



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCEN



THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT

Spécialité: *Chimie des Produits Naturels, Analyses & Applications*

Par :

Mme BEREKSI REGUIG Dalila

Sur le thème

***CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET PROPRIETES
BIOCHIMIQUES DE QUELQUES MIELS NATURELS ET SOUS
PRODUITS DE LA RUCHE DE L'OUEST ALGERIEN***

Soutenue publiquement le 03/07/2023 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr	BENGUELLA Belkacem	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr	ALLALI Hocine	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mme	MERAD-BOUSSALAH Noria	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr	KHAROUBI Omar	Professeur	Université d'Oran	Examinateur
Mr	BENMEHDI Houcine	Professeur	Université de Béchar	Examinateur

*Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

Dédicaces

Je dédie ce modeste projet, à la mémoire de mon père, qui, m'a appris la rigueur, le savoir-faire, et le respect des autres.

A ma très chère mère qui est présente à tout moment.

A mon cher mari, qui m'a beaucoup soutenu dans les moments difficiles et encouragé en toutes circonstances.

A mes enfants Youcef, Rania et Ali qui sont les prunelles de mes yeux.

A mes beaux-parents, vos aides étaient précieuses.

A ma sœur, mes frères, mes belles sœurs, mes neveux et mes nièces, à qui je leurs souhaite une vie heureuse et resplendissante.

A toute ma famille et mes amies.

Remerciements

Mes remerciements sont d'abord à Dieu Tout Puissant pour m'avoir donné la force et le courage nécessaires pour mener ce travail à bien.

Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans l'aide de plusieurs personnes, je vais essayer de trouver les bons propos pour exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à ce travail.

A mon directeur de thèse, le Professeur ALLALI Hocine, votre orientation m'a été très avantageuse pour la réalisation de ce travail, votre rigueur et façon de travailler, m'ont permis d'être plus vigilante et soucieuse vis-à-vis de mon travail. Merci pour le temps que vous avez consacré à ma thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail, notamment : Pr BENGUELLA Belkacem (Président), Pr KHAROUBI Omar (Examineur), Pr MERAD-BOUSSALAH Noria (Examinatrice) et Pr BENMEHDI Houcine (Examineur). Je vous remercie d'avoir enrichi cette étude par vos expertises et vos expériences respectives.

A Monsieur le Professeur GHALEM Saïd, directeur du Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO), qui m'a offert l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire.

A Madame MAJDOUB Houria, Maitre de conférences au Département de Biologie, Université Aboubekr BELKAID de Tlemcen, votre collaboration dans la réalisation des tests des activités antioxydante & antidiabétique m'a beaucoup aidé. Merci de m'avoir appris l'expérimentation animale en laboratoire.

A Mademoiselle AISSAOUI Nadia, Maitre de conférences au Centre Universitaire Salhi Ahmed Naâma et Mademoiselle BOUALI Waffa, Maitre de conférences au Département de Biologie, Université Aboubekr BELKAID de Tlemcen, pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne. Merci j'ai beaucoup appris avec vous.

A Monsieur le Professeur KOWALSKI Radosław et son équipe du Département d'Analyse et d'Évaluation de la Qualité des Aliments, Université des Sciences de la Vie de Lublin-Pologne, pour la réalisation des analyses.

A Monsieur le Professeur DIB Med El Amine, Département de Chimie de l'Université Aboubekr BELKAID de Tlemcen, Monsieur BENAOUA Sid Ahmed, Département de Pharmacie, Université Djillali LIABES de Sidi Bel Abbès et Monsieur BOUCHENTOUF Salim & Mademoiselle TAIB Nadjat, Maitres de conférences à l'Université Docteur Tahar Moulay de Saida, votre aide était très précieuse et j'en suis très reconnaissante.

A Mademoiselle KISSI Wardia, ingénieure à l'Institut Technique des Elevages (ITELV-Birtouta, Alger), et Madame HODEIB Jinane vétérinaire à ITELV, votre aide m'a été bénéfique pour la finalisation de mon travail.

A Madame MEHIAOUI Kheira & Monsieur BENMANSOUR Boumediène, ingénieurs au laboratoire LASNABIO & Monsieur KHALDI Boumediène, ingénieur au laboratoire du département de chimie pour votre gentillesse au quotidien et votre amitié.

A tous les membres des équipes de recherches du LASNABIO et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.

ملخص

العسل هو مصدر غذائي طبيعي ومعقد يتمتع بخصائص علاجية معترف بها ومؤكدة في الطب التقليدي. هدف دراستنا كان التحقق جودة 37 عينة من العسل، تم جمعها جميعاً في المنطقة الغربية من الجزائر، من خلال تحليل محتوى العناصر النزرة والمعادن الثقيلة لتحديد مستويات 19 عنصراً في العسل، ومقارنة المركبات الحيوية وخصائص مضادات الأكسدة والمضادة للميكروبات لعينات العسل في الحث الحيوي، وتحديد أفضل عينة لأغراض علاجية محتملة، وفحص تأثير العسل متعدد الأزهار بالإضافة إلى السيتاغليبتين أو الميتفورمين على التحكم في نسبة السكر في الدم في الجرذان السكرية المحفزة بواسطة الستربتوزوتوسين. معظم نتائج المعايير الفيزيوكيميائية (الرطوبة، الرقم الهيدروجيني والحموضة الحرة، التوصيل الكهربائي، السكريات، البرولين، التدوير البصري، اللون) تتوافق مع المعايير المحددة بواسطة "كوديكس الأليمنتاريوس". كان تحليل المعادن كافياً لتحديد المنشأ الزهري، وقد يكون تباينها مرتبطاً بالاختلافات الجيوكيميائية والجغرافية. تشير نتائج الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات إلى أن أفضل عينة من العسل لأغراض علاجية محتملة تتوافق مع الخردل الأبيض الحلو ويمكن استخدامه كبديل في التطبيق العلاجي. مزج الميتفورمين مع العسل يحسن التحكم في نسبة السكر في الدم ويوفر فوائد استقلابية إضافية غير متحققة بالميتفورمين بمفرده.

الكلمات الرئيسية: عسل الجزائر، المعايير الفيزيوكيميائية، محتوى المعادن، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد لمرض السكري.

Résumé

Le miel est un nutriment naturel, complexe aux propriétés thérapeutiques bien établies et reconnues en médecine traditionnelle. Le but de notre étude était de vérifier la qualité de 37 échantillons de miel, tous collectés dans la région ouest de l'Algérie, une analyse de la teneur en oligo-éléments et métaux lourds pour déterminer les niveaux de 19 éléments dans le miel, de comparer *in vitro* les composés bioactifs, les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des échantillons de miels et d'identifier le meilleur échantillon à des fins thérapeutiques potentielles, et enfin d'examiner l'effet du miel multifloral_(S4) en complément de la sitagliptine ou de la metformine sur le contrôle glycémique chez des rats diabétiques induits par la streptozotocine. La majorité des résultats des paramètres physico-chimiques (Humidité, pH et l'acidité libre, HMF, conductivité électrique, sucres, proline, pouvoir rotatoire, couleur), s'accordent avec les normes établies par le *Codex Alimentarius*. L'analyse des minéraux était suffisante pour déterminer l'origine florale, et leur variabilité peut être liée à des différences géochimiques et géographiques. En revanche, tous les éléments détectés étaient à des niveaux inférieurs aux seuils de sécurité. Les résultats des activités antioxydantes et antimicrobiennes montrent que, le meilleur échantillon de miel à des fins thérapeutiques potentielles correspondait à la moutarde blanche douce (S6) et pourrait être utilisé comme alternative dans une application thérapeutique.

La combinaison de la metformine avec du miel, améliore le contrôle glycémique et offre des avantages métaboliques supplémentaires, non obtenus avec la metformine seule.

Mots clés: Miels algériens, paramètres physico-chimiques, teneur en minéraux, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité antidiabétique.

Abstract

Honey is a natural, complex nutrient with well-established and recognized therapeutic properties in traditional medicine. The aim of our study was to verify the quality of 37 honey samples, all collected in the western region of Algeria, an analysis of the content of trace elements and heavy metals to determine the levels of 19 elements in honey, to compare in vitro the bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial properties of honey samples and identify the best sample for potential therapeutic purposes, and finally to examine the effect of multifloral honey (S4) in addition to sitagliptin or metformin on glycemic control in diabetic rats induced by streptozotocin. The majority of the results of the physico-chemical parameters (Humidity, pH and free acidity, HMF, electrical conductivity, sugars, proline, optical rotation, color), agree with the standards established by the *Codex Alimentarius*. Mineral analysis was sufficient to determine the floral origin, and their variability may be related to geochemical and geographic differences. The results of antioxidant and antimicrobial activities show that, the best sample of honey for potential therapeutic purposes corresponded to sweet white mustard (S6) and could be used as an alternative in a therapeutic application.

Combining metformin with honey improves glycemic control and provides additional metabolic benefits not achieved with metformin alone.

Keywords: Algerian honeys, physicochemical parameters, mineral content, antioxidant activity, antimicrobial activity, antidiabetic activity.

