fuites arrière du filtrat glomérulaire ont été observées chez les rats exposés au chlorure mercurique (**Girardi & Elias, 1995**). Ces effets, peuvent également être liés aux ROS qui induisent la contraction des cellules mésangiales, en altérant la surface de filtration et en modifiant les facteurs de coefficient d'ultrafiltration qui diminuent chez le rat la filtration glomérulaire (**Zalups, 2000 ; ObeadAbdAllh, 2014**).

**Les deux types de miels** co-administrés dans cette étude, ont réduit de manière significative le niveau élevé des marqueurs de la fonction rénale (Créatinine et urée) et protègent l'organe contre l'altération induite par le mercure. La détoxification rénale par le miel a été utilisée par de nombreux travaux, où il s'est avéré que les concentrations des marqueurs de la néphrotoxicité ont été diminués (**Al-waili & Boni, 2003 ; El-Denshary et al., 2012 ; Al-Seenii et al., 2014 ; Achuba & Nwokogba, 2015 ; Fassi Fihri et al., 2016**). Cependant, la présence de phénols, de flavonoïdes, d'acides ascorbiques et d'autres antioxydants dans le miel (**Berreta et al., 2005**) peut conférer des effets néphroprotecteurs. La détoxification rénale a été étudiée par l'utilisation du miel Nigérian et le miel de caroube du Maroc, respectivement contre la toxicité du cadmium (**Atagana & Asagba, 2014 ; Fassi Fihri et al., (2016)**), contre la toxicité du  $\text{CCl}_4$  (**El-Denshary et al., 2012**) et le miel d'acacia contre l'arsénite de sodium (**Aliyu et al., 2013**). Le miel a donc joué le rôle d'un capteur de radicaux libres contre le stress oxydatif induit par les métaux dans les reins, en dévoilant certains effets protecteurs sur le plan biochimique. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Hassan, (2007)** et **Erejuwa et al., (2012a)**, qui ont affirmé que le miel a un rôle protecteur contre les dysfonctionnements rénaux, et présente aussi des avantages hépatoprotecteurs. L'administration de kaempférol (un flavonoïde présent également dans le miel amer) a pu régulariser le taux de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine sériques et en augmentant le niveau de protéines vers la normale suite à une toxicité par le  $\text{HgCl}_2$  (**Vijayaprakash et al., 2013**). Également, il s'est avéré que le miel contient du fructose, ce dernier induit une

hyperfiltration et une augmentation de la clairance de la créatinine (**Manitius et al., 1995 ; Al-Waili et al., 2006 b**).

**Le taux du calcium et du sodium** a été diminué significativement chez les rats exposés au chlorure de mercure par rapport aux témoins. **Uma et al., (2012)** ont rapporté que les activités du  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ /ATPase, du  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPase et du  $\text{Mg}^{2+}$ /ATPase ont été significativement diminuées chez les rats intoxiqués par le  $\text{HgCl}_2$ . En outre, **Said et al., (2008)** ont démontré une augmentation du sodium sérique et une diminution du taux de potassium sérique dans les groupes des rats traités par le  $\text{HgCl}_2$  ce qui est en désaccord avec nos résultats. L'effet toxique du mercure affecte sérieusement la fonction de la membrane cellulaire, entraînant une perturbation de la régulation ionique (**Said et al., 2008**). Certaines hépatotoxines pourraient produire un œdème cellulaire en raison de la stimulation de l'entrée du  $\text{Na}^+$  par des canaux activés par le voltage, suivie d'une entrée passive d'eau et de  $\text{Cl}^-$  (**Yap et al., 2006 ; Wang et al., 2013**). L'inactivation de la protéine sulfhydryle (par exemple  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase) affecte également l'intégrité cellulaire en interrompant le potentiel et le volume de la cellule ainsi que des organites cellulaires (**Kade & Joseph, 2012 ; Rana et al., 2018**). De plus, des valeurs élevées de l'ion potassium et des niveaux réduits d'ions sodium, chlorure et bicarbonate sont des indicateurs d'un développement progressif d'une fonction rénale altérée (**Achuba & Nwokogba, 2015**). Tant dit que chez les poissons, les troubles biochimiques du système nerveux induits par le mercure se limitent à l'inhibition des enzymes clés de la fonction neurologique telles que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase (**Verma et al., 1983 ; Yang et al., 2020**). En outre, le  $\text{HgCl}_2$  est à l'origine de la génération de radicaux libres et des dommages oxydatifs au niveau la membrane cellulaire ce qui implique, l'inactivation de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase (**Othman et al., 2014**). En outre, un excès de ROS peut attaquer les mitochondries, où le calcium et d'autres facteurs liés à l'apoptose seraient libérés par les mitochondries lésées dans le cytoplasme qui régule l'apoptose cellulaire (**Cao et al., 2011 ; Liu et al., 2016**), et cela permet l'entrée de  $\text{Ca}^{+2}$  dans la cellule. L'augmentation soutenue du  $\text{Ca}^{+2}$  intracellulaire entraîne des générations de radicaux libres, qui à leur tour produisent une inhibition supplémentaire de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase induisant une peroxydation des lipides et une altération du statut antioxydant (**Othman et al., 2014**).

Le miel contient de composés de minéraux tels que le magnésium, le potassium, le calcium, le chlorure de sodium, le soufre, le cuivre, l'iode, le zinc, le fer et les phosphates. Il contient également des vitamines B1, B2, C, B6, B5 et B3 (**Gheldof et al., 2002**), dont certaines ont des propriétés antioxydantes (**Sadek et al., 2016**).

**Le miel sucré et amer**, dans cette étude, a restauré le taux du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Na}^+$  sanguin chez les rats exposés au mercure. Les taux sériques du sodium ont augmenté de manière significative, chez les rats wistar nourris d'une alimentation contaminée par de l'essence et du kérosène, et que la supplémentation et le post-traitement avec du miel ont permis de rapprocher les valeurs de ces paramètres de celles des rats témoins (**Achuba & Nwokogba, 2015**). Tant dit que, l'ajout du miel de caroube n'a pas induit de changement significatif du

niveau de potassium ou de sodium plasmatique (**El-Haskoury et al., 2015**). Cependant, **Imtara et al., (2018)** ont mentionnés que le miel de Tulkarm contient des phénols, des flavonols et des flavones et qui présente une activité antioxydante considérable. Il a également un effet diurétique sans affecter les électrolytes du sérum ou la fonction rénale. Il a rétabli le taux du sodium sérique comparativement au taux des témoins et des rats qui ont administré le furosémide, un médicament diurétique de l'anse contre l'œdème. **Haro et al., (2000)** démontrent les effets bénéfiques du pollen et/ou de la propolis sur le métabolisme du fer, du calcium, du phosphore et du magnésium pendant l'anémie ferriprive chez le rat. Il a été noté que l'effet natriurétique du miel de caroube pourrait être lié aux effets sur le co-transporteur Na-K-2Cl dans le membre ascendant de la boucle de Henle, à l'effet sur l'expression de l'aquaporine, de la vasopressine, du système nerveux sympathique, du peptide natriurétique ou du système rénine-angiotensine-aldostérone (**El-Haskoury et al., 2015**). La propolis augmente apparemment l'absorption et l'utilisation de différents minéraux, en raison de la présence de dérivés des acides organiques qui améliorent les fonctions physiologiques en régulant l'activité ionique dépendante des enzymes (**Andrițoiu et al., 2014**). Cependant, dans l'étude sur l'alimentation aiguë, le miel et ses constituants glucidiques (glucose, fructose et raffinose) ont produit un effet dose-réponse sur l'absorption du calcium.

**La glycémie** des rats exposés au mercure a montré une élévation significative après 70 jours de traitement. De même, **Siouda & Abdennour, (2015) ; Su et al., (2017) et Wadaan, (2009)** ont observés une augmentation du taux du glucose sanguin après une intoxication mercurielle chronique. Par contre, **Peixoto & Peirera, (2007)**, ont notés que les rats intoxiqués au mercure ont présenté une diminution de 25% de glucose et qu'après avoir évalué la teneur hépatique de ce polymère, ils ont vérifié que la teneur en glycogène n'était pas modifiée par le traitement. Ainsi, la diminution du taux de glucose ne semble pas être associée à une altération du métabolisme du glycogène. Plusieurs études concernant les organismes aquatiques ont noté des altérations du mercure sur l'absorption du glucose (**Farmanfarmaian et al., 1989 ; Sastry & Rao, 1984**).

**Le miel** est composé principalement de sucres mono- et disaccharides, à savoir le glucose, le fructose, le maltose et le saccharose. Cependant, plus de 90% sont des sucres simples, qui sont facilement absorbés et métabolisés après consommation. Il est possible que l'ingestion de miel réduise également le niveau de glucose plasmatique, réduisant ainsi le dépôt de graisses (**Aliyu et al., 2012**). C'est pourquoi le miel a un indice glycémique faible par rapport à d'autres édulcorants (**Bogdanov et al., 2012**). En outre, le miel peut produire son effet antihyperglycémique par le biais du fructose. Ce dernier stimule la glucokinase, qui favorise l'absorption hépatique du glucose et le stockage du glycogène (**Watford, 2002**). De plus, le miel contient des ions minéraux tels que le zinc et le cuivre, qui ont un effet antihyperglycémique dans le diabète sucré induit par des médicaments expérimentaux (**Song et al., 2003 ; Sitasawad et al., 2001**). En outre, le miel améliore certains dérèglements métaboliques courants dans le diabète, comme le stress oxydatif dans le pancréas et les reins

des rats (**Erejuwa et al., 2011**), et permis d'augmenter les taux sériques d'insuline et de réduire la concentration de glucose chez les rats diabétiques (**Erujuwa et al., 2012b**). Autre produit de la ruche, le venin d'abeille qui a diminué le taux du glucose sanguin chez des rats diabétiques (**Abdel Gawad et al., 2016**).

**La catalase hépatique et rénale** dans la présente étude, a montré une diminution significative chez les animaux intoxiqués par le Hg. Nos résultats sont en accordance avec **Aslanturk et al., (2014)** ; **Othman et al., (2014)** ; **Uzunhisarcikli et al., (2016)** qui ont signalé une diminution des activités de CAT et GPx dans le tissu hépatique et rénal des rats traités à l'HgCl<sub>2</sub>. Il a été rapporté que les altérations des activités enzymatiques antioxydantes par le Hg sont dues à la génération excessive des ROS (superoxyde ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entraînant une augmentation du niveau de LPO (**Agarwal et al., 2010** ; **Uzunhisarcikli et al., 2016**). Dans le cas où le mercure provoque une réduction des activités des enzymes CAT et GPx, cela peut être due à la consommation lors de la dégradation des radicaux libres et à l'accumulation de radicaux superoxyde et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou à l'inhibition de ces enzymes par les radicaux libres (**Uzunhisarcikli et al., 2016**). **Yu et al., (2006)** ont montré que la catalase était sélectivement éliminée lors de la mort autophagique des cellules. La cellule peut maintenir son environnement interne dans une mesure limitée en cas où la concentration du mercure est plus faible, et ceci par les enzymes antioxydantes dans l'élimination des électrophiles toxiques (**Joshi et al., 2017**).

**La co-administration du miel** a éventuellement augmenté l'activité sérique de la CAT. Parallèlement, l'augmentation de la CAT est aussi observée chez des rats suite à la supplémentation en miel gelam (CAT sérique) (**Sahhugi et al., 2014**), le miel d'Acacia (CAT rénal) (**Aliyu et al., 2013**) et le miel de jujubier (CAT hépatique, rénal) (**El-Rabey et al., 2019**). Pareillement, le miel de caroube semble augmenté le niveau des paramètres antioxydants ce qui pourrait être attribué à sa capacité à piéger la génération excessive de radicaux libres pendant le stress oxydatif (**El-Haskoury et al., 2018**). La vitamine E, l'un des constituants du miel qui peut prévenir la majorité des dommages causés par les métaux lourds en protégeant l'intégrité des membranes (**Agarwal et al., 2010** ; **Al-Attar, 2011** ; **Astanturk et al., 2014**). De plus, l'acide gallique est l'un des piègeurs de radicaux libres les plus puissants signalés dans le miel de manuka (**Stephens et al., 2010**). Il a été démontré que l'acide phénolique et les flavonoïdes présents dans le miel protègent les lignées cellulaires endothéliales contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux peroxydes et l'activité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Beretta et al., 2007** ; **Jubri et al., 2013**). La consommation de miel en plus grande quantité a augmenté le taux d'antioxydants polyphénoliques sanguins (**Al-Waili et al., 2006b**).

**La glutathione peroxidase hépatique et rénale** a marqué une diminution significative chez les rats exposés au mercure par rapport aux témoins. Cette réduction est similaire aux travaux de **Agarwal et al., (2010)** ; **Astanturk et al., (2014)** ; **Liu et al., (2016)** ; **Joshi et al., (2017)**. La GPx est une enzyme séléno-antiperoxydante qui est présente à la fois dans le

cytosol et dans la matrice mitochondriale (**Vijayaprakash et al., 2013**). La fonction principale de la GPx est de réduire le peroxyde d'hydrogène et l'hydroperoxyde de lipide (**Li et al., 2015 ; Zhao et al., 2017**). Il a été noté qu'une faible concentration de GSH limitera l'activité maximale de la GPx (**Agarwal et al., 2014**). L'accumulation du Hg dans les tissus biologiques a submergé le mécanisme antioxydant et fait chuter les niveaux d'antioxydants (**Othman et al., 2014**). **Pal & Ghosh, (2012)** ont noté que le Hg se lie à la GPx avec ses groupes -SeH plus activement que d'autres protéines contenant du thiol et diminue donc l'activité de la GPx, cependant, il peut inhiber la GPx directement en affaiblissant les groupes fonctionnels, ou indirectement en diminuant du GSH et du NADPH (**Husain et al., 1987**). La diminution des activités de la CAT et de la GPx peut également être une réponse de défense utilisée contre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré par le chlorure de mercure (**Bharathi et al., 2012 ; Astanturk et al., 2014**).