Tables des matières

	Pages
<i>Introduction générale</i>	1
<i>Chapitre I: Les sous-produits de la ruche</i>	4
I-1-Introduction.....	4
I-2-Abeille.....	4
I-2-A-Définition.....	4
I-2-B-Types d'abeilles.....	4
I-2-C-Anatomie de l'abeille.....	5
a) <i>Tête</i>	5
b) <i>Thorax</i>	5
c) <i>Abdomen</i>	5
I-2-D-Production du miel.....	6
I-3-Miel.....	6
I-3-A-Définition du miel.....	6
I-3-B-Classification des miels.....	7
a) <i>Miel de nectar</i>	7
b) <i>Miel de miellat</i>	7
I-3-C-Composition chimique du miel.....	8
I-3-D-Propriétés thérapeutiques du miel.....	9
I-4-Propolis.....	9
I-4-A-Définition de la propolis.....	9
I-4-B-Composition chimique de la propolis.....	10
I-4-C-Propriétés thérapeutique de la propolis.....	10
I-5-Pollen.....	11
I-5-A-Définition du pollen.....	11
I-5-B-Composition chimique du pollen.....	11
I-5-C-Utilisation du pollen.....	11
I-5-D-Propriétés thérapeutique du pollen.....	11
I-6-Gelée royale.....	12
I-6-A-Définition de la gelée royale.....	12
I-6-B-Composition chimique de la gelée royale.....	12

I-7-Cire d'abeille.....	12
I-7-A-Définition de la cire d'abeille.....	12
I-7-B-Composition chimique de la cire d'abeille.....	13
I-7-C-Propriétés de la cire d'abeille.....	13
I-8-Venin d'abeille.....	13
I-8-A-Définition du venin d'abeille.....	13
I-8-B-Composition chimique du venin d'abeille.....	13
I-8-C-Propriétés thérapeutiques du venin d'abeille.....	14
Chapitre II: Propriétés physico-chimiques des Miels.....	15
II-1-Introduction.....	15
II-1-A-Taux d'humidité.....	16
II-1-B-pH et acidité libre.....	17
II-1-C-Conductivité électrique.....	17
II-1-D-Hydroxy méthylfurfural (HMF).....	18
II-1-E-Proline.....	19
II-1-F-Rotation optique spécifique $[\alpha]_D^{20}$	20
II-1-G-Sels minéraux.....	20
II-1-H-Sucres.....	22
II-1-I-Couleur.....	22
II-2-Résultats et discussion.....	23
II-3-Conclusion.....	57
Chapitre III: Valorisation des miels de l'ouest Algérien: Propriétés biologiques.....	58
III-1-Introduction.....	58
III-2-Activité antioxydante.....	58
III-2-A-Stress oxydatif.....	60
III-2-B-Propriétés des antioxydants.....	60
III-2-C-Pouvoir antioxydant du miel.....	60
III-2-D-Méthodes pour déterminer l'activité antioxydante.....	62
III-2-E-Résultats et discussion.....	63
1-Quantification des composés bioactifs.....	63
a) Dosage des polyphénols totaux.....	64
b) Dosage des flavonoïdes totaux.....	64
2-Mesure de l'activité antioxydante.....	66

a) Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	66
b) Test de l'ABTS.....	67
c) Test de blanchiment β -carotène.....	67
d) Test de FRAP.....	68
3) Analyse statistique.....	68
III-3-Activité antimicrobienne.....	70
III-3-A-Pouvoir antibactérien du miel.....	70
III-3-B-Méthodes de détermination du pouvoir antimicrobien.....	71
a) Méthodes de diffusion.....	71
-Méthode de diffusion sur disque de gélose.....	71
-Méthode du gradient antimicrobien.....	72
-Autres méthodes de diffusion.....	72
b) Chromatographie sur couche mince (CCM) – bioautographie.....	72
c) Méthodes de dilution.....	72
III-3-C-Résultats et discussion.....	74
III-3-D-Conclusion.....	80
III-4-Activité antidiabétique.....	81
III-4-B-Effet du miel naturel sur le contrôle glycémique.....	82
- Le fructose et l'effet hypoglycémiant du miel.....	83
- Effets du miel sur le foie.....	84
- Effets du miel sur les hormones régulatrices de la satiété, de l'apport alimentaire et du poids corporel.....	84
III-4-C-Résultats et discussion.....	85
a) Poids corporel.....	85
b) Glucose sérique, test glycémique.....	86
c) Urée, triglycérides, cholestérol total et protéines.....	88
d) Etudes histopathologiques.....	91
III-4-D-Conclusion.....	95
Chapitre IV : Partie expérimentale.....	96
Conclusions générale & Perspectives.....	110
Communications & Publication.....	115
Références bibliographiques.....	116

Liste des figures

	Page
Figure 1: Morphologie de l'abeille.....	6
Figure 2: Formation du HMF dans le miel.....	19
Figure 3: Carte de l'ouest algérien montrant la répartition des échantillons de miel étudiés.....	23
Figure 4: Dendrogramme des paramètres de 37 miels collectés dans l'ouest algérien...	48
Figure 5: Dendrogramme de l'analyse typologique utilisant la distance euclidienne moyenne pour 37 échantillons de miel collectés dans l'ouest de l'Algérie, en relation avec les paramètres étudiés.....	69
Figure 6: Dendrogramme de l'effet des échantillons de miel contre les souches de bactéries en utilisant la distance euclidienne.....	79
Figure 7: Test de tolérance au glucose chez des rats diabétiques.....	87
Figure 8: Spécimens de foie dans les groupes normaux.....	91
Figure 9: Spécimens de foie dans les groupes de diabétiques.....	91
Figure 10: Méthode de diffusion sur gélose.....	105
Figure 11: Détermination de la CMI milieu liquide.....	106
Figure 12 : Dissection des rats.....	109

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1: Origines géographiques des échantillons de miel des régions ouest de l'Algérie.....	24
Tableau 2: Paramètres physico-chimiques des miels étudiés.....	25
Table 3: Données de distribution de la teneur en minéraux ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans les miels de l'ouest algérien.....	34-35
Table 4: Paramètres de validation de la procédure analytique pour la détermination des minéraux.....	36
Tableau 5: Comparaison des teneurs en minéraux dans les échantillons de miel provenant des régions méditerranéennes.....	39-40
Tableau 6: Valeurs propres et pourcentages cumulés de la variance totale (%).....	47
Tableau 7: Quantification des sucres.....	52
Tableau 8: Résultats de la couleur.....	56
Tableau 9: Valeurs TCP, TTF, DPPH, ABTS, β -Carotène et FRAP des échantillons de miel analysés.....	65
Tableau 10: Matrice de corrélation des paramètres étudiés (coefficients de corrélation de Pearson).....	69
Tableau 11: Activité antimicrobienne des miels de la région ouest algérienne.....	75
Tableau 12: Activités des antibiotiques contre les microorganismes étudiés.....	76
Tableau 13: Evolution du poids corporel des rats normaux pendant 4 semaines de traitement.....	85
Tableau 14: Evolution du poids corporel des rats diabétiques pendant 4 semaines de traitement.....	85
Tableau 15: Variation de la glycémie des rats normaux pendant 4 semaines de traitement..	86
Tableau 16: Variation de la glycémie de rats diabétiques pendant 4 semaines de traitement.....	86
Tableau 17: Test de tolérance au glucose de rats normaux.....	87
Tableau 18: Test de tolérance au glucose de rats diabétiques.....	87
Tableau 19: Taux d'urée, de triglycérides, de cholestérol total et de protéines chez les rats normaux.....	88
Tableau 20: Taux d'urée, de triglycérides, de cholestérol total et de protéines chez les rats diabétiques.....	89

Tableau 21: Corrélation dans le groupe non traité (A') chez les rats diabétiques.....	89
Tableau 22: Corrélation dans le groupe traité au miel (B') chez les rats diabétiques.....	89
Tableau 23: Corrélation dans le groupe traité au miel et à la metformine (C') chez des rats diabétiques.....	90
Tableau 24: Corrélation dans le groupe traité au miel et à la sitagliptine (D') chez des rats diabétiques.....	90
Tableau 25: Corrélation dans le groupe traité à la sitagliptine (E') chez les rats diabétiques.....	90
Tableau 26: Corrélation dans le groupe traité à la metformine (F') chez les rats diabétiques.....	90
Tableau 27: Conditions de fonctionnement ICP-MS.....	99
Tableau 28: Conditions de fonctionnement de l'AAS.....	99

Liste des abréviations

ABTS :	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ACP :	Analyse en composantes principales
BHT :	Hydroxytoluène butylé
CAH :	Classification ascendante hiérarchique
CE :	Conductivité électrique
CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB :	Concentration minimale bactéricide
CMF :	Concentration minimale fongicide
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CT :	Cholestérol total
DHTP :	Dose hebdomadaire tolérable provisoire
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DZI :	Diamètres de la zone d'inhibition
EAA :	Équivalent d'acide ascorbique
EAG :	Équivalents d'acide gallique
EQ :	Équivalent quercétine
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP:	Ferric Reducing antioxidant Power
FTIR–ATR :	Infrarouge à transformée de Fourier-Réflexion totale atténuée
HMF :	Hydroxyméthylfurfural
IG :	Index glycémique
ip :	Intrapéritonéale
Kg :	Kilogramme
LD :	Limite de détection
LQ :	Limite de quantification
MCD :	Mast cell degranulating peptide
MGO :	Méthylglyoxal
MHA :	Mueller-Hinton Agar
MHB :	Mueller-Hinton Broth
MMP-3 :	Matrice métalloprotéinase-3
mS :	Millisiemens
OMS :	Organisation mondiale de la santé
p.c. :	Poids corporel
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
ROS :	Rotation optique spécifique
SDA :	Sabouraud Dextrose Agar
STZ :	Streptozotocine
TCP :	Teneur en composés phénoliques
TG :	Triglycérides
TTF :	Teneur totale en flavonoïdes

Introduction Générale

Introduction Générale

Le miel est un liquide visqueux sucré naturel produit par les abeilles à partir du nectar des plantes en fleurs. Elles récoltent ce nectar, le transforment en se mélangeant à leurs sécrétions salivaires, puis le déposent, le déshydratent et le stockent dans les rayons de miel pour qu'il mûrisse. Le miel est un mélange complexe, composé majoritairement d'environ 80,0 % de glucides (saccharose, fructose et maltose), ainsi que de 0,3 % de protéines, 17,0 % d'eau et 0,7 % de minéraux, de vitamines et d'antioxydants (Codex A, 2009). Le miel est considéré comme un aliment médicinal aux propriétés antibactériennes et peut être utilisé comme indicateur de la pollution de l'environnement (Abdu-El Aal et al., 2007).

Hippocrate, le père de la médecine moderne, a d'abord déclaré "Que la nourriture soit ton médicament et que le médicament soit ta nourriture". Par conséquent, les aliments, y compris le miel, sont considérés comme des médicaments depuis environ 2500 ans (Sicak et coll., 2021).

Le miel est une substance connue par l'homme depuis les temps anciens, il a été utilisé pendant des millénaires dans une variété d'applications, mais les plus remarquables incluent le traitement des plaies superficielles, des brûlures et de l'inflammation. Le miel a été recommandé par Avicenne pour le traitement de la tuberculose (Eteraf-Oskouei et coll., 2013 ; Nolan et coll., 2019). La propolis et le miel étaient tous deux utilisés dans l'Antiquité pour embaumer les corps, alors que la médecine traditionnelle utilisait le miel pour la cicatrisation et le soulagement de la douleur (Kurek-Górecka et coll., 2020).

Les substances actives présentes dans le miel tel que les composés phénoliques, le peroxyde d'hydrogène, le méthylglyoxal, les minéraux, les acides aminés, lui permettent d'avoir des potentiels cytotoxiques, anti-inflammatoires, antifongiques, antimicrobiens, antimutagènes, antioxydants, antiprolifératifs, antithrombotiques et antiviraux (Sicak et coll., 2021). Ces substances varient d'un échantillon de miel à l'autre en raison de l'origine botanique, de la situation géographique et des sécrétions de l'abeille (Nolan et coll., 2019).