**La co-administration du miel** a rétabli le taux de GPx hépatique et rénale durant l'exposition au métal. L'effet protecteur du miel de jujubier et miel vitex, a empêché la réduction de l'activité de la SOD et de la GPx hépatique chez le rat suite à un empoisonnement à l'alcool et au paracétamol, respectivement (**Cheng et al., 2014 ; Wang et al., 2015**). Au niveau rénal, **Aliyu et al., (2013)** ont démontré un rétablissement de l'activité de GPx après une exposition à l'arsénite de sodium grâce au miel d'acacia. De plus, le miel contient également des minéraux tels que le fer, le zinc et le sélénium, qui entre dans la composition de quelques antioxydants cellulaires. L'augmentation du GPx pourrait être due à la présence de sélénium dans le miel puisque le Se fait partie du centre actif du GPx et d'autres sélénoprotéines antioxydantes (**Uzunhisarcikli et al., 2016**).

**La teneur en GSH hépatique et rénale** a été diminuée après l'exposition des rats au mercure pendant 70 jours. Cette diminution peut expliquer l'inhibition de l'activité des GPx. Des études précédentes démontrent également que le traitement des rats avec du HgCl<sub>2</sub> diminue significativement le taux du GSH hépatique et rénal (**Agarwal & Behari, 2007 ; ObeadAbdAllh, 2014 ; Joshi et al., 2017**). La quantification des niveaux du GSH a été proposée comme un marqueur du stress oxydatif et comme un indicateur de la toxicité du Hg (**dos Santos et al., 2007**). Le GSH joue un rôle vital dans le foie pour la détoxification et la régulation du statut thiosulfure de la cellule. Le foie est le réservoir principal de facteur de production de glutathion qui alimente d'autres organes.

De plus, la liaison du mercure au glutathion qui conduit à une réduction du GSH intracellulaire, elle conduit à diminuer le potentiel antioxydant des cellules (**ObeadAbdAllh, 2014**). Par conséquent, le rapport glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) peut être déséquilibré et contribuer à l'apparition du stress oxydatif (**Caglayan et al., 2019**). En outre, la liaison du mercure aux groupes -SH du glutathion ou des protéines est considérée comme un mécanisme de défense cellulaire, car il séquestre, transporte et inactive les ions métalliques réactifs (**Agarwal et al., 2010**). Il a été rapporté que l'administration du mercure provoque des altérations de la membrane interne des mitochondries, entraînant une augmentation de la

formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la chaîne de transport des électrons mitochondriaux et une diminution des niveaux de GSH mitochondriale (**Kandemir et al., 2018 ; Caglayan et al., 2019**).

Au niveau du foie, la diminution du GSH cellulaire, réduit l'efficacité de la défense antioxydante contre l'augmentation des ROS et entraîne donc une hépatotoxicité (**Manju & Jagadeesan, 2019**). Cependant, la formation des conjugués de mercure-GSH est principalement active dans le cytosol des hépatocytes, où la concentration du GSH est plus élevée. Une fois formés, ces conjugués sont exportés du foie par excrétion biliaire ou sinusoidale. Dans le premier cas, le mercure est excrété dans les fèces, et dans le second, il passe dans les urines (**Zalups, 2000 ; bando et al., 2005**). Ce processus de sécrétion pourrait être responsable de la réduction des thiols non protéiques intracellulaires dans le foie. Le mercure se lie aux métallothionéines et aux thiols de faible poids moléculaire, dont la présence dans les reins est connue pour être élevée (**Perotoni et al., 2004**). Ce fait est démontré par la forte accumulation du mercure dans les reins parmi les tissus examinés, comme l'indiquent également les résultats de **Khan et al., (2001)**. La cystéine est un transporteur important du mercure inorganique absorbé au niveau de la membrane plasmique de la face luminale des cellules épithéliales tubulaires proximales (**Zalups & Lash, 2006**).

**La co-administration du miel sucré et amer** a fait une restauration du taux du GSH hépatique et rénale chez les rats intoxiqués par le HgCl<sub>2</sub>. L'élévation du GSH dans le foie et les reins, a été noté dans quelques travaux grâce à la supplémentation de miel de caroube (**El-Hashkoury et al., 2015, 2018**), le miel de jujubier (**El-Rabey et al., 2019**), la propolis (**Singla et al., 2014**) et le miel turc (**Yaman et al., 2016**) ce qui laisse supposer que le miel peut réussir à la neutralisation des radicaux libres dans le foie et les reins des rats et empêchant l'absorption du mercure au niveau du tractus gastro-intestinale.

**Le taux du MDA** hépatique et rénal dans la présente étude, a montré une augmentation notable chez le rat ayant reçu une administration continue du mercure pendant 70 jours. De nombreuses études ont également confirmées une peroxydation lipidique suite à l'exposition aux métaux dans les tissus hépatiques et rénales chez des animaux de laboratoire (**El-Demerdash, 2001 ; Jagadeesan & Sankarsami Pillai, 2007 ; Kalender et al., 2013 ; Deepmala et al., 2013 ; Vijayaprakash et al., 2013 ; ObeadAbdAllh, 2014 ; Uzunhisarcikli et al., 2016**). La génération élevée des ROS entraîne un stress oxydatif qui compromet l'intégrité de la membrane plasmique et joue un rôle fondamental dans l'apparition des maladies hépatiques et rénales (**Abarikwu et al., 2018**). L'augmentation des niveaux de peroxyde chez les rats traités au HgCl<sub>2</sub> peut indiquer un stress oxydatif qui est nocif pour les cellules hépatiques et rénales (**ObeadAbdAllh, 2014**). Le foie et les reins semblent vulnérables à l'insulte oxydante en raison de leur rôle dans la détoxification et l'excrétion des xénobiotiques (**Abarikwu et al., 2018**). La diminution du taux de la CAT, GPx et la GSH au niveau hépatique et rénal s'accorde avec l'augmentation de la MDA.

**La co-supplémentation du miel sucré et amer** a réduit l'oxydation des lipides dans le foie et les reins. De même, le traitement par le miel contre un oxydant, confère une protection significative du foie et une réduction des niveaux de MDA, comme le cas du miel de Sundarban (Afroz et al., 2014), le miel de Tualang (Erejuwa et al., 2010), le miel Turc (Yaman et al., 2016), et le miel de caroube (El-Haskoury et al., 2018). Ce qui est intéressant c'est que toutes les substances du miel agissent ensemble pour fournir un effet detoxifiant synergique, en piégeant les radicaux libres tels que les superoxydes et l'hydroxyles, ce qui peut aider à réduire les lésions hépatiques ou rénales (Afroz et al., 2014). Il a été démontré que le miel possède des substances phytochimiques comme les flavonoïdes, qui sont efficaces pour éliminer les radicaux libres (Yaman et al., 2016). De plus, le venin d'abeille inhibe de manière significative la peroxydation enzymatique des lipides et possède également une activité considérable de piégeage des radicaux hydroxyles (Abdel Gawad et al., 2016). La gelée royale est capable de réduire éventuellement la peroxydation des lipides et d'augmenter la capacité antioxydante du foie, ce qui entraîne une réduction du stress oxydatif (Jalili et al., 2019). Par manque d'études, le miel amer reste un produit inconnu. Ça spécificité, c'est ça contenance en tannin qui reflète son amertume. Les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénoliques. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois efficaces que les phénols simples (Peronny, 2005). Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries hépatiques et des microsomes, mais aussi l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate. Lors de la peroxydation, les tanins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi, des radicaux tanniques stables sont formés (Ekoumou, 2003).

Dans notre étude, les profils histologiques hépatiques et rénaux ont été préparés pour confirmer les variations biochimiques déjà discutées. Actuellement, l'examen histopathologique est reconnu comme un outil important pour évaluer les effets des contaminants environnementaux dans les cellules, les tissus et les organes (Uzunhisarcikli et al., 2016).

**L'histologie hépatique** semble être affectée par le HgCl<sub>2</sub> représentant un œdème interstitiel avec dilatation sinusoidale, ballonnisation et nécrose hépatocytaire et condensation de la chromatine en comparant avec les témoins positifs. L'examen histopathologique de nombreux chercheurs, a montré que le HgCl<sub>2</sub> provoquait beaucoup de signes d'altérations sous forme de dégénérescence du cytoplasme, perte de noyaux, modifications graisseuses (vacuolisation), dilatation des espaces sinusoidaux, hypertrophie des hépatocytes, nécrose, hémorragie et l'hyperémie des tissus hépatiques (Agarwal et al., 2010 ; Deng et al., 2011 ; Sheikh et al., 2011 ; Ansar & Igbal, 2016 ; Caglayan et al., 2019 ; Manju & Jagadeesan, 2019). Les changements histopathologiques observées dans le tissu hépatique peuvent être dus à une peroxydation lipidique accrue et à la production de ROS qui, à leur tour, induisent un stress oxydatif. En conséquence, les ROS attaquent la membrane cellulaire et entraînent une déstabilisation et une désintégration de la membrane cellulaire à la suite de la peroxydation

des lipides (Uzunhisarcikli et al., 2016). Ces changements peuvent également dus à la conséquence de l'inhibition de la phosphorylation oxydative qui conduit à l'épuisement de l'ATP et à la mort des hépatocytes. (Sheikh et al., 2011).

L'**histologie rénale** a montré une dilatation de la chambre urinaire et une dilatation des tubes contournés qui sont bordés d'un épithélium aplati fait de cellules à noyaux pycnotique et à cytoplasme rétracté dans la zone corticale. La zone médullaire a des tubes collecteurs de taille variable et à contenu hémorragique. Les tubes sont séparés par un tissu fibro-inflammatoire. Des études expérimentales ont signalé des dommages histopathologiques similaires dans la néphrotoxicité induite par le mercure. Les lésions ont été caractérisées par divers degrés ; le cortex rénal présentait une atrophie du glomérule, une dilatation de la capsule de Bowman, une dégénérescence des cellules tubulaires, une hémorragie, un œdème et une hypercellularité des glomérules (Agarwal et al., 2010 ; Sheikh et al., 2011 ; Othman et al., 2014). Les altérations histologiques sont en accord avec les variations biochimiques. Nos analyses biochimiques ont montré une élévation de la peroxydation lipidiques qui est due aux à l'élévation des ROS au niveau des tissus rénaux. Les hydroperoxydes accumulés peuvent provoquer une cytotoxicité, qui est associée à la peroxydation des phospholipides membranaires par les hydroperoxydes lipidiques, la base des dommages cellulaires dus à la toxicité du chlorure mercurique (Vijayaprakash et al., 2013). Il été rapportait que les métaux lourds provoquaient une congestion généralisée dans la région corticale ainsi qu'une nécrose importante du tissu rénal (Pal & Ghosh, 2012). En raison de la vulnérabilité de la pars recta du tubule proximal du néphron, il est fortement affecté par le Hg inorganique toxique, qui pourrait être dû à l'accumulation de xénobiotiques dans la région du néphron. Les métaux lourds et les anions et les cations organiques sont conjugués par le transport du GSH et se localisent principalement au niveau du tubule proximal, ce qui entraîne l'accumulation tubulaire proximale et la toxicité cellulaire des xénobiotiques. Ainsi, la nécrose et les lésions cellulaires, qui se produisent le long de la pars recta et des tubules distaux, dépendent de la gravité de la néphropathie causée par l'intoxication au Hg (Aqeel et al., 2019). L'altération de la membrane cellulaire et le dysfonctionnement mitochondrial ont été considérés comme des actions importantes pour l'apoptose des cellules rénales induite par le mercure (Fouda et al., 2008).

La co-administration du miel sucré et amer a protégé l'architectures histologiques des rats exposés au mercure, ces derniers semblent corrélés avec les résultats biochimiques en confirmant encore les effets hépato- et néphroprotecteurs des deux miels utilisés. De nombreux travaux scientifiques ont démontré le rôle protecteur de plusieurs types de miels sur le rétablissement des altérations histologiques comme le miel de Sundarban (Afroz et al., 2014), le miel Vitex (Wang et al., 2015), le miel de Manuka qui réduit l'inflammation, la dégénérescence et les changements nécrotiques (Reshi et al., 2016), et le miel de Jujubier (El-Rebay et al., 2019). En outre, une étude inédite sur la détoxification du HgCl<sub>2</sub> par la gelée royale a révélé une réduction des lésions hépatiques et rénales chez le rat (Jalili et al., 2019). De plus, la supplémentation du Miel poly floral de Bengladesh suggère une efficacité

antiradicalaire/antioxydante ou de chélation des métaux par le miel (**Tanvir et al., 2015**) ce qui s'accorde avec l'hypothèse de **Afros et al., (2014)** pour expliquer l'action protectrice du miel de Sundarban dans les altérations histopathologiques ; est que les substances phénoliques, les flavonoïdes, les acides ascorbiques, les acides aminés et les protéines du miel de Sandarban peuvent piéger les radicaux libres et bloquer les dommages oxydatifs et la dégénérescence et la nécrose des tissus hépatiques et rénaux.