On distingue les miels monofloraux et polyfloraux dans la mesure où les monofloraux proviennent d'une seule variété florale, tandis que les polyfloraux, qui sont aussi, dits "toutes fleurs" ou "multifloraux", voire "mille fleurs" impliquent plusieurs herbes (Bogdanov et coll., 2008 ; Bogdanov, 2010) ; nés du mariage harmonieux et naturel de fleurs qui se sont épanouies au cours d'une saison sur un territoire donné, ces miels ne sont pas moins « nobles » que ceux d'une seule origine florale (Schievano et coll., 2016). La qualité du miel dépend du type de fleurs dont

les abeilles récoltent, le nectar, le climat, les conditions de croissance des plantes, les conditions de transformation et le stockage du miel (Khalafi et coll., 2016).

Le miel peut être contaminé par des antibiotiques, des pesticides et des métaux lourds. Par conséquent, la surveillance des paramètres de qualité du miel est d'une grande importance pour la santé du consommateur (Abdukhalik et coll., 2017). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a décrit les médecines alternatives comme un moyen bon marché d'atteindre une couverture totale des soins de santé de la population mondiale et a encouragé l'utilisation des médecines alternatives à base de ressources naturelles (Mama et coll., 2019).

Le miel a une importance socio-économique via l'apiculture en tant que secteur important de l'économie agricole, tant en termes de rôle joué par les populations d'abeilles dans la pollinisation que dans la production de miel, de gelée royale et d'autres produits de la ruche (Tamali et Özkırım, 2019). Il contribue également au développement rural et au maintien de la biodiversité (Bhandari, 2012 ; Tamali et Özkırım, 2019). Il convient de souligner que les abeilles et leurs produits (le miel) deviennent des indicateurs de pollution convoités (Ponikvar et coll., 2005 ; Staniškienė et coll., 2006 ; Bargańska et coll., 2015).

Actuellement, la Chine est considérée comme le premier pays producteur de miel avec plus de 26 % de la production mondiale soit 536 000 tonnes, suivi de la Turquie avec 88 162 tonnes (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture). En Algérie, le miel est considéré comme un produit précieux en raison de sa haute valeur nutritionnelle ainsi que de ses vertus thérapeutiques largement répandues dans la tradition populaire (Khan et coll., 2007 ; Cortés et coll., 2011). La douceur relative du climat en Algérie et la flore abondante et variée, permettent la production d'une variété de miel (Berkani, 2007). Selon le centre algérien de contrôle de la qualité et du conditionnement (CACQE) ; la production nationale de miel était estimée en 2011 à 33 000 quintaux et la même année 150 000 tonnes de miel, principalement de Chine, d'Inde et d'Arabie Saoudite ont été importés (CACQE, <http://www.cacqe.org/>). L'apiculture en Algérie est pratiquée dans les régions montagneuses à population élevée dans les plaines littorales, dans les plaines intérieures, dans les vallées des grands oueds, ainsi que dans le Sahara, cependant la production du miel reste faible par rapport à sa potentialité mellifère (Nair et coll., 2017).

Le miel est un produit naturel dont le prix est relativement élevé donc il a été la cible de falsifications par description erronée de l'origine géographique et botanique, l'ajout de sirops de sucre commerciaux, ou lorsque les abeilles mellifères sont nourries avec une substance adultérant, affectant ainsi négativement la santé des consommateurs ainsi que la qualité du miel (Zerrouk et coll., 2020).

Bien qu'il existe de nombreux types de miel disponibles dans le commerce en Algérie, qu'il s'agisse de miel monofloral ou multifloral, les consommateurs ne connaissent pas la vraie valeur du miel, et peu de travaux ont fait l'objet d'étude sérieuse de leurs propriétés notamment ceux de la région ouest. Il est donc important de faire sortir ce filet du cadre artisanal vers un cadre basé sur le pacte du savoir-faire et de la recherche scientifique. Ce qui permet la valorisation des miels voir leur labellisation. Le consommateur algérien étant conféré à la cherté de ce produit, il n'arrive plus à faire la distinction entre un produit naturel et un autre falsifié. C'est pourquoi un contrôle de qualité du miel en déterminant ses propriétés physico-chimiques et biologiques est nécessaire afin de bien évaluer les miels algériens.

Pour cela 37 échantillons de miels étaient collectés dans la région ouest d'Algérie, afin de valoriser et labéliser les produits de cette région. Quatre parties seront détaillées dans cette étude :

- ✓ Dans la première partie, nous présenterons brièvement les diverses connaissances bibliographiques sur l'abeille et son fonctionnement, le miel et les sous-produits de la ruche.
- ✓ Dans la deuxième partie, nous résumerons tout ce qui concerne les paramètres physico-chimiques, ainsi que les résultats et discussion sur les échantillons de miels analysés.
- ✓ La troisième partie est consacrée à la quantification des composés phénoliques et aux propriétés biologiques, plus précisément, aux activités antioxydante, antimicrobienne & antidiabétique.
- ✓ La quatrième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail.

Enfin, une conclusion générale qui contient un aperçu global de toutes les études menées dans cette thèse.

*Chapitre I: Les Sous-produits de la
Ruche*

Chapitre I: Les sous-produits de la ruche

I-1-Introduction

De nos jours, les substances naturelles biologiquement actives obtenues à partir de produits apicoles sont très utilisées dans la médecine et attirent de plus en plus l'attention. Les Produits apicoles ont été utilisés non seulement dans le traitement, mais aussi dans le domaine de la cosmétique. Chaque produit apicole possède des spécificités de substances actives qui déterminent son utilisation. Miel, propolis, pollen d'abeille, le pain d'abeille, la cire d'abeille et le venin d'abeille sont les produits apicoles qui sont utilisés à des fins médicales et fabrication cosmétique (Kurek-Górecka et coll., 2020).

I-2-Abeille

I-2-A-Définition

L'abeille est un insecte qui appartient à l'ordre des hyménoptères, et il existe plus de 20000 espèces ou la majorité ne produit pas de miel (Bonté et Désmoulière, 2013). L'apparition de l'abeille remonte à plus de 45 millions d'année, et elle à un comportement et une morphologie distinctive par rapport aux autres guêpes (Schneider, 2006).

L'abeille est une guêpe qui est en mesure de stocker des réserves à base de pollen, de nectar ou de miellat (Schneider, 2006).

Les abeilles du genre *apis* englobent sept espèces, divisées en quatre groupes : *dorsata*, *florea*, *cerana* et *mellifera* et elles sont marqués par un comportement hautement social (Gilles et coll., 2010). Actuellement *Apis mellifera* est l'espèce la plus courante, elle occupe l'Afrique, l'Europe, l'Asie occidentale, l'Amérique du nord et de sud ainsi que la Nouvelle-Zélande. On a identifié deux races appartenant à l'espèce *Api mellifera* en Algérie :

- ✓ La première, *Apis mellifera intermissa* (abeille tellienne) est retrouvé au nord du Sahara algérien et recouvre de la Libye jusqu'au Maroc.
- ✓ La seconde est *Apis mellifera sahariensis* qui est retrouvé au sud du Maroc et de l'Algérie (Bendjdid et Achou, 2014).

I-2-B-Types d'abeilles

Il existe trois types d'abeille :

- ✓ Reine : elle joue le rôle de productrice, et pond jusqu'à 200000 œufs pendant un été mais en plus une autre fonction régulatrice, en dirigeant les autres abeilles à l'aide des phéromones en leur transférant des ordres chimiques.

- ✓ mâles : appelés aussi faux bourdons, leur unique rôle est de féconder la reine lors d'un vol nuptial.
- ✓ Ouvrières : leur rôle change tour à tour au cours de leur vie en : nourrice, ménagères, bâtisseuses, magasinieres, gardiennes et ce n'est qu'à la fin de son existence qu'elle deviendra butineuses. Elles vivent 38 jours l'été et 6 mois en hiver (Tautz, 2009).

I-2-C-Anatomie de l'abeille

Le corps de l'abeille est fractionné en plusieurs parties. On aperçoit facilement trois parties dont la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 1) (Gilles et coll., 2010).

a) Tête

C'est en quelque sorte le centre nerveux et sensitif de l'abeille, où l'on retrouve:

- ✓ les antennes: elles sont situées au-dessus de la tête et sont très mobile. Elles représentent l'organe sensoriel principal et servent à la communication et la reconnaissance entre les abeilles, à l'olfaction, à l'audition et à la détection du niveau du CO₂.
- ✓ Yeux composés, sont situés de chaque côté de la tête et s'accorde avec son mode de déplacement et d'alimentation.
- ✓ les ocelles sont d'un nombre de trois et s'arrangent en triangle sur le haut de la tête.
- ✓ Pièces buccales sont du genre broyeur-lécheur, prêtes à la récolte du nectar et du miellat.

b) Thorax

Il est composé de trois fractions (pro-, méso- et métathorax soudé les uns aux autres). Aussi, il est porteur d'éléments locomoteurs de l'abeille (trois paires de pattes et deux paires d'ailes membraneuses).

- ✓ Pattes ont un rôle important dans la récolte du pollen ;
- ✓ Ailes servent principalement au déplacement de l'abeille.

c) Abdomen

Il est séparé du thorax par le pédoncule et comporte des organes de l'appareil digestif et excréteur du système circulatoire, du système nerveux et de l'appareil respiratoire.

- ✓ L'appareil digestif est partagé en trois parties :
 - L'Intestin antérieur contient le pharynx, l'œsophage et le jabot ;
 - L'intestin moyen est composé de ventricule et de l'estomac ;
 - L'intestin postérieur est divisé en duodénum et rectum.
- ✓ Le système circulatoire: le cœur de l'abeille est système ouvert.
- ✓ Le système nerveux: la transmission nerveuse ressemble à celle de l'homme.
- ✓ L'appareil respiratoire: permet l'absorption de l'oxygène et le rejet du dioxyde de carbone.

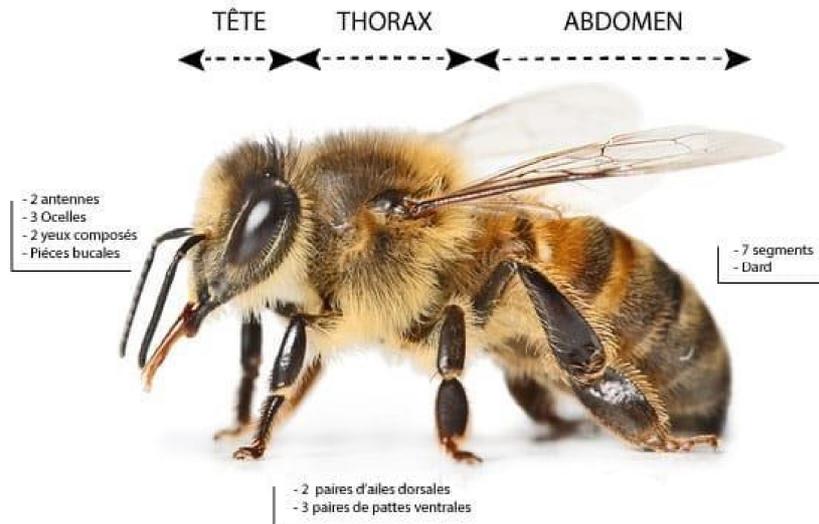


Figure1: Morphologie de l'abeille.

I-2-D-Production du miel

L'abeille est une espèce importante, son absence provoquerait de sérieux problèmes pour la nature et éventuellement pour l'homme, produisant le miel consommé par l'être humain depuis longtemps. Le rôle de l'abeille butineuse est de ramener de la nourriture à la ruche. Elle va faire sa récolte de nectar auprès des plantes à fleur mellifères ou le miellat, puis le stocke provisoirement dans son jabot, d'où la transformation du nectar ou miellat en miel commence.

Sous l'effet des enzymes (invertase) le saccharose du nectar se transforme en glucose, fructose, maltose et autres sucres. Les changements physicochimiques continuent, dès l'arrivée dans la ruche, où la butineuse transfère sa récolte à des abeilles ouvrières d'intérieur qui, par régurgitations successives d'une abeille à une autre compléteront et termineront la transformation commencée, avant d'aller dégorger ce liquide dans les alvéoles de cire disponibles (Bonté et Desmoulière, 2013).

I-3-Miel

I-3-A-Définition du miel

Le miel est la substance sucrée produite par les abeilles *Apis mellifera*, à partir de nectar et autres matières sucrées (miellat), qu'elles récoltent sur des végétaux vivants. C'est un aliment naturel, visqueux, aromatique qui est apprécié pour son goût, sa saveur ainsi que ses valeurs nutritives, et présentant des propriétés thérapeutiques (Da Silva et coll., 2015). Il est composé principalement de glucides, et autres constituants mineurs tels que les protéines, les enzymes, les acides aminés, les lipides, les vitamines, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les minéraux (Zhou et coll., 2013).

La saveur du miel est associée à sa couleur. En effet, les miels de couleurs claires sont paisibles tandis que les miels foncés ont un goût plus prononcés (Bagdanov et Martin 2002).

Le miel est connu pour son potentiel thérapeutiques et plusieurs facteurs influencent ses propriétés tels que :

- ✓ Les différentes espèces de plantes ;
- ✓ Les différentes espèces d'abeilles ;
- ✓ La zone géographique ;
- ✓ Les conditions de récolte ;
- ✓ L'adultération avec des sirops de sucre etc. (Como et coll., 2017).

I-3-B-Classification des miels

D'après l'origine botanique du miel, on peut le séparé en :

a) Miel de nectar

Il est produit à partir du nectar de fleur. C'est un produit sucré secrété par les glandes nectarifères, présentes sur plusieurs plantes butinées par les abeilles (Dutau, 2009).

Le nectar est une substance liquide douce et parfumée. Il est constitué principalement d'eau et de sucre mais on y trouve également des substances mineures, telles que les acides aminés, les sels minéraux, les hormones végétales, les pigments et les vitamines. Chaque espèce végétale fournit un nectar aux caractéristiques propres qui donnent au miel sa saveur et son parfum (Biri, 2010).

On peut diviser le miel de nectar en deux groupes :

- Miels monofloraux: le miel est dit monofloral, s'il provient principalement d'une source florale dominante et lorsque le nombre de pollens dominants est supérieur ou égal à 45%. Pour cela, il faut installer les ruches dans une zone ou on trouve une seule espèce végétale (Benaziza-Bouchema et coll., 2010).
- Miels multifloraux: le miel est dit multifloral s'il provient de différentes espèces végétales.

b) Miel de miellat

C'est un liquide sucré produit par plusieurs espèces d'insectes parasites vivants sur les feuilles de nombreuses plantes. Le miel de miellat est plus foncé, plus humide et plus riche en sels minéraux que le miel de nectar (Habib et coll., 2014). Il est constitué, généralement, de sucres mais aussi de dextrine, de gommes, de protéines, d'acides aminés, de vitamines, d'acides organiques et de sels minéraux (Bonté et Desmolière., 2013).

I-3-C-Composition chimique du miel

Le miel est un mélange complexe constitué principalement de sucres, d'eau, de sels minéraux, de protéines, de vitamines, d'acides aminés, de composés phénoliques et d'enzymes. En revanche, sa composition et ses qualités organoleptiques dépendent de la période et de l'année de récolte, l'emplacement des ruches, ainsi que l'origine botanique et la zone géographique de la source de nectar et autres sécrétions des plantes (Dutau, 2009).

- ✓ Les sucres sont les constituants majoritaires. Ils sont constitués de 75% de monosaccharides, 10 à 15% de disaccharides et d'un pourcentage plus faible des sucres restants (Da Silva et coll., 2015).
- ✓ Le deuxième constituant important du miel est l'eau. Son contenu peut altérer de 15 à 21%. La commission européenne du miel exige une teneur en eau maximale de 20%. Les propriétés du miel, telles que la couleur, le goût, la viscosité, la solubilité etc. sont influencés par la teneur en eau (Mekious et coll., 2015).
- ✓ Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, qui sont à l'origine de la capacité antioxydante et antimicrobienne et d'autres propriétés pharmacologiques du miel (Sicak et coll., 2021).
- ✓ Les éléments minéraux sont plus abondants dans les miels foncés que dans les miels clairs. Ils dépendent de l'origine botanique du miel, et du sol sur le quel poussent les plantes (Da Silva et coll., 2015).
- ✓ Les enzymes les plus connues sont la gluco-invertase responsable de l'hydrolyse des disaccharides, et les α et β -amylases qui facilitent la dégradation de l'amidon. Ils proviennent soit du nectar soit des sécrétions salivaires de l'abeille (Bonté et Desmoulière 2013).
- ✓ Les principales vitamines qui se trouvent dans le miel sont des vitamines du groupe B qui proviennent des grains de pollens. Elles sont présentes en très faible quantité (Bonté et Desmoulière 2013)
- ✓ Les lipides sont sous formes de glycérides et d'acides gras. Ils sont présents en faible quantité dans le miel (Bonté et Desmoulière 2013).
- ✓ Les protides se trouvent dans le miel soit sous forme de protéines ou d'acides aminés. Ils sont présents en quantité minimale (0,20 à 0,6%) (Anklam et coll., 1998).
- ✓ Les pigments : la couleur du miel est due principalement à son contenu en caroténoïdes et en flavonoïdes. Ces groupes appartenant à la famille des polyphénols ont un pouvoir antioxydant très intéressant (Bonté et Desmoulière 2013).

- ✓ Autres substances : le miel contient aussi des oligoéléments, des pollens, des spores, des algues unicellulaires, des levures osmotolérantes (responsable de la fermentation), des champignons microscopiques et de l'hydroxyméthylfurfural (HMF) qui est présent dans les miels anciens ou ayant subi un sur chauffage; il peut donc être un critère de conservation (Bonté et Desmoulière 2013).

I-3-D-Propriétés thérapeutiques du miel

Le miel est estimé depuis les temps anciens pour ses valeurs nutritives, ses vertus curatives. Aussi, il est considéré comme une alternative aux traitements traditionnels dans plusieurs pays.

Les propriétés fonctionnelles et biologiques du miel sont démontrées par plusieurs études telles que les activités antioxydantes (Erejuwa et coll., 2010), anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, antiulcéreuses, antilipidiques, anticancéreuses (Al-Farsi et coll., 2018), cardioprotectrices (Rakha et coll., 2008), hépatoprotectrices (Erejuwa et coll., 2012), hypoglycémiques (Erejuwa et coll., 2010) et antihypertensives (Al-Waili., 2003).

Le miel comprend divers composés phénoliques aux propriétés antioxydantes comme l'acide *p*-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide chlorogénique, acide caféique, acide ellagique, acide *p*-coumarique, acide cinnamique, kaempférol, pinocembrine, naringénine et chrysin (Bayram et coll., 2020).

Les miels sont utilisés comme pansements pour la cicatrisation des plaies et ont prouvé leur efficacité dans différents ulcères et cicatrices (Silva et coll., 2021). En effet, l'effet cicatrisant des miels est lié à son acidité, ses propriétés osmotiques et aussi à des composés tels que le peroxyde d'hydrogène et les flavonoïdes. Ces facteurs interviennent contre les micro-organismes pré envoyés dans le tissu des plaies chroniques, en particulier *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Liu et coll., 2013).

I-4-Propolis

I-4-A-Définition de la propolis

La propolis est une substance résineuse recueillie par les abeilles *Apis mellifera* sur les bourgeons des arbres, des arbustes et des plantes vertes. Lorsque les abeilles mélangent la sève avec leurs propres rejets salivaires et la cire d'abeille, la propolis est formée comme une substance collante, vert foncé utilisée par les abeilles pour protéger la ruche, en comblant les cavités de ses parois, réduisant l'entrée lors des journées froides, et aussi en embaumant les intrus potentiels ayant pénétré dans la ruche, empêchant ainsi leur décomposition. Ceci explique pourquoi la propolis est aussi appelée colle d'abeille (Przybyłek et coll., 2019 ; Almuhayawi, 2020).

Le mot propolis est d'origine grecque et signifie à l'entrée de la ville (Toreti et coll., 2013 ; Wagh et coll., 2013). Depuis l'Antiquité, la question de l'origine de la propolis, à partir des plantes ou des abeilles, était posée et constituée un sujet de discussion. De nos jours, avec le développement de l'analyse technique, la composition approximative de la propolis et les facteurs qui l'influencent sont connus (Kędzia et coll., 2008).

I-4-B-Composition chimique de la propolis

Les vertus bénéfiques de la propolis ont suscité l'intérêt des chercheurs à étudier sa composition chimique. Il a été établi qu'il s'agit d'une substance résineuse complexe composée majoritairement: de gomme et résine ambrée (50% à 70%), d'huile et cire (30% à 50%), et de pollen (5% à 10%). Ces derniers sont accompagnés d'autres substances comme: les vitamines B, C et E, les minéraux, les sucres, les flavonoïdes, les polyphénols, les acides aminés, ainsi que les composés aromatiques (Almuhayawi, 2020).