## **Partie 4 : Références**

1. **Abarikwu SO (2014)** Protective effect of quercetin on atrazine induced oxidative stress in the liver, kidney, brain and heart of adult Wistar rats. *Toxicol Int* 21(2): 148-155
2. **Abarikwu SO, Benjamin S, Ebah SG, Obilor G, Agbam G (2016)** Oral administration of Moringa oleifera oil but not coconut oil prevents mercury-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia* 49(1): 1-13
3. **Abarikwu SO, Njoku R-CC, Onuah CL (2018)** Aged coconut oil with a high peroxide value induces oxidative stress and tissue damage in mercury-treated rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 29(4): 365-376
4. **Abdel Gawad S, Fikry H, Maged Amin M, Ramadan Elmahdi A, Abd Elaziz D (2016)** Effect of apitherapy on the pancreas & liver of streptozotacin induced diabetic rats. A biochemical and histological study. *Eur J Pharm Med Res* 3(7): 555-565
5. **Abdel-Salam AM, Al-Dekheil A, Babkr A, Farahna M, Mousa HM (2010)** High fiber probiotic fermented mare's milk reduces the toxic effects of mercury in rats. *N Am J Med Sci* 2(12): 569-575
6. **Achuba FI, Nwokogba CC (2015)** Effects of honey supplementation on hydrocarbon-induced kidney and liver damage in wistar albino rats. *Biokemistri* 27: 50-55
7. **Afroz R, Tanvir EM, Hossain MF, Gan SH, Parvez M, Islam MA, Khalil MI (2014)** Protective Effect of Sundarban Honey against Acetaminophen-Induced Acute Hepatonephrotoxicity in Rats. *Medicine Evid Based Complement Alternat Med*, Volume 2014, Article ID 143782, 8 pages
8. **Agarwal R, Behari JR (2007)** Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 79(3): 306-310
9. **Agarwal R, Raisuddin S, Tewari S, Goel SK, Raizada RB, Behari JR (2010)** Evaluation of Comparative Effect of Pre- and Posttreatment of Selenium on Mercury-Induced Oxidative Stress, Histological Alterations, and Metallothionein mRNA Expression in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 24(2): 123-135
10. **Agrawal S, Flora G, Bhatnagar P, Flora SJS (2014)** Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell Mol Biol* 60 (2): 13-21
11. **Alagwu EA, Nneli RO, Okwari OO, Osim EE (2009)** Bile secretion in albino rat following chronic honey intake. *Niger J Physiol Sci* 24(2): 203-206
12. **Al-Attar AM (2011)** Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi J Biol Sci* 18(4): 395-401
13. **Aliyu M, Ibrahim S, Inuwa HM, Sallau AB, Abbas O, Aimola IA, Habila N, Uche NS (2013)** Ameliorative Effects of Acacia Honey against Sodium Arsenite-Induced Oxidative Stress in Some Viscera of Male Wistar Albino Rats. Volume 2013, Article ID 502438, 5 pages
14. **Al-Seeni MN, El Rabey HA, Al-Solamy SM (2014)** The protective role of bee honey against the toxic effect of melamine in the male rat kidney. *Toxicol Ind Health* 31(6): 485-493
15. **Al-Waili NS (2004)** C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in healthy, diabetic, and hyperlipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose. *J Med Food* 7(1): 100-117
16. **Al-Waili NS, Boni NS (2003)** Natural Honey Lowers Plasma Prostaglandin Concentrations in Normal Individuals. *J Med Food* 6(2): 129-133

17. **Al-Waili** NS, Saloom KY, Akmal M, Al-Waili F, Al-Waili TN, Al-Waili AN, Ali A (2006 b) Honey ameliorates influence of hemorrhage and food restriction on renal and hepatic functions, and hematological and biochemical variables. *Int J Food Sci Nutr* 57(5-6): 353-362
18. **Al-Waili** NS, Saloom KY, Al-Waili TN, Al-Waili AN, Akmal M, Al-Waili FS, Al-Waili HN (2006a) Influence of various diet regimens on deterioration of hepatic function and hematological parameters following carbon tetrachloride: a potential protective role of natural honey. *Nat Prod Lett* 20(13): 1258-1264
19. **Andritoiu** CV, Ochiuz L, Andritoiu V, Popa M (2014) Effect of Apitherapy Formulations against Carbon Tetrachloride-Induced Toxicity in Wistar Rats after Three Weeks of Treatment. *Molecules* 19(9): 13374-13391
20. **Ansar S, Iqbal M** (2016) Protective effect of diallylsulphide against mercuric chloride-induced hepatic injury in rats. *Hum Exp Toxicol* 35(12): 1305-1311
21. **Aqeel T, Gurumallu SC, Hashimi SM, AlQurashi N, Javaraiah R** (2019) Evaluation of protective efficacy of flaxseed lignan-Secoisolariciresinol diglucoside against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rats. *Mol Biol Rep* 46: 6171-6179
22. **Aslanturk A, Uzunhisarcikli M, Kalender S, Demir F** (2014) Sodium selenite and vitamin E in preventing mercuric chloride induced renal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 70: 185-190
23. **Atagana OS, Asagba SO** (2014) Protective effects of honey against cadmium-induced alteration of some biochemical parameters in rats. *Toxicol Environ Chem* 96(10): 1-7
24. **Bakour M, Al-Waili NS, El Menyiy N, Imtara H, Figuira AC, Al-Waili T, Lyoussi B** (2017) Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. *J Food Sci Technol* 54(13): 4205-4212
25. **Bando I, Sánchez Reus MI, Andrés D, Cascales M** (2005) Endogenous Antioxidant Defence System in Rat Liver Following Mercury Chloride Oral Intoxication. *J Biochem Mol Toxicol* 19 (3): 154-161
26. **Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M, Facino RM** (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* 533: 185-191
27. **Bharathi E, Jagadeesan G, Manivasagam T** (2012) Influence of s-allyl cysteine against mercuric chloride induced nephrotoxicity in albino rats. *J Chem Pharm Res* 4(3): 1470-1474
28. **Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P, Jasmin RF, Fawcett KA** (2012) Honey as nutrient and functional food. *J Am Coll Nutr* 40(13): 1-37
29. **Bucolo G, David H** (1973) Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem* 19 (5): 476-482
30. **Burtis C, Ashwood E, Bruns D** (2005) *Tiets textbook of clinical chemistry*. 4th ed. Washington, DC: Saunders
31. **Caglayan C, Kandemir F M, Darendelioğlu E, Yıldırım S, Kucukler S, Dortbudak MB** (2019) Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Trace Elem Med Biol* 56: 60-68
32. **Cao XH, Zhao SS, Liu DY, Wang Z, Niu LL, Hou LH, Wang CL** (2011) ROS-Ca(2p) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chem Biol Interact* 190(1): 16-27

33. **Cheng N, Du B, Wang Y, Gao H, Cao W, Zheng J, Feng F (2014)** Antioxidant properties of jujube honey and its protective effects on chronic alcohol-induced liver damage in mice. *Food Funct* 5(5): 900-908
34. **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(3): 224-229
35. **Deepmalaa J, Deepaka M, Srivastava S, Sangeetaa S, Kumarb SA, Kumarb SS (2013)** Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protect acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Bio* 27(3): 249-256
36. **Deng Y, Xu Z, Liu W, Yang H, Xu B, Wei Y (2011)** Effects of Lycopene and Proanthocyanidins on Hepatotoxicity Induced by Mercuric Chloride in Rats. *Biol Trace Elem Res* 146(2): 213-223
37. **dos Santos APM, Mateus ML, Carvalho CML, Batoréu MCC (2007)** Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interference of selenomethionine on methylmercury toxicity. *Toxicol Lett* 169(2) : 121-128
38. **Doumas BT (1971)** Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*: 31(1): 87-96
39. **Ekoumou C (2003)** Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelle utilisés dans le traitement des infections Urinaire et la Cystite. Thèse Pharmacie, Bamako, Mali : page 33
40. **El Denshary ES, Al-Gahazali MA, Mannaa FA, Salem HA, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA (2012)** Dietary honey and ginseng protect against carbon tetrachloride-induced hepatonephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 64(7-8): 753-760
41. **El Rabey HA, Al-Seeni MN, Al-Sieni AI, Mohammed Al-Hamed A, Zamzami MA, Almutairi FM (2019)** Honey attenuates the toxic effects of the low dose of tartrazine in male rats. *J Food Biochem* 43 (4): e12780
42. **Elblehi SS, Hafez MH, El-Sayed YS (2019)** L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine attenuates mercury-induced hepato-renal damage through suppressing oxidative stress and inflammation. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(9): 9333-9342
43. **El-Demerdash FM (2001)** Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver, and blood of rats. *J Environ Sci Health B* 36(4): 489-499
44. **El-haskoury R, Al-Waili N, Kamoun Z, Makni M, Al-Waili H, Lyoussia B (2018)** Antioxidant Activity and Protective Effect of Carob Honey in CCl<sub>4</sub>-induced Kidney and Liver Injury. *Arch Med Res* 49(5): 306-313
45. **El-Haskoury R, Zizi S, Touzani S, Al-Waili N, Al-Ghamdi A, Lyoussi B (2015)** Diuretic activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) Honey: comparison with furosemide. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 12(4): 128-133
46. **El-Shafey AAM, Seliem MME, El-Zawahry SAM, Shahen EMS, Mahmoud DEM (2015)** Effect of honey bee on some antioxidant enzymes and lipid profile in hypercholesterolemic male albino rats. *Zagazig University Medical Journal* 21(1): 68-78
47. **Erejuwa OO, Gurtu S, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, Sirajudeen KNS, Salleh MSM (2010)** Hypoglycemic and Antioxidant Effects of Honey Supplementation in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Int J Vitam Nutr Res* 80(1):74-82

48. **Erejuwa** OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS (2012) Honey: A Novel Antioxidant. *Molecules* 17(4): 4400-4423
49. **Erejuwa** OO, Sulaiman SA, Wahab MS (2011) Oligosaccharides Might Contribute to the Antidiabetic Effect of Honey: A Review of the Literature. *Molecules* 17(1): 248-266
50. **Erejuwa** OO, Sulaiman SA, Wahab MS (2012b) Fructose Might Contribute to the Hypoglycemic Effect of Honey. *Molecules* 17(2): 1900-1915
51. **Farina** M, Soares FA, Feoli A, Roehring C, Brusque AM, Rotta L, Perry ML, Souza DO, Rocha JBT (2003b) in vitro effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid–reactive substances and non-protein thiols from rats: influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. *Nutrition* 19(6): 531-535
52. **Farmanfarmaian** A, Pugliese KA, Sun L-Z (1989) Mercury inhibits the transport of D-glucose by the intestinal brush border membrane vesicles of fish. *Mar Environ Res* 28(1-4): 247-251
53. **Fassi Fihri** A, Al-Waili NS, El-Haskoury R, Bakour M, Amarti A, Ansari MJ, Lyoussi B (2016) Protective Effect of Morocco Carob Honey Against Lead-Induced Anemia and Hepato-Renal Toxicity. *Cell Physiol Biochem* 39(1): 115-122
54. **Fawcett** JK, **Scott** JE (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol* 13(2): 156-159
55. **Fouda** A-MM, Daba M-HY, Dahab GM, Sharaf el-Din OA (2008) Thymoquinone Ameliorates Renal Oxidative Damage and Proliferative Response Induced by Mercuric Chloride in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103(2):109-118
56. **Franciscato** C, Moraes-Silva L, Duarte FA, Oliveira CS, Ineu RP, Flores EM, Dressler VL, Peixoto NC, Pereira ME (2011) Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 480-486
57. **Gheldof**, N, Wang X, Engeseth N (2002) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem* 50(21): 5870-5877
58. **Girardi** G, **Elias** MM (1995) Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radical Biol Med* 18(1): 61-66
59. **Haouem** S, Chargui I, Najjar MF, Sriha B, El Hani A (2013) Liver Function and Structure in Rats Treated Simultaneously with Cadmium and Mercury. *Open Journal of Pathology* 3(1): 26-31
60. **Haro** A, Lopez-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alferez MJM, Campos MS (2000) Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *J Agri Food Chem* 48(11): 5715-5722
61. **Hassan** HA (2007) The possible protective role of bee's honey against hazard effects of some synthetic food additives on the kidney functions of male rats. *J Egypt soc Toxicol* 36: 13-21
62. **Hazelhoff** MH, **Torres** AM (2018) Gender differences in mercury-induced hepatotoxicity: potential mechanisms. *Chemosphere* 202: 330-338
63. **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
64. **Hossen** MS, Ali MY, Jahurul MHA, Abdel-Daim MM, Gan SH, Khalil MI (2017) Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: a review. *Pharmacol Rep* 69(6): 1194-1205