En vérité, la composition de la propolis est remarquablement incohérente, en raison de la variété des espèces végétales qui se développent autour la ruche, à partir de laquelle les abeilles recueillent les exsudats nécessaires (Drescher et coll., 2019). De plus, elle est très influencée par l'altitude, l'éclairage, les variations saisonnières et l'alimentation des abeilles des champs (Silva-Carvalho et coll., 2015).

I-4-C-Propriétés thérapeutique de la propolis

L'efficacité antimicrobienne de la propolis s'explique par la présence de certains de ses composants, qui ont été documentés contre les bactéries, les virus, les champignons et les protozoaires. Une étude en Arabie Saoudite de l'activité antimicrobienne de la propolis contre 600 souches bactériennes différentes, a indiqué que la propolis est plus efficace contre les bactéries Gram-positives comparées aux Gram-négatives. Cette action est probablement due à la structure de la membrane externe de ces bactéries (Almuhayawi, 2020). De plus, d'autres chercheurs ont montré que les propolis iraniennes et brésiliennes sont efficaces contre les bactéries Gram-positives et les spores, et présentent une action limitée contre les bactéries Gram-négatives (Afrouzan et coll., 2018).

Récemment, Lahouel et collaborateurs (2010) ont montré que l'extrait de propolis, récolté dans le Nord-Est de l'Algérie (Jijel), réduit *in vivo* les effets toxiques de la doxorubicine induits par les stress oxydatifs. De plus, la propolis algérienne modulerait l'expression et l'activité de la matrice métalloprotéinase-3 (MMP-3). Cette dernière est considérée comme un agent de contrôle de la cascade protéolytique impliquée dans plusieurs troubles pathologiques (polyarthrite rhumatoïde, parodontite et athérosclérose) (Piccinelli et coll., 2013).

I-5-Pollen

I-5-A-Définition du pollen

Le pollen possède une structure stable capable de résister à des traitements sévères. Les grains de pollen existent sous différentes formes et différentes tailles (Maric et coll., 2020).

Le pollen est l'élément reproducteur mâle des plantes à graines. Il représente une multitude de corpuscules microscopiques contenus dans l'anthère des étamines chez les angiospermes (Stephen, 2014). Les abeilles attirent des centaines à des milliers de grains de pollen en utilisant un faible champ électrostatique généré entre la fleur (chargé négativement) et le corps de l'abeille (chargé positivement).

I-5-B-Composition chimique du pollen

Le pollen contient principalement des nutriments (lipides, protéines, glucides), des micronutriments (vitamines : caroténoïdes, B, E, H et acide folique, et minéraux), des macroéléments (sodium, potassium, calcium et magnésium), des micro éléments (fer, zinc, manganèse et cuivre), des métaux (chrome, aluminium, strontium, étain, nickel et vanadium), des acides aminés (leucine, isoleucine et valine - acides aminés exogènes ramifiés), des acides gras et leurs esters, acides organiques (oxalique, tartrique, malique, citrique, succinique, acétique, lactique et gluconique) ainsi que des composés organiques phénoliques, flavonoïdes, acides phénoliques et leurs dérivés (Thakur et coll., 2020 ; Kocot et coll., 2018).

Les substances bioactives les plus importantes présentent dans le pollen d'abeille sont :

- ✓ Les composés phénoliques, qui sont responsables de la couleur du grain et de son goût amer,
- ✓ Les composés caroténoïdes qui sont aussi importants pour la couleur et pour d'autres fonctions biologiques, telles que l'activité antioxydante, l'activité de la provitamine A et l'amélioration du système immunitaire (Nascimento et coll., 2018).

I-5-C-Utilisation du pollen

Le pollen d'abeille est consommé comme complément alimentaire naturel, soit sous forme fraîche ou séchée. Les chercheurs se sont intéressés à son utilisation dans les systèmes alimentaires pour son intérêt nutritif mais aussi pour améliorer les caractéristiques de la qualité des produits (Nascimento et coll., 2018).

I-5-D-Propriétés thérapeutique du pollen

Le pollen d'abeille est considéré comme "seul aliment parfaitement complet", car il contient des substances biologiquement actives qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires, cicatrisantes, cardiotoniques, anti-athérosclérotiques et autres actions pharmacologiques (Nascimento et coll., 2018).

I-6-Gelée royale

I-6-A-Définition de la gelée royale

La gelée royale, est une sécrétion des glandes mandibulaires et hypopharyngiennes des jeunes abeilles de l'espèce *Apis mellifera* (Kokot et coll., 2018). C'est une substance crémeuse de couleur blanche ou jaunâtre. Les larves d'abeilles sont nourries par la gelée royale les trois premiers jours, ensuite elles sont nourries avec un mélange de pollen, de nectar et de miel. D'autre part, la gelée royale constitue l'unique nourriture des reines aux stades larvaire et adulte. C'est pour cette raison que la reine a une longévité plus élevée que les autres abeilles (Pavel et coll., 2011).

La production de la gelée royale à des fins commerciale est toujours d'actualité, car sa valeur marchande est beaucoup plus élevée que les autres produits apicoles, tels que le miel ou le pollen. C'est donc une très bonne source de revenus pour les apiculteurs (Ahmad et coll., 2020).

I-6-B-Composition chimique de la gelée royale

La gelée royale contient principalement de l'eau (50 à 70%), des sucres (7 à 18%), des protéines (9 à 18%) et des lipides (3 à 8%), formant une émulsion. Elle contient aussi des composants mineurs tels que les sels minéraux (cuivre, zinc, fer, calcium, manganèse, potassium, et sel de sodium), les flavonoïdes, les polyphénols, les acides aminés et les vitamines (biotine, acide folique, inositol, niacine, acide pantothénique, riboflavine, thiamine et vitamine E) (Ahmad et coll., 2020 ; Kokot et coll., 2018). La variation naturelle des composés bioactifs dépend de la biodiversité des espèces floristiques présentes dans les différents écosystèmes (Ahmad et coll., 2020).

I-6-C-Propriétés thérapeutique de la gelée royale

La gelée royale a plusieurs activités pharmacologiques: antioxydante, hypoglycémiant, hypocholestérolémiant et hépatoprotectrice, antitumorale, antibiotique, antiinflammatoire, immuno-modulatrice et anti-allergique, anti-âge, etc. (Pavel et coll., 2011 ; Kokot et coll., 2018).

I-7-Cire d'abeille

I-7-A-Définition de la cire d'abeille

La cire de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) est initialement de couleur blanche. Elle prend une teinte jaune intense au contact avec le miel et tend à brunir après quatre ans. La cire est un composé organique complexe à base de lipides (cire naturelle), produit par des abeilles ouvrières à l'aide de quatre paires de glandes cireuses. Ces dernières sont situées sur la face interne du 4^{ème} au 7^{ème} sternite abdominal (Fratini et coll., 2016 ; Svečnjak et coll., 2019). Les abeilles sécrètent de la cire sous forme d'écaillés, puis elles les transfèrent avec leurs pattes antérieures aux mandibules. Elles les mâchent, ensuite, et l'ajoute au peigne en cours de

.....
construction de leurs nids où le miel est stocké (Fratini et coll., 2016). La cire d'abeilles est insoluble dans l'eau et l'alcool froid; elle se dissout partiellement dans l'alcool bouillant, et complètement dans le chloroforme, le sulfure de carbone, et dans l'essence de térébenthine chaude. Elle constitue un matériau à changement de phase à haute capacité thermique.

I-7-B-Composition chimique de la cire d'abeille

La cire d'abeille est composée d'hydrocarbures, d'acides gras libres, d'esters d'acides gras, d'alcools gras, de diesters et de substances exogènes (Svečnjak et coll., 2019).

I-7-C-Propriétés de la cire d'abeille

La cire d'abeille est l'un des composants de la première crème cosmétique créée par Galien, le grand médecin grec, en 150 avant J.-C. Cette crème est composée de la cire d'abeille et de l'huile d'olive en suspension dans l'eau (ou eau de rose). Elle était utilisée pour le traitement des brûlures, plaies, coupures, contusions et fractures (Fratini et coll., 2016).

La cire d'abeille possède aussi des activités antibactériennes et antifongiques contre les salmonelles, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Fratini et coll., 2016).

I-8-Venin d'abeille

I-8-A-Définition du venin d'abeille

L'apithérapie est un domaine de la médecine alternative qui repose sur l'utilisation de produits d'abeille: miel, pollen, propolis, gelée royale et principalement de venin d'abeille. Ce dernier est également connu sous le nom d'apitoxine (Wehbe et coll., 2019). Il a été utilisé à la fin du XIX^e siècle dans la médecine traditionnelle pour son potentiel thérapeutique. Il est sécrété par une glande située dans la cavité abdominale des abeilles (*Apis mellifera* L.) (Carpena et coll., 2020).

La thérapie au venin d'abeille est l'application médicinale du venin des abeilles dans le corps humain afin de traiter certaines maladies, telle que l'arthrite rhumatoïdale (Lee et coll., 2014). Cette méthode est connue dans la médecine alternative depuis plus de 5000 ans. Elle consiste soit en une application indirecte, par extraction du venin d'abeille avec un stimulus électrique suivie de son injection dans le corps ou directement via les piqûres d'abeilles (Zhang et coll., 2018).

I-8-B-Composition chimique du venin d'abeille

Une goutte du venin se compose de 88 % d'eau et seulement 0,1 µg de venin sec. Ce dernier est composé de peptides y compris la mélittine, l'adolapine, l'apamine et le peptide de dégranulation des mastocytes (MCD). Il contient aussi des enzymes (Phospholipase A2), les amines bioactives (histamine et épinéphrine) et les minéraux (Cherniack et coll., 2018 ; Wehbe et coll., 2019).

I-8-C-Propriétés thérapeutiques du venin d'abeille

Plusieurs études ont évoqué les propriétés biologiques des composants du venin d'abeille. Des essais précliniques ont été réalisés pour améliorer l'utilisation potentielle de l'apitoxine et de ses constituants en tant que prochaine génération de drogues.

Le venin d'abeille contient plusieurs molécules actives telles que les peptides et les enzymes qui ont un potentiel intéressant dans le traitement de l'inflammation et les maladies du système nerveux central (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique). De plus, le venin d'abeille a montré des avantages prometteurs contre différents types de cancer et même contre l'immunodéficience humaine difficile (Wehbe et coll., 2019).

***Chapitre II: Propriétés Physicochimiques
des Miels***

Chapitre II: Propriétés physico-chimiques des Miels

II-1-Introduction

Le miel a toujours fasciné l'homme. Son processus de création est incroyable et ses bienfaits sont connus depuis la nuit des temps. Il a été rapporté que le miel contient jusqu'à 200 substances. Il est considéré comme une partie importante de la médecine traditionnelle et de l'utilisation culinaire (Khan et coll., 2007 ; Pipicelli et Tatti, 2009).

Le miel est un produit avec une composition très complexe telle que les sucres, les protéines, les acides aminés, l'eau, les enzymes, les acides organiques, les vitamines, les minéraux, les composés phénoliques et volatils (Ball, 2007 ; da Silva et coll., 2016). Il est considéré comme un aliment et une alternative naturelle au sucre, sans additif, qui s'adapte à tous les procédés de cuisson et a une durée de conservation indéfinie (Khan et coll., 2007 ; Chepulis, 2015). Le contenu de ces composants diffère selon le type de miel, les origines botaniques et géographiques (Santos-Buelga et González-Paramás, 2017).

Les paramètres physico-chimiques tels que; la couleur, l'humidité, l'acidité, peuvent varier considérablement selon les types de miel, ce qui contribue, dans une certaine mesure, à leurs caractéristiques organoleptiques (Solayman et coll., 2016). Selon le *Codex Alimentarius* «Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles mellifères à partir du nectar des plantes ou des sécrétions des parties vivantes des plantes ou des excréments des insectes suceurs de plantes» (Comité du CODEX sur l'hygiène alimentaire, 2000 ; Thrasylvoulou et coll., 2018).

L'identification de l'origine du miel a connu un intérêt croissant ces dernières années en raison de la préférence de certains types de miel (Puścion-Jakubik et coll., 2020). Le miel monofloral n'est pas largement disponible, ce qui conduit les spécialistes à explorer les caractéristiques du miel pour prouver son authenticité (Bogdanov et coll., 2002). Les préférences des consommateurs varient souvent en fonction de différentes perceptions sensorielles et propriétés médicinales (Cortés et coll., 2011 ; Abeshu et Geleta, 2015). La méliissopalynologie peut être utilisée avec succès pour l'identification de l'origine florale du miel (Von Der Ohe et coll., 2004). Généralement, elle doit être complétée par une analyse physico-chimique et organoleptique (Aparna et Rajalakshmi, 1999).

Pour classer le miel par origine botanique, une interprétation globale de tous les résultats est nécessaire (Anklam, 1998). Outre la méliissopalynologie, il existe des méthodes d'analyse des composés volatils conduisant à la détermination de l'origine botanique du miel (Cuevas-Glory et

.....
coll., 2007). Dans cette étude, l'analyse des paramètres physicochimiques (humidité, pH, acidité libre, conductivité électrique (CE), teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF), couleur, composition en sucres, etc.) a été réalisée pour 37 échantillons de miel de l'ouest d'Algérie, afin d'authentifier l'origine botanique de la lavande, du romarin, de la moutarde blanche, du thym, du chardon-Marie, du caroubier, de l'oranger, de l'euphorbe, de l'eucalyptus, du camphrier, du jujubier, de la sauge et de l'harmal et des miels polyfloraux ou multifloraux. Les analyses sont réalisées afin d'évaluer la qualité des miels, qui ont mis en évidence une dégradation du produit due au processus de récolte et de conditionnement (échauffement excessif, fermentation, présence de résidus, etc.).

Pour garantir l'authenticité du miel, il est nécessaire d'analyser les échantillons de miel en détail et dans leur ensemble. Les données sur l'apiculture et la production de miel en Algérie ne sont pas disponibles ; les quelques données que nous trouvons sont rapportées de la presse et de certains magazines. Les données référencées uniques que nous trouvons mentionnent que l'industrie apicole en Algérie comptait environ 1,2 million de colonies et 20000 apiculteurs et l'évolution de la production de miel montre une augmentation marquée de 2002 à 2010. Cependant, le rendement de la colonie reste très faible et inférieur à 4 kg/ruche (Adjlane et coll., 2012 ; Tamali et Özkırım, 2019).

II-1-A-Taux d'humidité

La teneur en eau est un critère de qualité important surtout pour l'équilibre du miel contre la fermentation et la cristallisation pendant la durée de conservation. Néanmoins, il a une importance mineure pour la caractérisation de son origine florale (Bagdanov et coll., 2004). Il est à noter qu'en fonction de la saison de production et du climat, les miels montrent des différences spécifiques par rapport au contenu d'eau. Ces dernières affectent les propriétés physiques de miel (viscosité, cristallisation) et aussi agissent sur la valeur du rapport glucose/eau (Oddo et coll., 2004). Par ailleurs, la teneur en eau peut être modifiée artificiellement pendant les opérations technologiques d'extraction et de maturation.

Selon le *Codex Alimentarius*, la teneur en eau ne doit pas dépasser 20%. Par ailleurs, les miels dont l'humidité est inférieure à 18% ont une meilleure conservation et une bonne cristallisation. Par contre, les miels, dont la teneur en eau dépasse 20%, sont fermentescibles et ont un goût désagréable d'alcool issu de la réaction biochimique qui transforme le sucre en alcool et en gaz carbonique.

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer le taux d'humidité :

- ✓ Par réfractométrie : soit par un réfractomètre analogique Abbé (Bogdanov et coll., 1997) ou un réfractomètre numérique. Les résultats obtenus ne sont pas significativement

différents (Bogdanov, 1999). La valeur de la teneur en eau est obtenue à partir de l'indice de réfraction du miel par référence à la table de Chatway.

- ✓ Par titrage de Karl Fischer du type volumétrique et coulométrique connu pour doser l'eau par une réaction chimique (Bogdanov, 1999). Cette méthode est coûteuse et lente, mais elle est considérée comme la plus exacte pour déterminer la teneur en eau. Aussi, les valeurs obtenues peuvent dépendre des conditions expérimentales de titrage (solvant, température) (Sanchez et coll., 2010).

II-1-B-pH et acidité libre

Le miel est une substance naturellement acide, quelle que soit son origine géographique. Son contenu en acides organiques contribue à sa stabilité contre la détérioration microbienne pendant la conservation et à sa saveur (Guerzou et coll., 2021). Le pH est un paramètre corrélé au stockage du miel et à la croissance des micro-organismes qui pourraient modifier la texture et la stabilité du miel (Zarei et coll., 2019). Pour un pH faible (3,5-4,0), la dégradation des sucres et des enzymes se fait plus rapidement que pour un pH élevé (4,0-5,0). En mesurant la valeur du pH, il est possible de distinguer le type de miel :

- ✓ si le pH se situe entre 3,5 et 4,5, il s'agit d'un miel de nectar,
- ✓ pour un pH compris entre 4,5 et 5,5, c'est un miel de miellat.

Il est à noter que les miels acides se dégradent rapidement. Cette acidité est due à la présence d'acides organiques, principalement l'acide gluconique, et aux ions inorganiques tels que le phosphate, le sulfate et le chlorure.

L'acidité lactonique est considérée comme l'acidité réserve lorsque le miel devient alcalin, tandis que l'acidité totale est la somme des acidités libre et lactonique (Silva et coll., 2009). L'ancienne norme internationale indique une valeur maximale de 40 mg/kg. Cette valeur a été revue à la hausse (50 mg/kg) dans le projet codex en raison de l'acidité élevée de certains miels naturels (Bogdanov et coll., 1999).

Plusieurs méthodes permettent la mesure du pH et de l'acidité libre des miels parmi lesquelles :

- ✓ détermination du pH et de l'acidité libre par titrage à pH 8,3 ;
- ✓ détermination du pH, de l'acidité libre, des lactones et de l'acidité totale : point d'équivalence titrage.

II-1-C-Conductivité électrique

Le miel floral est produit par les abeilles à partir du nectar de fleurs, tandis que le miel de miellat est fabriqué à partir des sécrétions de parties vivantes de plantes ou excréments des insectes suceurs de plantes sur la partie vivante des plantes.

La conductivité électrique est considérée comme un paramètre nécessaire permettant la différenciation entre ces deux types de miel (Sanz et coll., 2005). Cette mesure est liée directement à la concentration des sels minéraux, acides organiques et protéines. Plus leur concentration dans le miel est élevée plus la conductivité analogue est élevée (Terrab et coll., 2003).

La législation européenne a établi un minimum de 0,8 mS/cm pour les miels de miellat, miels de châtaignier et leurs mélanges (Escuredo et coll., 2012), tandis que les miels de nectar ont une conductivité électrique inférieure à 0,8 mS/cm.

II-1-D-Hydroxy méthylfurfural (HMF)

L'hydroxyméthyl furfural (HMF) est un paramètre indispensable pour évaluer la qualité du miel. Des concentrations élevées de HMF dans le miel indiquent un surchauffage, un stockage dans de mauvaises conditions ou le vieillissement du miel (Zappala et coll., 2005). Cette molécule est absente ou presque (~5mg/kg d'HMF) dans un miel frais. Ainsi, le HMF ne représente pas un critère pour la classification botanique du miel (Bagdanov et coll., 2004). Cependant, un taux maximal de 40 mg/kg est accepté par le *Codex Alimentarius*. En parallèle, le Codex prévoit un taux du HMF plus élevé estimé à 60 mg/kg, dans les miels des pays chauds, car ce dernier augmente plus rapidement avec la durée du stockage.

Le HMF est un composé furanique qui se forme par réaction de Maillard ou par déshydratation des hexoses en milieu acide. Il peut, également, se former à basse température au cours d'une longue période de stockage. En plus de l'effet de la température, la formation du HMF dépend aussi du type de sucre, du pH, de l'activité de l'eau et des cations divalents concentrés dans le milieu (Belay et coll., 2013).

Le HMF est un composé organique hétérocyclique à six carbones. Il contient deux groupements fonctionnels l'aldéhyde et l'alcool (hydroxyméthyl). L'anneau de la structure est centré sur les fragments furaniques, alors que les deux groupes formyle et hydroxyméthyle sont liés aux deuxièmes et cinquièmes positions, respectivement (Figure 2). Le HMF est une substance solide, de couleur jaune, soluble dans l'eau et son point de fusion est de 32°C.

En plus d'être présent dans le miel, le HMF est également présent dans les fruits secs (> 1 g/kg), les produits contenant du caramel, le café instantané (jusqu'à 6,2 g/kg), le jus de pomme, le jus d'agrumes, le lait, les céréales pour petit-déjeuner, les aliments cuits au four et les produits à base de tomate. Le HMF est aussi libéré du sucre et glucides après la cuisson à la maison, ce qui indique qu'il est partout dans notre alimentation (Shapla et coll., 2018).