65. **Husain SR**, Cillard J, Cillard P (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26(9): 2489-2491
66. **Imtara H**, Al-Waili N, Bakour M, Al-Waili W, Lyoussi B (2018) Evaluation of antioxidant, diuretic, and wound healing effect of Tulkarm honey and its effect on kidney function in rats. *Vet World* 11(10): 1491-1499
67. **Institóris L**, Siroki O, Undeger U, Basaran N, Banerjee BD, Dési I. (2001) Detection of the effects of repeated dose combined propoxur and heavy metal exposure by measurement of certain toxicological, haematological and immune function parameters in rats. *Toxicology* 163(2-3): 185-193
68. **Jagadeesan G**, **Sankarsami Pillai S** (2007) Hepatoprotective effects of taurine against mercury induced toxicity in rats. *J Environ Biol* 28(4): 753-756
69. **Jaiswal N**, Kumar D, Rizvi SI (2013) Red onion extract (*Allium cepa* L.) supplementation improves redox balance in oxidatively stressed rats. *Food Sci. Hum. Wellness* 2(2): 99-104
70. **Jalili C**, Roshankhah S, Jalali A, Salahshoor MR (2019) Hepatoprotective Activity of Royal Jelly on Mercuric Chloride–induced Damage Model in Rats. *J Rep Pharm Sci* 8(2): 181-187
71. **Jin X**, Lok E, Caldwell D, Mueller R, Kapal K, Liston V, Kubow S, Man Chan H, Mehta R (2009) Dietary fats altered nephrotoxicity profile of methylmercury in rats. *J Appl Toxicol* 29: 126-140
72. **Johnston JE**, Sepe HA, Miano CL, Brannan RG, Alderton AL (2005) Honey Inhibits Lipid Oxidation in Ready-to-Eat Ground Beef Patties. *Meat Sci* 70(4): 627-631
73. **Joshi D**, Kumar MD, Kumar SA, Sangeeta S (2014) Reversal of Methylmercury-Induced Oxidative Stress, Lipid Peroxidation, and DNA Damage by the Treatment of N-Acetyl Cysteine: A Protective Approach. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 33(2): 167-182
74. **Joshi D**, Mittal DK, Bhadauria M, Nirala SK, Shrivastava S, Shukla S (2010) Role of micronutrients against dimethylmercury intoxication in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 29(2): 97-103
75. **Joshi D**, Srivastav SK, Belemkar S, Dixit VA (2017) Zingiber officinale and 6-gingerol alleviate liver and kidney dysfunctions and oxidative stress induced by mercuric chloride in male rats: A protective approach. *Biomed Pharmacother* 91: 645-655
76. **Joshi D**, Mittal DK, Shukla S, Srivastav AK (2012) Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethyl mercury toxicity in male albino rats. *Exp Toxicol Pathol* 64(1-2): 103-108
77. **Jubri Z**, Abdul Rahim NB, Aan GJ (2013) Manuka honey protects middle-aged rats from oxidative damage. *CLINICS* 68(11): 1446-1454
78. **Kade IJ**, **Joseph I** (2012) Mercury toxicity on sodium pump and organoseleniums intervention: a paradox. *J Biomed Biotechnol* 2012: 924549
79. **Kalender S**, Uzun FG, Demir F, Uzunhisarcıklı M, Aslanturk A (2013) Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. *Food Chem Toxicol* 55: 456-462
80. **Kandemir FM**, Yildirim S, Kucukler S, Caglayan C, Mahamadu A, Dortbudak MB (2018) Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney. *Biomed Pharmacother* 105: 981-991

81. **Kaplan LA, Rubaltelli FF, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Abramov A (1984a)** Bilirubin. In: *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) CV Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1238-1241
82. **Kaplan LA, Rubaltelli FF, Hammerman C, Vilei MT, Leiter C, Abramov A (1984b)** Bilirubin. In: Kaplan LA, Pesce AJ. editors. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. C V Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1238-12341
83. **Khan AT, Atkinson A, Graham TC, Shireen KF (2001)** Uptake and distribution of mercury in rats after repeated administration of mercuric chloride. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 36(10): 2039-2045
84. **Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer Jr HC (2008)** Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* 47(4): 1363-1370
85. **Koller A (1984)** Total serum protein. Kaplan A et al. *Clin Chem*, CV Mosby Company St Louis. Toronto. Princeton: 1316-1324 and 418
86. **Lakshmi R, Kundu R, Thomas E, Mansuri AP (1991)** Mercuric chloride induced inhibition of acid and alkaline phosphatase activity in the kidney of Mudskipper; *Boleophthalmus dentatus*. *Acta hydrochim Hydrobiol* 19(3): 341-344
87. **Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y (2015)** The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 16(11): 26087-26124
88. **Liss G, Greenberg RA, Tamburro CH (1985)** Use of serum bile acids in the identification of vinyl chloride hepatotoxicity. *Am J Med* 78(1): 68-76
89. **Liu W, Xu Z, Li H, Guo M, Yang T, Feng S, Xu B, Yu Deng (2016)** Protective effects of curcumin against mercury-induced hepatic injuries in rats, involvement of oxidative stress antagonism, and Nrf2-ARE pathway activation. *Hum Exp Toxicol* 36(9): 949-966
90. **Mahboob M, Shireen KF, Atkinson A, Khan AT (2001)** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. *J Environ Sci Health B* 36(5): 687-697
91. **Majlesi M, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J, Eskandari MH (2017)** Effect of Probiotic *Bacillus Coagulans* and *Lactobacillus Plantarum* on Alleviation of Mercury Toxicity in Rat. *Probiotics Antimicrob Proteins* 9(3): 300-309
92. **Manitius J, Baines A, Roszkiewicz A (1995)** The effect of high fructose intake on renal morphology and renal function in rats. *J Physiol Pharmacol* 46(2): 179-183
93. **Manju M, Jagadeesan G (2019)** In vivo hepatoprotective effect of caffeic acid on mercuric chloride-induced biochemical changes in albino wistar rats. *Asian J Pharm Clin Res* 12(4): 119-124
94. **Mumtaz S, Ali S, Khan R, Andleeb S, Ulhaq M, Khan MA, Shakir HA (2019)** The protective role of ascorbic acid in the hepatotoxicity of cadmium and mercury in rabbits. *Environ Sci Pollut Res Int* 26(14): 14087-14096
95. **Murray RL (1984a)** Creatinine In: *Clinical Chemistry; Theory, Analysis and Correlation*, Kaplan LA, Pesce A J (Eds.). CV Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1247-1253
96. **Murray RL (1984b)** Aspartate aminotransferase in: *Clinical Chemistry; Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) C V Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1112-1116

97. **Murray RL (1984c)** Alanine aminotransferase. In: Clinical Chemistry; Theory, Analysis and Correlation. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) C V Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1088-1090
98. **Naito HK** Cholesterol (1984) In: Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) C V Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1194-1206
99. **Necib Y, Bahi A, Zerizer S (2013)** Amelioration of mercuric chloride toxicity on rat liver with argan oil and sodium selenite supplements. *Int J Pharm Bio Sci* 4(2): (B) 839-849
100. **Nemoseck TM, Carmody EG, Furchner-Evanson A, Gleason M, Li A, Potter H, Rezende LM, Lane KJ, Kern M (2011)** Honey promotes lower weight gain, adiposity, and triglycerides than sucrose in rats. *Nutr Res* 31(1): 55-60
101. **Obead Abd-Allh S (2014)** Precautionary Effect of Ginkgo biloba Against Mercury-Induced Acute Nephro-Hepatotoxicity in male Rats. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences/* 9(22): 2390-2405
102. **Oda SS, El-Ashmawy IM (2012)** Protective Effect of Silymarin on Mercury-Induced Acute Nephro-Hepatotoxicity in Rats. *Glob Vet* 9 (4): 376-383
103. **Oguz S, Salt O, Ibis AC, Gurcan S, Albayrak D, Yalta T, Sagiroglu T, Erenoglu C (2018)** Combined Effectiveness of Honey and Immunonutrition on Bacterial Translocation Secondary to Obstructive Jaundice in Rats: Experimental Study. *Med Sci Monit* 24: 3374-3381
104. **Othman MS, Safwat G, Aboulkhair M, Abdel Moneim AE (2014)** The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem Toxicol* 69: 175-181
105. **Pal M, Ghosh M (2012)** Studies on comparative efficacy of  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food Chem Toxicol* 50(3-4): 1066-1072
106. **Peixoto NC, Pereira ME (2007)** Effectiveness of  $ZnCl_2$  in protecting against nephrotoxicity induced by  $HgCl_2$  in newborn rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 66(3): 441-446
107. **Peixoto NC, Rocha LC, Moraes DP, Bebianno MJ, Dressler VL, Flores EMM, Pereira ME (2008)** Changes in levels of essential elements in suckling rats exposed to zinc and mercury. *Chemosphere* 72(9): 1327-1332
108. **Peronny S (2005)** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. MNHN Paris, France : page35
109. **Perottoni J, Rodrigues OED, Paixão MW, Zeni G, Lobato LP, Braga AL, Rocha JBT, Emanuelli T (2004)** Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol* 42(1):17-28
110. **Pesce A (1984)** Lactate dehydrogenase in: Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) C V Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 438, 1124-1117
111. **Rana MN, Tangpong J, Rahman MM (2018)** Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review. *Toxicol Rep* 5: 704-713

112. **Ravichandra** VD, Ramesh C, Sridhar KA (2013) Hepatoprotective potentials of aqueous extract of *Convolvulus pluricaulis* against thioacetamide induced liver damage in rats. *Biomed Aging Pathol* 3(3): 131-135
113. **Reshi** MR, Patyar R R, Patyar S (2016) Comparative evaluation of manuka honey with honey in antitubercular drug-induced hepatotoxicity in rats. *Int J Green Pharm; Mandsaur* 10 (2): 117-121
114. **Reus** IS, Bando I, Andrés D, Cascales M (2003) Relationship Between Expression of HSP70 and Metallothionein and Oxidative Stress During Mercury Chloride Induced Acute Liver Injury in Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 17(3): 161-168
115. **Romero-Silva** S, Martinez RMA, Romero-Romero LP, Rodriguez O, Gerardo GCS, Morel N (2011) Effects of honey against the accumulation of adipose tissue and the increased blood pressure on carbohydrate-induced obesity in rat. *Lett Drug Des Discov* 8(1): 69-75
116. **Sadek** K, Beltagy Doha, Saleh E, Abouelkhair R (2016) Camel Milk and Bee Honey Regulate Pro-fibrotic Cytokine Gene Transcripts in Carbon tetrachloride-induced Liver Cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol* 94(11): 1141-1150
117. **Sahhugi** Z, Hasenan SM, Jubri Z (2014) Protective effects of gelam honey against oxidative damage in young and aged rats. *Oxid Med Cell Longev* Volume 2014: Article ID 673628, 8 pages
118. **Said** NA, Galal SA, Mohammed ZY, Nada AA (2008) Protective effects of dietary dates against the toxicity of mercuric chloride in male albino rats. *Egypt J Comp Path & Clinic Path* 21(4): 29-57
119. **Samat** S, Enchang FK, Hussein FN, Ismail WIW (2017) Four-Week Consumption of Malaysian Honey Reduces Excess Weight Gain and Improves Obesity-Related Parameters in High Fat Diet Induced Obese Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* Volume 2017, Article ID 1342150, 9 pages
120. **Sastry** K, **Rao** DR (1984) Effect of mercuric chloride on some biochemical and physiological parameters of the freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Environ Res* 34:343-350
121. **Schultz** A (1984) Uric Acid. In: *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) CV Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1261-1266
122. **Sheikh** TJ, Patel BJ, Joshi DV (2011) Effect of mercuric chloride on oxidative stress and target organ pathology in wistar rat. *J Appl Pharm Sci* 01 (07): 59-61
123. **Singla** S, Kumar NR, Kaur J (2014) In vivo Studies on the Protective Effect of Propolis on Doxorubicin-Induced Toxicity in Liver of Male Rats. *Toxicology International* 21(2): 191-195
124. **Siouda** W, **Abdenmour** C (2015) Can *Urtica dioica* supplementation attenuate mercury intoxication in Wistar rats? *Vet World* 8(12): 1458-1465
125. **Sitasawad** S, Deshpande M, Katdare M, Tirth S, Parab P (2001) Beneficial effect of supplementation with copper sulfate on STZ-diabetic mice (IDDM). *Diabetes Res Clin Pract* 52(1): 72-84
126. **Song** M, Hwang I, Rosenthal M, Harris D, Yamaguchi D, Yi I, Go V (2003) Antidiabetic action of arachidonic acid and zinc in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Metabolism* 52(1): 7-12
127. **Sridhar** MP, Nandakumar N, Rengarajan T, Balasubramanian MP (2013) Amelioration of mercuric chloride induced oxidative stress by *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine via modulating the oxidant – antioxidant imbalance in rat liver. *J Biochem Tech* 4(3): 622-627

128. **Su G**, Wang H, Gao Y, Chen G, Pei Y, Bai J (2017) <sup>1</sup>H-NMR-Based Metabonomics of the Protective Effect of *Coptis chinensis* and Berberine on Cinnabar-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Rats. *Molecules* 22(11): 1855
129. **Tanvir EM**, Afroz R, Alamgir Zaman Chowdhury M, Khalil MI, Hossain MS, Rahman MA, Rashid MH, Gan SH (2015) Honey has a protective effect against chlorpyrifos-induced toxicity on lipid peroxidation, diagnostic markers and hepatic histo architecture. *Eur J Integr Med* 7(5): 525-533
130. **Uma C**, Poornima K, Surya S, Ravikumar G, Gopalakrishnan VK (2012) nephroprotective effect of ethanolic extract of *tabernaemontana coronaria* in mercuric chloride induced renal damage in wistar albino rats. *Int J Chem Eng Appl* 3(4): 269-273
131. **Uzunhisarcikli M**, Aslanturk A, Kalender S, Gokce Apaydin F, Bas H (2016) Mercuric chloride induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The protective effects of sodium selenite and vitamin E. *Toxicol Ind Health* 32(9): 1651-1662
132. **Verma ST**, Gupta I, Dalela AR (1983) in vivo effects of mercuric chloride on tissue ATPase of *Notopterus notopterus*. *Toxicol Lett* 16(3-4): 305-309
133. **Vijayaprakash S**, Langeswaran K, Kumar SG, Revathy R, Balasubramanian MP (2013) Nephro-protective significance of kaempferol on mercuric chloride induced toxicity in wistar albino rats. *Biomed Aging Pathol* 3(3):119-124
134. **Wadaan MAM** (2009) Effects of mercury exposure on blood chemistry and liver histopathology of male rats. *J Pharmacol Toxicol* 4(3): 126-131
135. **Wang H**, Bai J, Chen G, Li W, Xiang R, Su G, Pei Y (2013) A metabolic profiling analysis of the acute hepato toxicity and nephrotoxicity of Zhusha Anshen Wan compared with cinnabar in rats using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Ethnopharmacol* 146(2): 572-580
136. **Wang Y**, Li D, Cheng N, Gao H, Xue X, Cao W, Sun L (2015) Antioxidant and hepatoprotective activity of vitex honey against paracetamol induced liver damage in rats. *Food Funct* 5(5): ID 757126
137. **Watford M** (2002) Small amounts of dietary fructose dramatically increase hepatic glucose uptake through a novel mechanism of glucokinase activation. *Nutr Rev* 60(8): 253-257
138. **Wenger C**, Kaplan A, Rubaltelli FF, Hammerman C (1984) Alkaline phosphatase. In: *Clinical Chemistry. Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA, Pesce AJ (Ed.) C V Mosby Company St Louis, Toronto Princeton: 1094-1098
139. **Winterbourn CC** (1993) Superoxide as an intracellular sink. *Free Radic Biol Med* 14(1): 85-90
140. **Yaman T**, Yener Z, Celik I (2016) Histopathological and biochemical investigations of protective role of honey in rats with experimental aflatoxicosis. *BMC Complement Altern Med* 16:232
141. **Yang L**, Zhang Y, Wang F, Luo Z, Guo S, Strähle U (2020) Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere* 245:125586
142. **Yap IKS**, Clayton TA, Tang H, Everett JR, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Charuel C, Lindon JC, Nicholson JK (2006) An integrated metabonomic approach to describe temporal metabolic dysregulation induced in the rat by the model hepatotoxin allyl formate. *J Proteome Res* 5(10): 2675-2684

## Fonction Hépatique et Rénale : Références

---

143. **Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK (2009)** Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol* 47(6): 1176-1183
144. **Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M (2006)** Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(13): 4952-4957
145. **Zalups RK (1993)** Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. *Toxicology* 79(3): 215-228
146. **Zalups RK (2000)** Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 52(1): 113-143
147. **Zalups RK, Lash LH (2006)** Cystine alters the renal and hepatic disposition of inorganic mercury and plasma thiol status. *Toxicol Appl Pharmacol* 214(1): 88-97
148. **Zhao H, Cheng N, He L, Peng G, Xue X, Wu L, Cao W (2017)** Antioxidant and hepatoprotective effects of *A. cerana* honey against acute alcohol-induced liver damage in mice. *Food Res Int* 101: 35-44

# **|Conclusion et Perspectives**

Dans ce travail, des rats mâles et adultes ont été exposé au mercure pendant 70 jours successif et parallèlement, la co-administration de deux types de miel sucré et amer, afin d'identifier l'effet protecteur possible du miel contre l'effet repro, hépato et nephrotoxique du mercure et pour la première fois, l'étude sur le miel amer (Arbousier) a été réalisée sur un animal. En premier lieu, une étude comparative a été procédée entre les deux miels dans le but d'essayer de voir s'il y a une différence dans la composition physico-chimique, les composants bioactives et les tests de la capacité anti-oxydante et radicalaire des miels.

Les résultats obtenus de cette étude peuvent être résumés dans les points suivants :

- **Chapitre : Miel**

- L'étude physico-chimique reflète la qualité du miel sucré et amer puisque les paramètres calculés ; pH, humidité, matière sèches (TS, TSS), densité et l'acidité libre rentrent dans les normes internationales selon le codex alimentarius.
- Le bilan des sucres réducteurs, mentionnent que le miel amer contient 6 fois moins de saccharose que dans le miel sucré.
- La quantité de composants bioactives (polyphénols, flavonoïdes et tannins) dans le miel amer est élevée que dans le miel sucré.
- Le test de DPPH révèle une activité radicalaire plus importante dans le miel amer que le miel sucré.
- Le pouvoir antioxydant du test FRAP révèle que la réduction du fer ferreux en fer ferrique se sature très vite dans le miel amer que dans le miel sucré ce qui démontre que le miel amer contient plus d'antioxydants que le miel sucré.

- **Chapitre : La Fonction Testiculaire**

La période d'exposition choisi (70 jours) permet que toutes les étapes de la spermatogenèse soient affectées, à cet égard, les marqueurs de la fonction testiculaire ont révélé les résultats suivants :

- Seulement le poids corporel et le poids relatif des testicules ont diminué chez les rats intoxiqués au mercure.
- La concentration et la mobilité des spermatozoïdes ont diminué dans le groupe Hg.
- Les marqueurs du stress oxydatif ont connu un changement dans l'activité des enzymes antioxydants testiculaire (CAT, GPx) et du GSH mentionnant une réduction dans le groupe Hg, mais le marqueur de la peroxydation lipidique (MDA) a augmenté.
- L'étude histologique des testicules et de l'épididyme a montré des altérations tissulaires multiples.
- La co-administration du miel amer a boosté le poids testiculaire, la concentration des spermatozoïdes et leur mobilité mais aussi l'activité CAT. Le miel sucré a également augmenté le niveau de la GSH et du MDA.

### • Chapitre : La Fonction Hépatique et rénale

Le choix du foie et des reins comme organes d'étude, reflète la fonction de détoxification et de filtration des toxines dans l'organisme de l'animale. Le mercure semble provoquer des dégâts que ce soit au niveau sérique ou au niveau tissulaire. Cette exposition a affirmé les résultats suivants :

- Le poids relatif du foie a diminué tant dit que celui des reins a augmenté chez les rats exposés au Hg.
- Le profil hépatique a montré une augmentation des transaminases (TGP, TGO), de PAL, LDH, Bilirubine totale, des protéines totales et de l'albumine, dans le sang des rats intoxiqués au Hg et les rats traité par les deux types de miel.
- Le profil lipidique a montré une augmentation du cholestérol et des triglycérides dans le groupe Hg.
- Le profil rénal a montré une augmentation de l'urée, la créatinine et de l'acide urique sérique dans le groupe Hg.
- Le profil minéral a montré une diminution du calcium et du sodium sérique dans le groupe Hg, par contre, le taux du chlore et du potassium n'ont pas été affecté par le mercure.
- La glycémie des rats exposés à l'Hg a été augmentée.
- Les marqueurs du stress oxydatif ont démontré une diminution de l'activité de la CAT, le GPx et le taux du GSH ainsi qu'une diminution du MDA.
- L'architecture du tissu hépatique démontre un important œdème interstitiel avec dilatation sinusoidale et pour le tissu rénal une atrophie glomérulaire modérée avec une dilatation de la chambre urinaire chez les rats exposés au Hg.
- La co-administration du miel amer a boosté le poids des reins, de la TGP, des protéines totales, du cholestérol, de l'urée, du Ca, de la CAT du foie et des reins, de la GPx et le GSH des reins et le MDA du foie. Tant dit que, la co-administration du miel sucré a restauré le taux de la TGO, de la PAL, du LDH, de la bilirubine totale, de l'acide urique, de la glycémie, de la GPx et GSH du foie et le MDA des reins.

Enfin, l'utilisation du miel sucré et amer suggère une protection assez intéressante contre la toxicité du Hg et que le miel amer a donné à la limite une meilleure protection grâce aux résultats des marqueurs étudiés que le miel sucré, mais aussi l'étude histologique qui a prouvé à la fin l'état de restauration des tissus (testicules, épидidyme, foie et reins) par les deux types de miels co-administrés avec le Hg. Ce qui confirme, les résultats trouvés dans le premier chapitre que le miel amer contient plus d'antioxydant que le miel sucré.

### Comme perspectives nous proposons :

- ✚ Étudier les capacités de détoxification à travers les dosages de tous les éléments de la cascade enzymatique du système de détoxification notamment le GST, SOD et les métallothionines ainsi que les protéines de stress ; Heat Shock Protein (HSP).
- ✚ Analyser à l'aide d'HPLC les différents antioxydants présents dans les deux types de miels.
- ✚ Approfondir les recherches sur le mécanisme d'action du miel sur la reproduction.
- ✚ Tester les deux types de miels sur le système immunitaire, ainsi que les cellules cancéreuses, lymphocytaires, virales...etc.
- ✚ Comparer les résultats du miel amer avec les différentes parties de la plante d'Arbousier : fruit, feuilles, racines.
- ✚ Étudier l'effet du marqueur dominant du miel amer acide homogénique au niveau cellulaire.

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

# |Annexe

**I- Préparations des solutions :****1- Composition physico-chimique du miel :****▪ Sucres réducteurs :**

- **Solution de Carrez I :** Dissoudre dans l'eau 21,95 g d'acétate de zinc dihydraté  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  ou 24 g d'acétate de zinc trihydraté  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$  et 3 ml d'acide acétique glacial. Compléter à 100 ml avec de l'eau.
- **Solution de Carrez II :** Dissoudre dans l'eau 10,6 g d'hexacyanoferrate II de potassium trihydraté,  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ . Compléter à 100 ml avec de l'eau.
- **Réactif selon LUFF-SCBOORL :**

Préparer les solutions suivantes :

**\*Solution de sulfate de cuivre (II) :** dissoudre 25 g de sulfate de cuivre (II) pentahydraté,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , exempt de fer, dans 100 ml d'eau,

**\*Solution d'acide citrique :** dissoudre 50 g d'acide citrique monohydraté,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , dans 50 ml d'eau,

**\*Solution de carbonate de sodium :** dans un ballon jaugé de 1 l dissoudre 143,8 g de carbonate de sodium anhydre dans 300 ml environ d'eau chaude. Laisser refroidir.

- **Solution d'amidon :** ajouter un mélange de 5 g d'amidon soluble dans 30 ml d'eau à 1 l d'eau bouillante. Faire bouillir durant trois minutes, laisser refroidir, ajouter éventuellement 10 mg d'iodure de mercure (II) comme agent conservateur. - Acide sulfurique 3 N. - Solution à 30 % (m/v) d'iodure de potassium. - Granulés de pierre ponce bouillis dans l'acide chlorhydrique, lavés à l'eau jusqu'à disparition de l'acidité et séchés. - Hydroxyde de sodium 0,1 N. - Acide chlorhydrique 0,1 N. - Solution à 1 % (m/v) de phénolphtaléine dans l'éthanol.

**2- Activité anti-oxydante :****▪ Polyphénols totaux :**

- Dilution du Folin ciocalteu 1/10 : 1 ml de Folin dissous dans 9 ml d'eau distillé.
- Solution de Carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  (7.5 %) : 7.5 g dans 100 ml d'eau distillé.
- Etalon : Acide gallique : 1 mg A.g./1 ml d'eau distillé.

▪ **Flavonoïdes :**

- $\text{NaNO}_2$  : 0.5g dans 10 ml d'eau distillé.
- Solution  $\text{NaOH}$  (1N) = 4% : 4g dans 100 ml d'eau distillé.
- Solution  $\text{AlCl}_3$  : 10g dissous dans 100 ml d'eau distillé.
- Etalon : Quercetine / Catéchine : 1mg/1ml d'eau distillé.

▪ **Tanins totaux :**

- Solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (5%) : 0.5 g dissous dans 100 ml d'eau distillé.
- Etalon Acide Tannique : 1mg/1ml d'eau distillé.

▪ **Test d'activité antioxydante DPPH :**

- Solution méthanolique : 0.04 g de DPPH/ litre de méthanol.

▪ **Test d'activité antioxydante FRAP :**

- Solution ferricyanure (10%) : 0.5 g dans 50 ml d'eau distillé.
- Solution  $\text{FeCl}_3$  (0.1 %) : 50 mg dans 50 ml d'eau distillé.
- Solution TCA (10%) : 5g dans 50 ml d'eau distillé
- Etalon : 1mg d'Acide ascorbique/1ml d'eau distillé.

**3- Stress oxydant :**

▪ **Gluthation (GSH) :**

- Solution EDTA (0,02 M) : Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750ml d'eau distillée.
- Solution DTNB (0,01 M) : Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.
- Solution d'acide salicylique (0,25 %) : Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

▪ **Gluthation peroxydase (GPx) :**

- Solution TBS : Tris (50 mM,  $\text{NaCl}$  (150 mM) : Dissoudre 8,775g  $\text{NaCl}$  dans 1l d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1l par la solution  $\text{NaCl}$  (150 mM) et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant  $\text{HCl}$  ou  $\text{NaOH}$ .
- Solution du GSH (0.1 mM) : Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution TCA (1 %) : Dissoudre 1g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution DTNB (1,0 mM) : Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

▪ **Catalase (CAT) :**

\*Tampon phosphate (0,1M) :

- Solution (A) : dissoudre 1.7423 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dans 100 ml d'eau distillée.

- Solution (B) : dissoudre 1.3609 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans 100 ml d'eau distillée.
  - **Malondialdéhyde (MDA) :**
- Solution TCA (20 %) : Dissoudre 20 g de TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution Tris : Dissoudre 0,15 g de tris dans 50 ml d'eau distillée.
- Solution TBA (0,67 %) : Dissoudre 0,33 g de TBA dans 50 ml de la solution tris.
  - **Dosage des protéines par la méthode de Bradford :**

**\*Solution BSA (1 mg/ml) :**

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

**\*Réactif de Bradford :**

- Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95 %). Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85 %) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 l de solution).

\*Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4 °C et à l'abri de la lumière.