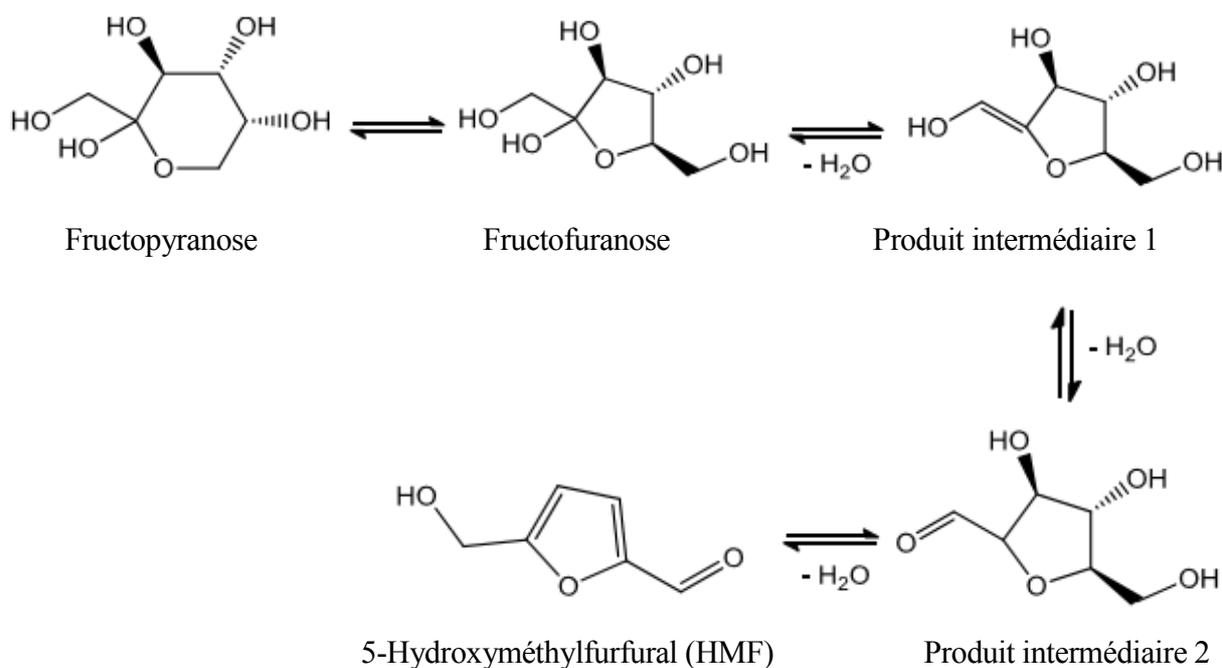


Figure 2: Formation du HMF dans le miel.

Il est à noter que le HMF et ses dérivés sont dangereux pour la santé humaine. Ce sont des molécules génotoxiques, mutagènes et cancérigènes. Aussi, elles endommagent l'ADN et ont des effets organotoxiques et inhibiteurs enzymatiques (Florian et coll., 2012).

La Commission internationale du miel recommande trois méthodes de dosage du HMF:

- ✓ par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) : elle est considérée comme la méthode la plus fiable mais, malheureusement, elle est très coûteuse (Zappala et coll., 2005).
- ✓ par la méthode décrite par Winkler (1955) : elle est déconseillée par la commission internationale du miel à cause du manque de précision de la méthode et aussi des effets cancérigènes des produits utilisés notamment de l'acide tiobarbiturique et de la *p*-toluidine (Shapla et coll., 2018).
- ✓ Par la méthode décrite par White (1979) : elle implique la mesure de l'absorbance UV des solutions aqueuses de miel clarifiées avec et sans bisulfite.

II-1-E-Proline

La proline est un acide aminé important, qui provient principalement des sécrétions salivaires des abeilles lors de la transformation du nectar en miel (Bouhlali et coll., 2019). Le profil en acides aminés du miel est une caractéristique de la source botanique puisque la principale source des acides aminés c'est le pollen. Bien que le taux de la proline varie en fonction de la flore végétale, il est plus étroitement lié aux performances de travail des abeilles (Demir Kanbur et coll., 2021).

La quantité de proline dans le miel doit être d'au moins 200 mg/kg (Bouhlali et coll., 2019). Cependant, il existe des réglementations exceptionnelles pour certains types de miels monofloraux tels que châtaignier (≥ 500 mg/kg), acacia (≥ 120 mg/kg), et la lavande (≥ 180 mg/kg). Depuis, la teneur en proline est également associée à son origine florale et botanique (Akgün et coll., 2021). Il est à noter que la teneur en proline diminue avec le stockage. Aussi, elle indique généralement la maturité et montre une falsification avec du sucre en raison de la teneur en proline significativement plus faible du sirop par rapport aux nectars (Czipa et coll., 2019).

II-1-F-Rotation optique spécifique $[\alpha]_D^{20}$

La rotation spécifique est un paramètre de qualité lié à l'origine botanique du miel. Elle est considérée comme un indicateur de falsification du miel (Gonçalves et coll., 2018). La rotation optique spécifique (ROS) est une propriété physique du miel. Elle est définie comme l'angle de rotation de la lumière polarisée à la longueur d'onde de la raie D du sodium à 20°C, $[\alpha]_D^{20}$ d'une solution aqueuse de 1 dm et contenant 1 g/mL de substance.

Le miel peut faire pivoter le plan de polarisation de la lumière polarisée, et la valeur ROS obtenue dépend principalement des types et des proportions relatives de sucres dans le miel, tels que fructose ($[\alpha]_D^{20} = -92,4^\circ$) ou glucose ($[\alpha]_D^{20} = +52,7^\circ$). Le miel de miellat est, généralement, un peu plus faible en teneur en fructose et contient le mélézitose ($[\alpha]_D^{20} = +88,2^\circ$) ou l'erlose ($[\alpha]_D^{20} = +121,8^\circ$) (Serrano et coll., 2019). D'une manière générale, le miel de nectar est lévogyre et le miel de miellat est dextrogyre (Dinkov et coll., 2003).

II-1-G-Sels minéraux

Les abeilles sont l'un des insectes les plus utiles pour l'homme. Elles pollinisent nos cultures et produisent du miel (Hung et coll., 2018 ; Grayson 2015). De nos jours, elles jouent un nouveau rôle en indiquant la pollution et la qualité de l'environnement, à travers le miel produit (Ponikvar et coll., 2005 ; Bargańska et coll., 2015). L'abeille butine sur plusieurs kilomètres à la recherche du nectar sur son chemin. Son corps accumule des particules de métaux et de polluants présents dans l'environnement qu'elle transporte jusqu'à la ruche (Burden et coll., 2019). Les contaminants peuvent être anthropiques ou naturels (Murtaza et coll., 2014).

Il a été démontré que les polluants sont absorbés par les plantes poussant dans un sol contaminé et ont des niveaux plus élevés dans les tissus végétaux par rapport aux autres plantes cultivées dans des sols témoins (Gall et coll., 2015). Il existe une relation étroite entre les produits de la ruche, notamment le miel, et les plantes. Ceci signifie que le miel hérite de diverses caractéristiques et propriétés biologiques des plantes (Mejías et Garrido 2017). En raison de cette relation, des composés ou des résidus indésirables peuvent être trouvés dans le miel si les plantes ou le sol ont été exposés à ces substances (Silici et coll., 2016).

Parmi les contaminants les plus dangereux pour la santé humaine et l'environnement que l'on peut retrouver dans le miel, on peut citer les métaux lourds (Wu et coll., 2016 ; Ali et coll., 2019). On les trouve naturellement dans la croûte terrestre, mais leur présence dans l'environnement a augmenté en raison de la forte activité anthropique (Vareda et coll., 2019).

Des analyses qualitatives et quantitatives des métaux lourds dans le miel, en plus de l'approche classique, permettraient d'avoir un système fiable et reproductible pour établir l'origine botanique (Fermo et coll., 2013) et la traçabilité géographique (Oroian et coll., 2015). L'aspect environnemental d'une région a également été évalué au moyen des minéraux et des métaux lourds présents dans le miel (Bogdanov et coll., 2007).

Plusieurs études ont été menées pour établir la relation entre la pollution d'une région et la présence de contaminants dans le miel (Kılıç Altun et coll., 2017 ; Bartha et coll., 2020 ; Solayman et coll., 2016). Outre les minéraux et les oligo-éléments, le miel est composé de divers glucides, polysaccharides, oligosaccharides, flavonoïdes, vitamines, minéraux, cires, composés aromatiques, grains de pollen, pigments et enzymes qui contribuent également à son profilage et à son authentification (Machado De -Melo et coll., 2017).

a-Danger des métaux lourds

Depuis plusieurs décennies, il a été démontré que l'exposition aux métaux entraînait de graves dommages (Rodríguez et Mandalunis, 2018). Leur bioaccumulation et leur amplification dans les systèmes vivants entraînent indéniablement des effets et des maladies (Rehman et coll., 2018 ; Singh et coll., 2011). Les métaux peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires. Certains métaux, tels que le cadmium, l'arsenic, le nickel et le chrome, sont cancérigènes (Engwa et coll., 2019). Une exposition aux métaux lourds est impliquée dans des pathologies très sévères comme la sclérose en plaques et les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson) (Engwa et coll., 2019 ; Forte et coll., 2019 ; Giacoppo et coll., 2014) ; ils pourraient même jouer un rôle dans le déclenchement de troubles psychologiques et neurologiques comme l'autisme (Carter et Blizard, 2016).

b-Types d'éléments présents dans le miel

Les principaux éléments trouvés dans les miels à travers le monde, considérés comme un paramètre de profilage, peuvent être divisés en deux groupes selon une large littérature ;

- ✓ éléments majeurs ou macro-éléments (Na, K, Ca, Mg, P, S, Cl).
- ✓ oligo-éléments dont métaux lourds (Al, Cu, Pb, Zn, Mn, Cd, Tl, Co, Ni, Rb, Ba, Be, Bi, U, V, Fe, Pt, Pd, Te, Hf, Mo, Sn, Sb, La, I, Sm, Tb, Dy, Sd, Th, Pr, Nd, Tm, Yb, Lu, Gd, Ho, Er, Ce, Cr, As, B, Br, Cd, Hg, Se, Sr) (Pisani et coll., 2008 ; Pehlivan et Gül, 2015 ;

Solayman et coll., 2016 ; Kılıç Altun et coll., 2017 ; Conti et coll., 2018 ; Karabagias et coll., 2018 ; Lanjwani et Channa., 2019 ; Squadrone et coll., 2020).

c-Oligo-éléments

Il est important de mentionner que la présence de certains minéraux dans le miel est essentielle pour l'évaluation de sa qualité nutritionnelle et curative (Kadri et coll., 2017). La teneur naturelle en minéraux et oligo-éléments dans le miel est variable selon l'origine géographique, climat, et peut-être influencée par l'origine botanique (Wetwitayaklung et coll., 2018). La mesure de la conductivité électrique permet de calculer la teneur en matières minérales d'un miel. En effet, il existe un rapport linéaire entre les deux paramètres (Bogdanov et coll., 2004).