**II- Gammes d'étalonnage :**

- Réalisation de la gamme d'étalonnage de l'Acide gallique :

|  |      |      |       |       |       |       |       |       |
|--|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>A Gal (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | 5    | 10   | 25    | 100   | 150   | 200   | 250   | 300   |
| <b>DO à 760 nm</b>                         | 0.08 | 0.14 | 0.266 | 0.901 | 1.262 | 1.701 | 1.979 | 2.339 |

- Réalisation de la gamme d'étalonnage de la catéchine :

|   |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Catéchine(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | 25    | 50    | 75    | 100   | 150   | 200   | 250   | 300   |
| <b>DO à 510 nm</b>                            | 0.018 | 0.061 | 0.138 | 0.206 | 0.293 | 0.422 | 0.566 | 0.665 |

- Réalisation de la gamme d'étalonnage de l'Acide tannique :

|  |       |       |       |       |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>A Tan (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | 10    | 20    | 40    | 60    | 80    | 100   | 120   |
| <b>DO à 700</b>                            | 0.295 | 0.403 | 0.615 | 0.803 | 0.997 | 1.258 | 1.432 |

- Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines :

|                    |   |       |       |       |       |       |
|--------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>BSA (mg/ml)</b> | 0 | 0.2   | 0.4   | 0.6   | 0.8   | 1.0   |
| <b>DO à 595 nm</b> | 0 | 0.158 | 0.281 | 0.407 | 0.510 | 0.633 |

- Réalisation de la gamme d'étalonnage de MDA :

|                                     |   |       |      |      |       |       |
|-------------------------------------|---|-------|------|------|-------|-------|
| <b>1,1,3,3-tetraoxypropane (ml)</b> | 0 | 0.20  | 0.40 | 0.80 | 1.60  | 2.00  |
| <b>DO à 530 nm</b>                  | 0 | 0.111 | 0.2  | 0.4  | 0.743 | 0.935 |

# **|Productions Scientifiques**

### Productions Scientifiques

Le travail exposé dans cette thèse de doctorat a fait l'objet de publication scientifique et a été présenté par communications lors des congrès scientifiques nationaux et internationaux.

➤ **Publication scientifique :**

Otmani I, Abdennour C, Dridi A, Kahalerras L, Halima-Salem A. (2019) Characteristics of the bitter and sweet honey from Algeria Mediterranean coast, *Veterinary World*, 12(4): 551-557. doi: 10.14202/vetworld.2019.551-557.

➤ **Communications scientifiques :**

- 1- **Otmani I.** ; Abdennour C. & Boulakoud MS. Evaluation de l'effet reprotoxique du mercure et du potentiel d'atténuation du miel chez le rat wistar. 1<sup>ier</sup> Colloque International d'Ecophysiologie Animale et Biodiversité. Université Houari Boumediene d'Alger, 22-23, 2016.
- 2- **Otmani I.** ; Abdennour C. & Boulakoud MS. L'effet protecteur du miel contre la reprotoxicité induite par le mercure chez le rat wistar. 1<sup>ier</sup> Colloque International en Toxicologie et Santé. Université 8 Mai 1945 de Guelma, 28-29, 2016.
- 3- **Otmani I.** & Abdennour C. Preventive effect of honey on biochemical markers of Wistar rats under mercury intoxication. 16<sup>ème</sup> journées internationales de Biotechnologie (JIB), Hôtel Marco Polo, Hammamet, Tunisie, 18-22 Décembre 2017.
- 4- **Otmani I.** ; Kahalerras L. et Abdennour C. L'effet toxique du mercure sur l'hématologie et le rôle protecteur possible du miel chez le rat Wistar. VI<sup>ème</sup> congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, Hôtel THABRACA –Tabarka, Tunisie, 20-23 Mars 2018.
- 5- **Otmani I.** & Abdennour C. Effet du mercure sur la variation du taux du glutathion suivie d'un traitement par deux types de miel chez le rat Wistar. Le premier séminaire international sur l'agroalimentaire « SIA 2018 ». Université 8 Mai 1945 de Guelma-Algérie, 16-17 octobre, 2018.
- 6- **Otmani I., Dridi A., Kahalerras L., Abdennour C.** Etude du potentiel antioxydant et de l'activité anti-radicalaire de deux types de miel di nord-est Algérien. 30<sup>ème</sup> congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) à Sousse, Tunisie du 25-28 mars 2019.
- 7- **Otmani I.** Abdennour C. Le miel protège les marqueurs sanguins chez le rat intoxiqué au mercure. Séminaire national de biologie, environnement et santé (SNBES), 8-9 octobre 2018, Université 20 aout 1955 Skikda (Algérie).
- 8- **Otmani I., Kahalerras L., et Abdennour C.** Effet préventif du miel poly floral et mono floral sur la fonction testiculaire suite à une exposition chronique au mercure. 1<sup>ier</sup> séminaire de Toxicologie « Perturbateurs endocriniens : risques et Impact sur la Santé ». Université Badji Mokhtar Annaba le 18 et 19 Septembre 2019.

## Characteristics of the bitter and sweet honey from Algeria Mediterranean coast

Ines Otmani<sup>1</sup>, Cherif Abdennour<sup>1</sup>, Amina Dridi<sup>2</sup>, Labiba Kahalerras<sup>1</sup> and Abdelaziz Halima-Salem<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar-Annaba, Annaba, Algeria; 2. Department of Biology, Laboratory of Plant Biology and Environment, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar-Annaba, Annaba, Algeria; 3. Department of Pharmacy, Laboratory of Bromatology and Hydrology, Faculty of Medicine, University of Badji Mokhtar-Annaba, Annaba, Algeria.

**Corresponding author:** Ines Otmani, e-mail: [otmani.ines@yahoo.fr](mailto:otmani.ines@yahoo.fr)

**Co-authors:** CA: [cherifabdenour8@gmail.com](mailto:cherifabdenour8@gmail.com), AD: [bilamina@hotmail.com](mailto:bilamina@hotmail.com), LK: [labiba.kahalerras@gmail.com](mailto:labiba.kahalerras@gmail.com), AH: [hSabdelaziz@yahoo.fr](mailto:hSabdelaziz@yahoo.fr)

**Received:** 26-11-2018, **Accepted:** 22-02-2019, **Published online:** 17-04-2019

**doi:** 10.14202/vetworld.2019.551-557 **How to cite this article:** Otmani I, Abdennour C, Dridi A, Kahalerras L, Halima-Salem A (2019) Characteristics of the bitter and sweet honey from Algeria Mediterranean coast, *Veterinary World*, 12(4): 551-557.

### Abstract

**Aim:** This study aimed to compare the physicochemical, the biochemical, and the antioxidant characteristics of unifloral bitter honey and polyfloral sweet honey.

**Materials and Methods:** Unifloral bitter and polyfloral sweet honey samples were, respectively, harvested in January and July, and then, they were extracted by the traditional method. The markers of refractive index, pH, free acidity, Brix index, density, reducing sugars, total polyphenols, flavonoids, tannins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) were evaluated.

**Results:** The obtained results showed that the physicochemical parameters are within the normal ranges, in which they meet the international standards (Codex Alimentarius). For biochemical constituents, matching concentrations of reducing sugars (glucose+fructose) were observed in both samples, while that of sucrose were very low in unifloral than polyfloral honey. The levels of the active ingredients showed a difference in total polyphenols and tannins of the two types of honey studied, whereas that of flavonoids were almost similar. The antioxidant activity of various samples evaluated by DPPH and FRAP indicated that unifloral has a superior activity.

**Conclusion:** Compared to polyfloral honey, unifloral bitter honey has lower sucrose, high total polyphenols, and tannins levels, in addition to higher antioxidant potential.

**Keywords:** antioxidant activity, bitter honey, flavonoids, polyphenols, sweet honey.

### Introduction

The honeybee has been known for its healing and nutritional benefits since antiquity. Honey is not only used for the treatment of human diseases, but also it is extended to domestic animals, as it is effective during infections and wound injuries in inhibiting the growth of fungi and bacteria, even in the case of microorganism resistance. Previously, researchers proved that the properties of honey make it as one of the important natural antioxidants [1,2]. In addition, it was reported that honey with higher water content, darker color, and high phenolic content has more antioxidant activity [3,4]. However, the physicochemical properties, the chemical composition, and the therapeutic applications were reported concerning honey from many parts of Algerian territory [5-9]. At this point, honey is known in traditional medicine as a preventive as well

as a treating agent by boosting the immunity, fighting anemia, healing wounds, stabilizing heart function, activating digestion, curing skin allergy, and inhibiting pathogenic bacteria [2,3].

Honey chemical composition can be affected by the climatic factors and the plant species. The major nectar of polyfloral honey in Algeria is collected during spring-time characterized by high plant diversity [6,7,10,11]. On the other hand, unifloral bitter honey is produced mainly from the nectar of the strawberry tree *Arbutus unedo*, a typical product of Mediterranean basin, in late autumn-early winter where the flowers of other plants are scarce. Thus, the physicochemical properties, the chemical composition, and the antioxidant activities of strawberry tree honey (STH) have given much attention in the northern Mediterranean region [12-15]. Indeed, the knowledge has been widened recently, in which it was suggested to be used as a chemopreventive agent due to its potentiality to inhibit colon cancer even at low concentration [15]. Despite that, little is known in terms of its physicochemical parameters and bioactive properties, at the local level, although bitter honey produced from the strawberry tree is a field of attraction among local population regarding its therapeutic advantages and respectable reputation.

Copyright: Otmani, *et al.* Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

This study aimed to compare the physicochemical, the biochemical, and the antioxidant characteristics of unifloral bitter honey and polyfloral sweet honey. Both kinds of honey were collected from Algeria Mediterranean coast.

## Materials and Methods

### Ethical approval

The Ethical Committee of Animal Sciences at the University of Badji Mokhtar-Annaba has given the authorization to realize the Ph.D. research program.

### Sample collections

Two types of honey were obtained from two unpolluted sites situated at Skikda Province, Northeastern Algeria, from experienced traditional beekeepers. Unifloral honey was obtained in January from Cap de Fer forest at El Marsa (H2) (Geographic coordinates: Latitude: 37.0299, Longitude: 7.25317; 37°1'48"North, 7°15'11" East), where the available nectar was dominated by strawberry tree flowers (*A. unedo*) during November-December. Polyfloral ripen honey was collected in July from Bourzem countryside, daïra of Sidi Mezghiche (H1) (Geographic coordinates: Latitude: 36.6833, Longitude: 6.71667; 36°40'60"North, 6°43'0" East), having high biodiversity of flowery plants and remote from any type of pollution. The ripen honeys were extracted by the traditional method in which honey was removed from frames by centrifugal forces, filtered, placed in glass containers, and then stored in a dark place at room temperature.

### Physicochemical properties

The pH, refraction index, Brix concentration, density, and free acidity content were evaluated using the Harmonized Methods of the International Honey Commission [16].

#### The pH

The pH was measured using a HI 9025-HANNA pH meter on a 10% honey solution in distilled water [17].

#### Humidity

The humidity (water content) was obtained by the optical measurement of the refractive index of honey at 20°C by the use of correction coefficient  $0.00023/^\circ\text{C}$ . A drop of honey was taken by spatula, and then, it was deposited and spread thinly on the prism plate. Reading was made through the eyepiece at the horizontal dividing line between the light and the dark areas. The result of the refractive index obtained was compared to the Chataway table [16], which indicates the corresponding humidity in honey as a percentage.

#### Total dry matter

Dry matter of honey was calculated as total soluble solids (TSS) and total solids (TS). The TSS was measured by an Exacta and Optech Labcenter Abbe Refractometer (Model RMT) and the results were expressed in Brix. All the measurements were done at ambient temperature and the readings were corrected for a standard temperature of 20°C by adding the

correction factor of  $0.00023/C$  [14]. The total soluble (TS) of honey sample was calculated as a percentage from the results of humidity using the following formula:  $\text{TS} (\%) = 100 - \text{humidity}$  [18].

#### Specific gravity

According to Nandaa *et al.* [19], the specific weight "density" of honey depended mainly on its water content. The test portion was 5 ml of honey and the same for the distilled water that was weighed. The density of honey was given by the following formula:  $d = m/m^3$ .

#### Free acidity

The acidity level was obtained by the titrimetric method. 10 g of sample was dissolved in 75 ml of carbon dioxide-free water in a 250 ml beaker. The solution was stirred and then titrated with 0.05 N sodium hydroxide (NaOH) (Chem-Lab NV, Belgium) to pH=8.3, in the presence of 4-6 drops of phenolphthalein until a persistent pink color appeared for 10 s. A blank test with distilled water was performed, and the volume of soda was corrected. Free acids and hydrogen ions were released by undissociated acids during titration [17]. The acidity level was expressed in mEq/kg honey.

#### Determination of sugars

Reducing sugars (glucose and fructose) and sucrose were evaluated by the method of Luff-Schoorl [20], where sugars were extracted with water and then measured before and after inversion. Results were calculated according to the table of Luff-Schoorl which indicates the number of mg of sugars corresponding to (n2-n) and (n2-n1) ml of 0.1 N sodium thiosulfate pentahydrate (BIOCHEM, Chemopharma, Canada) per 25 ml of sugar solution, with n: Before inversion, n1: After inversion, n2: Control.

#### Determination of active compounds

##### Total polyphenols

The estimation of total phenolic compounds was carried out by the Folin-Ciocalteu colorimetric method. The honey was diluted in distilled water (500 mg/ml). Then, 1.5 ml of the Folin-Ciocalteu reagent (CARLO ERBA, France) (diluted with 1 ml of the reagent in 10 ml of distilled water) and 1.2 ml of the sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, USA) (7.5%) were added to 0.3 ml of diluted honey. After incubation in the dark for 1 h, the absorbance was obtained at 760 nm. The concentration of total phenolic compounds was determined by reference to the calibration curve of gallic acid performed in parallel [21]. Results were expressed in mg of gallic acid (Biochem, Chemopharma, Canada) per 100 g of honey (mg GAE/100 g).

##### Total flavonoids

Total flavonoid content of honey was determined by a colorimetric method. 1 ml of honey was mixed with 4 ml of distilled water, and then, 0.3 ml of sodium

nitrite (Biochem, Chemopharma, France) solution was added. After 6 min, 0.3 of aluminum chloride (Sigma-Aldrich, Germany) (10%) was added, the mixture was left standing for 6 min, and then, 2 ml of NaOH 1N (Chem-Lab NV, Belgium) solution was added, and the total was adjusted to 10 ml with distilled water. The mixture was allowed to stand for 15 min, and then, the absorbance was measured relative to blank at 510 nm [22]. Results were expressed relative to catechin (mg catechin/g dry matter).

**Total tannins**

Total tannins were measured by the method of Folin-Denis [23]. The colorimetry of the tannins was based on the measurement of the blue color formed by the reduction of phospho tungsto molybdic acid by tannins like compound in an alkaline medium. 1.0 ml of extract and a standard solution of tannic acid (100-800 µg/ml) were made up to 7.5 ml with distilled water. Then, 0.5 ml Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, USA) and 1 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA) solution were added. The volume was made up to 10 ml with distilled water, and then, the absorbance was read at 700 nm. The total tannin content was expressed as mg of tannic acid equivalent/g extract [24].

**Determination of antioxidant activities**

*Free radical scavenging activity (DPPH assay)*

The antioxidant properties of the honey sample were studied by evaluating the free radical scavenging activity of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, which was based on the method of Boulilaa *et al.* [25]. The DPPH radical was one of the most commonly used substrates for rapid and direct assessment of antioxidant activity due to its radical-shaped stability and simplicity of analysis [26]. Inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was defined as the concentration of honey that inhibits 50% of the DPPH radical. The lower value of the IC<sub>50</sub> (substrate concentration that causes 50% inhibition of DPPH activity) indicated higher antioxidant activity. 1 ml of each honey extract at different concentrations was mixed with 2 ml of a methanolic solution of DPPH at 0.04 g/l. After 60 min incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm using methanol as a blank. The DPPH inhibition percentages were calculated according to the following formula: DPPH (% inhibition)=(A<sub>0</sub>-Aeq)/A0×100, where A<sub>0</sub> and Aeq are the absorbance of the control and the sample, respectively. The curve expressing the percentage inhibition of DPPH as a function of the concentration of the antioxidant (µg/ml) made it possible to deduce the IC<sub>50</sub> defined as the concentration of antioxidant necessary to decrease the initial concentration of the DPPH at 50%.

*Ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP assay)*

The FRAP assay was based on the ability of antioxidants to reduce ferric iron Fe<sup>3+</sup> to ferrous iron Fe<sup>2+</sup>.

FRAP assay was measured according to the method of Oyaizu [27]. After dilution with distilled water, 1 ml of each honey sample was mixed with 2.5 ml of phosphate buffer solution (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 ml of potassium ferricyanide at 1% (m/v). The mixture was then incubated at 50°C for 20 min. 2.5 ml of 10% (w/v) trichloroacetic acid was then added, and the mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. To 2.5 ml of each supernatant, 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of 0.1% (w/v) ferric chloride were added. The absorbance was measured at 700 nm against methanol as a blank. Ascorbic acid was used as a positive control. The result was expressed by the effective concentration (EC<sub>50</sub>) of the aqueous extract of honey corresponding to an absorbance of 0.5 µg of honey/ml of the mixture (EC<sub>50</sub> in mg/ml).

**Statistical analysis**

Statistical analysis of all results was analyzed using the Microsoft Excel program (2010) and “Minitab 17” software (Student’s t-test). Experiment were prepared in triplicate, where the mean ± standard deviation was calculated.

**Results**

**Physicochemical properties and sugar levels**

Results in Table-1 show the characterization of honey according to their physicochemical properties. The two types of honey are close in their properties, except for bitter honey that has low sucrose level (0.95 g/100 g) compared to sweet honey (5.89 g/100 g).

**Bioactive compounds**

Results indicate that bitter honey had a remarkable raised amount of total polyphenols, flavonoids and tannins than that of sweet honey (Figures-1-3).

**Antioxidant activity**

Table-2 shows that bitter honey had a greater antiradical and antioxidant activity (DPPH and FRAP) than sweet honey. The IC<sub>50</sub> of DPPH was 42.74 mg/m ascorbic acid for sweet honey, but it was 5.72 mg/m ascorbic acid for that of bitter honey. Moreover, the FRAP test recorded wide differences in IC<sub>50</sub> between the two kinds of honey.

**Table-1:** Physicochemical properties and concentration of reducing sugars (glucose and fructose) and sucrose of sweet and bitter honey.

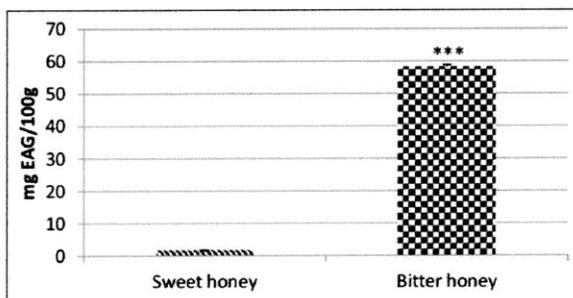
| Parameters       | Units   | Sweet honey | Bitter honey |
|------------------|---------|-------------|--------------|
| pH               |         | 4.30        | 4.59         |
| Refractive index |         | 1.4915      | 1.4845       |
| Humidity         | %       | 18          | 20.8         |
| TSS              | Brix    | 80.5        | 77.7         |
| TS               | %       | 80          | 79.2         |
| Specific gravity |         | 1.38        | 1.40         |
| Free acidity     | mEq/kg  | 41          | 37           |
| Reducing sugars  | g/100 g | 60.4        | 60.4         |
| Sucrose          | g/100 g | 5.89        | 0.95         |

TSS=Total soluble solids, TS=Total solids

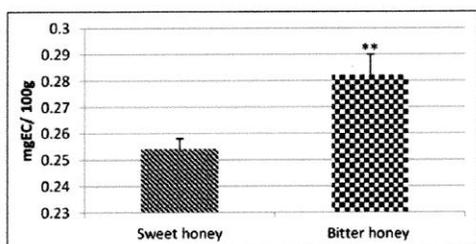
**Table-2:** The antioxidant activity (DPPH and the FRAP assay) of sweet and bitter honeys.

| Parameters               | Units | Sweet honey | Bitter honey |
|--------------------------|-------|-------------|--------------|
| DPPH (IC <sub>50</sub> ) | mg/ml | 42.74±1.63  | 5.72±0.33    |
| FRAP (IC <sub>50</sub> ) | mg/ml | 106.38±0.82 | 34.91±1.40   |
| Ascorbic acid            | µg/ml | 3.20±0.10   | 2.23±0.13    |

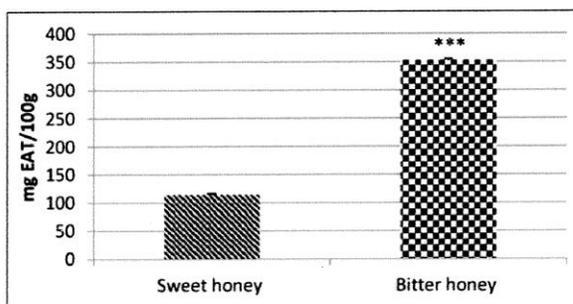
DPPH=2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP=Ferric reducing/antioxidant power, IC<sub>50</sub>=Inhibitory concentration



**Figure-1:** Total phenolic content of polyfloral sweet and unifloral bitter honey. mg GAE/100 g honey: mg Gallic acid equivalent/100 g honey.



**Figure-2:** Total flavonoid content of polyfloral sweet and unifloral bitter honey. mg EC/100 g honey: mg equivalent catechin/100 g honey.



**Figure-3:** Tannin content of polyfloral sweet and unifloral bitter honey. mg ETA/100 g honey:mg equivalent tannic acid/100 g honey.

## Discussion

### Physicochemical properties and sugar levels

Compared to the bitter honey, sweet honey has lower pH, humidity, and specific gravity, but it has higher TSS, TS, and free acidity. The characteristics of sweet and bitter honey collected from sites with close climatic conditions have revealed some interesting differences that were related to their chemical

composition. Subsequently, it is a reasonable expectation that the composition and properties of honey from various locations might differ [28]. In addition, bitter honey was darker to some extent.

The refractive index of the samples studied is between 18% for unifloral and 20.8% for polyfloral (Table-1). The lowest value of unifloral is well below the limit (norms: Max. 21%) recommended by Codex [17], while that of polyfloral is slightly above the recommended values of 20%. Moisture content is an important element in assessing the degree of honey maturity and its shelf life. In general, a high amount of water causes the fermentation of honey, loss of flavor and quality. The fermentation of honey during storage is caused by the action of yeast osmotolerance, leading to the formation of ethyl alcohol and carbon dioxide. The used honey is remote from these conditions since samples were analyzed after a short period of collection. On the other hand, the bitter taste of honey from site H2 is definitely due to the presence of nectars mainly from *A. unedo*, followed by *Inula viscosa* plants because their flowering period is in late autumn and earlier winter. The refractive index of multifloral, *Eucalyptus* and *Citrus*, collected from different regions of Algeria had a water content of 13.9-20.2% [6] and 16-20.4% [5], respectively. Yet, the moisture content of STH was 18.6% and 18.9% for the Portuguese and the Italian, respectively [12,29]. The relatively higher moisture content of bitter honey in this study is probably due to the cold-humid season of production.

The pH values of the two samples analyzed (Table-1) are consistent with those reported by Bogdanov *et al.* [30], who confirmed that honey derived from nectar had a pH of 3.5 to 4.5, while those from honeydew were between 5 and 5.5. Notably, the pH values of Algerian multifloral honey were 3.69-4.48 [11], which looks within the range of the actual investigation. Notably, honey was extracted by the traditional method using hand extractor, and then, it stored in optimal conditions. The pH of the STH honey seems higher, where samples from Portugal showed a mean value of 4.52 [13] and 4.49 [31], while that from Italy had a pH of 4.2 [29].

The value of the free acidity (Table-1) is in the standards of 50 mEq/kg set by the Codex [17]. Hence, acidity is an important criterion of quality; it gives very important indications of honey status [32]. In addition to the organic acids and amino acids, the botanical diversity plays an important role in defining honey final pH. Previously reported, the free acidity of Algeria honey was 47.25-55.25 [33] and that of Moroccan Carob honey varied between 17 and 42 mEq/kg [34]. Italian unifloral STH showed levels of 27.3-53.4 mEq/kg [29] that is near to the actual study.

TSS of honey that represents the dry material mainly sugar compounds was 80.5° for unifloral and 77.7° for polyfloral (Table-1). TS had close values in which it was 80% for sweet honey and 79.2% for bitter

honey. The obtained results are in total agreement with the literature cited [35]. Moreover, the mean levels of TSS (76.2-80.40) from India honey [18] and that of TS (1 79.0-82.2%) from Portugal agreed well with our results for both types of honey. Accordingly, the TSS content of STH samples from south Portugal showed a mean level of 78.35 Brix [13].

The specific gravity of sweet and bitter honey is, respectively, 1.38 and 1.40 (Table-1); they are more or less in the normal range. In Western and Southwestern Algeria, the specific gravity of honey was 1.405-1.442 [33] and for Northeast region was 1.32-1.55 [36]. Accordingly, the specific gravity of Indian honey (1.39-1.49) is almost similar to our results [19]. Notably, it seems that honey samples having high moisture content had the lowest specific gravity and vice versa.

The reducing sugar levels of the current study are 60.4 g/100 g for both types of honey (Table-1). According to the Codex [17], total and reducing sugar content must not be <60 g/100 g of flowery honey, which confirms that the investigated samples are nectar honey. Furthermore, honey from different regions of Northeast Algeria had reduced sugars of 62.5-84.45%, and sucrose was 2.91-15.34%, whereas that of unifloral honey (*Ziziphus jujuba*) was 62.5-90.12% for reduced sugars and 4.24-10.09% for sucrose [8]. It was reported that fructose, glucose, and sucrose level of Finnish and Sweden polyfloral honey was 38.7-43.7, 30.4-38.1, and 0.0 g/100 g, respectively [37]. It looks that the percentage of carbohydrate of sweet honey from this study is close to the Nigerian and Indian results [38,39], but sucrose is much lower in bitter honey with a concentration of only 0.95 g/100 g. For the STH bitter honey, reducing sugars content of this work is lower than that reported from Portugal [13] and Italy [29].

#### Bioactive compounds

The unifloral bitter honey is richer in the total polyphenols than that of sweeter one, suggesting of having better antioxidant potential. Phenolic substances are the main factors responsible for the biological activities of honey. Pakistani honey had a mean of 48.5 mg/100 g honey [40], while Chili honey recorded levels of 0-8.83 mg/100 g honey [41], which is close to our unifloral honey. Interestingly, Italian STH was the richest in total phenols (972 mg/kg GAE) compared with honeydew, heather, *Eucalyptus*, asphodel, *Citrus* spp., and *Acacia* ones [14]. Seemingly, our results agree well with that of Portuguese STH [12], but not with the STH from the different regions of Sardinia, which recorded very low total polyphenols content [15]. Remarkably, homogentisic acid is the main phenolic compound of STH, which might provide an important antioxidant potential. In this study, honey is made mainly from the flowers of strawberry tree *A. unedo*, but the plant *I. viscosa* participates to some extent, in addition to other rare flowers.

The content of flavonoids in both types of honey is almost the same, despite the difference in

color, where the color of bitter samples is darker. In general, darker honey such as sunflower and buckwheat contains higher concentrations of flavonoids than bland honey, as well as greater antioxidant capacity [33]. Further, higher values of flavonoids were recorded in Algerian [42], Pakistani [40], and Malaysian honey [43]. However, Chili honey is within the range of our results, in which it contained between 0.01 and 8.83 mg/100 g honey [41]. The total flavonoids content of STH (65.74-108.20 mg CAE/kg honey) from Sardinia [15] is closely related to our results of unifloral honey, while that from Portugal (4.09-5.77 mg QE/100 g honey) was remarkably lower [13].

The content of tannins has recorded the highest level in bitter honey that is in agreement with the dark color observed. Tannins are phenolic polymers consisting of multiple anthocyanin-like molecules [44]. Indeed, the characteristics of woody aroma and dark color of honey indicate the presence of tannins and lignins. Moreover, polyfloral honey from Benin had values much higher than our polyfloral and unifloral honey [45]. For TSH, it was reported to be more active as an antioxidant agent due to the higher content of tannins [38]; this is likely why the unifloral bitter honey is more appropriate for therapeutic purposes.

#### Antioxidant activity

The DPPH assay provided an  $IC_{50}$  of 42.74 and 5.72 mg/ml ascorbic acid for sweet and bitter honey, respectively (Table-2). The lowest inhibition value indicates a strong ability to trap free radicals [46]. As a result, the DPPH assay was reported to reflect the activity of water-soluble antioxidant. It seems that the DPPH of two unifloral Algerian honey from the southern region had relatively strong values of 10.94 and 6.60  $IC_{50}$  mg/ml honey [47]. Accordingly, other studies revealed that STH of the coastal region of Italy [14] and Croatia [48] also showed higher DPPH activity of, respectively, 4.8 mmol TEAC/kg and 3.34 mmol TEAC/kg, which agree well with this study. Differently, the DPPH of STH has documented very strong activity (0.09-0.20 mmol TE/100 g) from different regions of Sardinia [15].

The FRAP assay has given an  $IC_{50}$  of 106.38 for sweet honey, while it reached 34.91 mg/ml ascorbic acid for bitter honey (Table-2), suggesting a dissimilar antioxidant potential. The antioxidant potential is attributed mainly to the presence of different phenolic components such as flavonoids, phenolic acids, and other compounds that have different antioxidant potentials. In addition, light-colored honey had lower FRAP values than dark-colored one, indicating a strong antioxidant capacity. In Portugal, the reducing power of honey varied between 13.26 and 94.11 mg/ml, depending on honey color [49], a result appears to be similar to the present investigation. For Maltese honey, a significant correlation between the antioxidant activity and total polyphenol was recorded [50]. Opposing to our results, the

FRAP activity of Italian STH was higher ( $11.7 \pm 1.7$  mmol Fe<sup>2+</sup>/kg) than the other unifloral honey such as *Eucalyptus*, *Citrus*, and *Acacia* [14]. On the other hand, Sardinian bitter honey had low FRAP activity of 0.51-0.92 mmol Fe(II)/100 g [15]. Overall, the antioxidant activity noted provides the honey, especially the bitter one with the appropriate power to counteract the oxidative stress generated within cells when exposed to different diseases and toxic agents. Such results confirm some popular undocumented views about the application of STH in treating many diseases such as cancer and digestive disorders.

### Conclusion

In this study, the physicochemical characteristics, biochemical composition, and antioxidant activity of the unifloral bitter honey were investigated and then compared to the polyfloral honey. Both kinds of honey have close physicochemical properties with good quality. Concerning the active compounds, bitter honey contained higher amounts of total polyphenols and tannins, reflected in their strong antioxidant potential. The discussed results indicated that the investigated honey has close characteristics of honey samples reported elsewhere, especially for the Mediterranean basin.

### Authors' Contributions

IO managed the experimental work and wrote the manuscript, CA collected the samples and corrected the manuscript in English language, AD did the assays of the bioactive compounds and the antioxidant activities, LK participated in all the assays realized, and AH carried out the physicochemical study. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

Authors would like to thank The National Research Fund, Algeria (Grant no. FNR/LAB 0033/2016), for financial support to the Laboratory of Animal Ecophysiology. Special thanks are given to Dr. Tarek Hamel for plants' identification.

### Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Publisher's Note

Veterinary World remains neutral with regard to jurisdictional claims in published institutional affiliation.

### References

- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, 533(2): 185-191.
- Boukraâ, L. (2015) Honey in Traditional and Modern Medicine. Traditional Herbal Medicines for Modern Times. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Cardetti, M. and Keen, C.L. (2003) Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agric. Food Chem.*, 51(6): 1732-1735.
- Das, A., Datta, S., Mukherjee, S., Bose, S., Ghosh, S. and Dhar, P. (2015) Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. *J. Food Sci. Technol.*, 61(1): 244-250.
- Chefrour, A., Draiaia, R., Tahar, A., Kaki, Y.A., Bennadja, S. and Battesti, M.J. (2009) Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some North-East Algerian honeys. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.*, 9(5): 1276-1293.
- Makhloufi, C., Kerkvliet, J.D., D'albore, G.R., Choukri, A. and Samar, R. (2010) Characterization of Algerian honey by palynological and physicochemical methods. *Apidologie*, 41(1): 509-521.
- Nair, S., Meddah, B. and Aoues, A. (2013) Melissopalynological characterization of north Algerian honeys. *Foods*, 2(1): 83-89.
- Adjlane, N., Haddad, N., Ameur, K.L., Kesraoui, S. and Moussaoui, D. (2014) Physicochemical and microbiological characteristics of some samples of honey produced by beekeepers in Algeria. *Acta Technol. Agric.*, 17(1): 1-5.
- Haouam, L., Tahar, A., Dailly, H., Lahrichi, A., Chaqroune, A. and Abdenour, C. (2016) Physicochemical properties and major elements contents of Algerian honeys from semi-arid regions. *Emir. J. Food Agric.*, 28(2): 107-115.
- Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Meslem, A. and Bacha, S. (2012) The influence of botanical origin and physicochemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. *J. Plant Pathol. Microb.*, 3(5): 132.
- Bouasla, A. and Bouasla, I. (2017) Ethnobotanical survey of medicinal plants in Northeastern of Algeria. *Phytomedicine*, 36: 68-81.
- Alves, A., Ramos, A., Goncalves, M.M., Bernardo, M. and Mendes, B. (2013) Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J. Food Compos. Anal.*, 30(2): 130-138.
- Ulloa, P.A., Maia, M. and Brigas, A.F. (2015) Physicochemical parameters and bioactive compounds of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Chem.*, Vol. 2015, Article ID 602792, 10 pages.
- Rosa, A., Tuberoso, C.I.G., Atzeri, A., Melis, M.P., Bifulco, E. and Dessì, M.A. (2011) Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chem.*, 129(3): 1045-1053.
- Afrin, S., Forbes-Hernandez, T.Y., Gasparrini, M., Bompadre, S., Quiles, J.L., Sanna, G., Spano, N., Giampieri, F. and Battino, M. (2017) Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ROS generation: A comparison with Manuka honey. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(613): 1-19.
- Bogdanov, S., Martin, P. and Lullmann, C. (2002) Harmonised Methods of the International Honey Commission. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld.
- Codex, A. (2001) Revised Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981. p1-8. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/home/en/November,2018>.
- Saxena, S., Gautam, S. and Sharma, A. (2010) Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chem.*, 118(2): 391-397.
- Nandaa, V., Sarkara, B.C., Sharma, H.K. and Bawa, A.S. (2003) Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *J. Food Compos. Anal.*, 16(5): 613-619.
- Kowalski, S., Łukasiewicz, M. and Berski, W. (2013) Applicability of physicochemical parameters of honey for identification of the botanical origin. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 12(1): 51-59.
- Seladji, M., Bekhechi, C., Beddou, F., Dib, H. and Bendimerad, N. (2014) Antioxidant activity and phytochemical screening of *Nepeta nepetella* aqueous and methanolic

- extracts from Algeria. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 4(2): 12-16.
22. Khodaie, L., Bamdad, S., Delazar, A. and Nazemiyeh, H. (2012) Antioxidant, total phenol and flavonoid contents of two *Pedicularis* L. species from Eastern Azerbaijan, Iran. *Bioimpacts*, 2(1): 43-57.
  23. Polshettiwar, S.A., Ganjiwale, R.O., Wadher, S.J. and Yeole, P.G. (2007) Spectrophotometric estimation of total tannins in some ayurvedic eye drops. *Indian J. Pharm. Sci.*, 69(4): 574-576.
  24. Padma, R., Parvathy, N.G., Renjith, V. and Kalpana, P.R. (2013) Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 4(1): 73-77.
  25. Boulilaa, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I.B., Casabiancag, H. and Hosni, K. (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Ind. Crops Prod.*, 74(1): 485-493.
  26. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A. and Igc, R. (2008) Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium zsativum* L., *Alliaceae*). *Food Chem.*, 111(1): 925-929.
  27. Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr.*, 44(6): 307-315.
  28. Ciappini, M.C. and Stoppani, F.S. (2014) Determination of antioxidant capacity, flavonoids, and total phenolic content in *Eucalyptus* and clover honeys. *J. Apic. Sci.*, 58(1): 103-111.
  29. Oddo, L.P., Piazza, M., Sabatini, A. and Accorti, M. (1995) Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26(6): 453-465.
  30. Bogdanov, S., Lullman, C. and Martin, P. von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Persano Oddo, L., Sabatini, A.G., Marcuzzan, G.L., Piro, R., Flamini, C., Morlot, M., Lhéritier, J., Borneck, R., Marioleas, P., Tsigouri, A., Kerkvliet, J., Ortiz, A., Ivanov, T., D'Arcy, B., Mossel, B. and Vit, P. (1999) Honey quality and international regulatory standards: Review by the International Honey. *Bee World*, 80(2): 61-69.
  31. Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D. and Miguel, M.G. (2013) Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial Portuguese honeys. *J. Food Sci.*, 78(8): C1159-C1165.
  32. Bogdanov, S. (1999) Storage, crystallization and liquefaction of honey. bee product science, www.bee-hexagon.net. Last accessed on 01-04-2019.
  33. Doukani, K., Gacem, N., and Benlarbi, H. (2014) Physicochemical and phytochemical characterization of some Algerian honeys types. *International Journal of Applied, Physical and Bio-Chemistry Research* 4 (6): 1-16.
  34. El-Haskoury, R., Kriaa, W., Lyoussi, B. and Makni, M. (2016) *Ceratonia siliqua* honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. *J. Food Drug Anal.*, 26(1): 67-73.
  35. Oroian, M., Amariei, S., Escriche, I., Gutt, G. (2013) Rheological aspects of Spanish honeys. *Food Bioprocess Tech. J.*, 6(1): 228-241.
  36. Laouar, H. and Tahar, A. (2017) Physicochemical analysis of some honeys from humid regions in North East Algeria. *J. Chem. Pharm. Sci.*, 10(1): 1-5.
  37. Salonen, A., Virjamo, V., Tammelab, P., Faucha, L. and Julkunen, T.R. (2017) Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. *Food Chem.*, 237(1): 214-224.
  38. Adeniyi, K.A., Daudu, O.A.Y., Abubakar, A., Ismail, A.D., Busari, M.B., Abdulsalami, H. and Oyibo-Uzman, K.A. (2014) Comparative analysis of the proximate and nutritional compositions of Nigerian bitter and sweet honey from *Apis mellifera*. *Int. J. Sci. Res. Publ.*, 4(11): 1-4.
  39. Gopal, V., Joshna, K. and Lavitha, B. (2017) A comparative review on sweet honey and bitter honey. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 8(4): 716-723.
  40. Fahim, H., Dasti, J.I., Ali, I., Ahmed, S., and Nadeem, M. (2014) Physico-chemical analysis and antimicrobial potential of *Apis dorsata*, *Apis mellifera* and *Ziziphus jujube* honey samples from Pakistan. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4(8): 633-641.
  41. Muñoz, O. and Copaja, S. (2007) Content of flavonoids and phenolic compounds in Chilean honeys and antioxidant indice. *Quim. Nova*, 30(4): 848-851.
  42. Khalil, M.I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M.A., Islam, M.N., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2012) Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17(9): 11199-11215.
  43. Ranneh, Y., Ali, F., Zareia, M., Akim, A.M., Hamid, H.A. and Khazaaib, H. (2018) Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. *LWT*, 89: 1-9.
  44. Shrivastava, R. (2011) Clinical evidence to demonstrate that simultaneous growth of epithelial and fibroblast cells is essential for deep wound healing. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 92(1): 92-99.
  45. Azonwadé, F.E., Gbaguidi, B., Paraïso, A., Dah-Nouvlessounon, D.M., Goubalan, E., Baba-Moussa, F., Amoussa, M., Lagnika, L.D., Victorien, and Baba-Moussa, L. (2018) Polyphenolic profile, and antioxidant and antifungal activities of honey products in Benin. *Afr. J. Microbiol.*, 12(1): 9-18.
  46. Kanoun, K. (2010) Contribution to the phytochemical study and antioxidant activity of *Myrtus communis* L. (Rayhane) extracts from the Tlemcen region (Honaine). Memory of magister in natural substances, biological activities and synthesis. Abu Bakr Belkaid University, Tlemcen, Algeria, p118.
  47. Bakchiche, B., Habati, M., Benmebarek, A. and Gherib, A. (2017) Total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of honey and propolis collected from the region of Laghouat (South of Algeria). *World News Natur. Sci.*, 11: 91-97.
  48. Lovakovića, B.T., Lazarusa, M., Karačonjia, I.B., Juricab, K., Semrena, T.Z., Lušičc, D., Brajenovića, N., Pelaićd, Z. and Pizent, A. (2018) Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 45(1): 85-92.
  49. Ferreira, I.C.F., Aires, E., Barreira, J.C.M. and Estevinho, L.M. (2009) Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.*, 114(4): 1438-1443.
  50. Meinen, N., Camilleri, L. and Attard, E. (2014) The antioxidant activity of Maltese honey. *J. Apic. Sci.*, 8(1): 1-60.

\*\*\*\*\*