II-1-H-Sucres

Le miel est un type d'édulcorant naturel. Il contient, principalement, des sucres (Se et coll., 2018). La présence de l'invertase dans le miel, une enzyme produite dans la glande hypo pharyngée des abeilles mellifères, permet l'hydrolyse des disaccharides (sucrose, maltose, tréhalose, turanose...), des trisaccharides (maltotriose, raffinose, erlose,...) et des oligosaccharides présents dans le nectar en monosaccharides (Almeida-Muradian, 2013).

Le fructose et le glucose sont les principaux constituants du miel. Ils représentent à peu près 80 à 85% du solide total (Belay et coll., 2013). Leur identification et quantification est d'une grande importance. En particulier, le rapport fructose/glucose qui représente un intérêt particulier pour l'industrie apicole puisqu'il contribue :

- ✓ à l'identification de la source florale d'un miel,
- ✓ aide à l'authentification d'adultérant au miel (par exemple : alimentation des abeilles avec des sirops de sucre pendant les périodes de faible débit de nectar ou en ajoutant des sirops de sucre à miel pour augmenter les rendements en miel),
- ✓ et permet également de prédire le comportement typique de cristallisation du miel.

Plusieurs techniques sont employées pour déterminer les sucres dans le miel :

- ✓ Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) équipée d'un détecteur à indice de réfraction différentiel ;
- ✓ Chromatographie en phase gazeuse (CPG) équipée d'un détecteur à ionisation de flamme ;
- ✓ Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF-ATR) (Özbalci et coll., 2013).

II-1-I-Couleur

La couleur est un caractère sensoriel vulnérable à la préférence des consommateurs pour la qualité du miel (Karabagias et Karabournioti, 2018). Les marchés internationaux

recommandent des couleurs de miels spécifiques. Par exemple, l'Europe préfère le miel plus foncé aux saveurs puissantes tandis qu'en Amérique du Nord, les consommateurs préfèrent le miel de couleur claire au goût moins intense (Al-Farsi et coll., 2018). La couleur du miel est attribuée aux pigments tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes ; qui dépendent de l'origine botanique et géographique du produit (Terrab et coll., 2003). D'autres parts, les teneurs en eau, en saccharides et en pollens influencent fortement la couleur et la consistance du miel (Bandeira et coll., 2018).

Des études récentes ont montré que le contenu phénoliques et antioxydants des miels foncés est plus élevé comparé aux miels clairs (Ferreira et coll., 2009 ; Perna et coll., 2013; Cabrera et coll., 2017 ; Bandeira et coll., 2018 ; Castiglioni et coll., 2018 ; Bayram et coll., 2020).

II-2-Résultats et discussion

Trente-sept échantillons de miel d'origine florale variable, identifiés par S(1-37), sont collectés auprès des apiculteurs expérimentés dans différentes régions géographiques situées dans l'Ouest de l'Algérie (Tlemcen, Ain-Temouchent, Sidi Bel Abbès, Mostaganem, Mascara, Tiaret, Naâma, Bechar) (Figure 3). Ces régions se distinguent par leurs reliefs, leurs morphologies et leurs climats, offrant une grande diversité écologique.

Le type et la région (coordonnées GPS, climat, altitude) des miels, ainsi que les noms scientifiques et communs des plantes qui forment les étages bioclimatiques de leurs zones de production, sont regroupés dans le tableau 1. Tous les échantillons sont produits entre mars 2017 et août 2018. Dès réception, les miels sont conservés dans l'obscurité à température ambiante jusqu'au début de l'expérimentation.

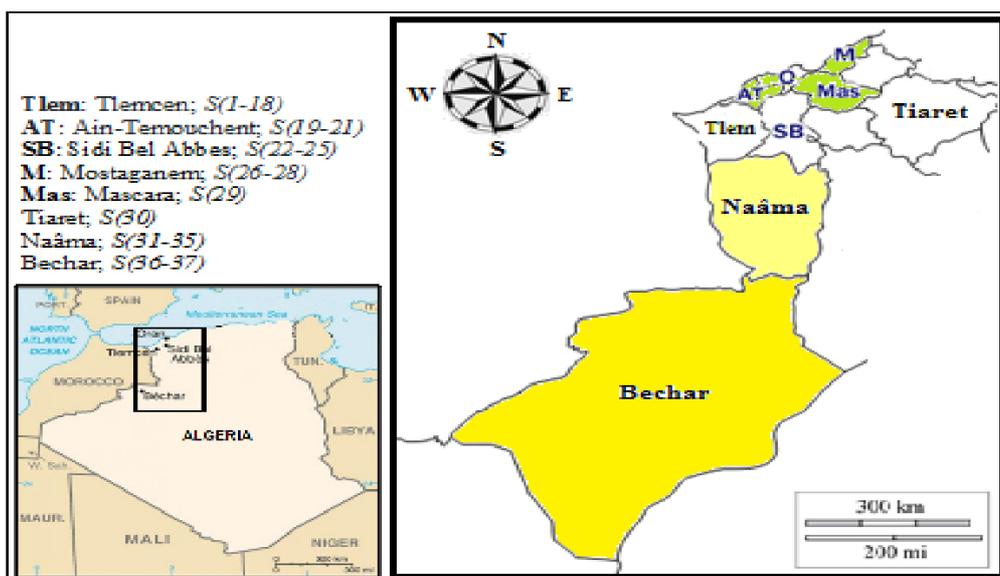


Figure 3: Carte de l'ouest algérien montrant la répartition des échantillons de miel étudiés.

Tableau 1: Origines géographiques des échantillons de miel des régions ouest de l'Algérie.

Région	Echantillon	Type floral	Nom scientifique	Famille botanique	Localisation	Les coordonnées GPS	Climat	Altitude (m)	Saison/Année de récolte
Tlemcen									
	S1	Lavande	<i>Lavandula vera</i> D.C.	Lamiaceae	Sidi Djillali	34° 28' 00" N 1° 34' 60" O	Subhumide	1470	Été 2018
	S2	Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Sidi Djillali	34° 28' 00" N 1° 34' 60" O	Subhumide	1470	Printemps 2018
	S3	Multifloral	Multifloral	-	Sidi Djillali	34° 28' 00" N 1° 34' 60" O	Subhumide	1470	Printemps 2018
	S4	Multifloral	Multifloral	-	Sidi Djillali	34° 28' 00" N 1° 35' 00" O	Subhumide	1425	Été 2017
	S5	Multifloral	Multifloral	-	El Aricha	34° 13' 22" N 1° 15' 21" O	Subhumide	1270	Été 2017
	S6	Moutarde blanche douce	<i>Sinapis alba</i> L.	Brassicaceae	Aïn Fezza	34° 52' 45" N 1° 14' 18" O	Subhumide	846	Été 2017
	S7	Thym	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Beni Snous	34° 38' 35" N 1° 33' 41" O	Subhumide	835	Printemps 2018
	S8	Chardon-Marie	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae	Beni Snous	34° 38' 35" N 1° 33' 41" O	Subhumide	835	Été 2018
	S9	Multifloral	Multifloral	-	Oued Chouly	34° 56' 52" N 1° 03' 17" O	Subhumide	705	Automne 2017
	S10	Caroubier	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Fabaceae	Oued Chouly	34° 56' 52" N 1° 03' 17" N	Subhumide	705	Automne 2017
	S11	Thym	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Beni Mester	34° 52' 00" N 1° 25' 00" O	Subhumide	697	Printemps 2017
	S12	Caroubier	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Fabaceae	Béni Ghazli	34° 52' 34" N 1° 07' 56" O	Subhumide	624	Printemps 2017
	S13	Multifloral	Multifloral	-	Oued es Safsâf	34° 55' 60" N 1° 18' 00" O	Subhumide	551	Été 2018
	S14	Multifloral	Multifloral	-	Sebaa Chioukh	35° 09' 50" N 1° 21' 27" O	Subhumide	514	Printemps 2017
	S15	Multifloral	Multifloral	-	Hennaya	34° 57' 00" N 1° 22' 00" O	Subhumide	429	Été 2017
	S16	Oranger	<i>Citrus sinensis</i> L.	Rutaceae	Remchi	35° 03' 00" N 1° 26' 00" O	Subhumide	213	Printemps 2017
	S17	Multifloral	Multifloral	-	Honaïne	35° 10' 35" N 1° 39' 18" O	Subhumide	197	Printemps 2018
	S18	Chardon-Marie	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae	Honaïne	35° 10' 35" N 1° 39' 18" O	Subhumide	197	Été 2018
Ain-Temouchent									
	S19	Multifloral	Multifloral	-	Oulhaça El Gherarba	35° 13' 00" N 1° 31' 00" O	Subhumide	232	Printemps 2018
	S20	Multifloral	Multifloral	-	Beni Ghanem	35° 15' 16" N 1° 25' 38" O	Subhumide	220	Été 2018
	S21	Multifloral	Multifloral	-	Bouzedjar	35° 34' 28" N 1° 10' 01" O	Subhumide	104	Printemps 2018
Sidi Bel Abbès									
	S22	Euphorbe	<i>Euphorbia</i> L.	Euphorbiaceae	Ras El Ma	34° 29' 51" N 0° 49' 10" O	Semi-aride	1105	Printemps 2017
	S23	Chardon-Marie	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae	Telagh	34° 47' 06" N 0° 32' 40" O	Semi-aride	987	Printemps 2017
	S24	Multifloral	Multifloral	-	Lamtâr	35° 04' 14" N 0° 47' 53" O	Semi-aride	578	Printemps 2017
	S25	Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	Sidi Brahim	35° 15' 38" N 0° 34' 03" O	Semi-aride	432	Printemps 2017
Mostaganem									
	S26	Camphre	<i>Cinnamomum camphora</i> L.	Lauraceae	Sidi Ali	36° 06' 17" N 0° 25' 24" E	Semi-aride	216	Automne 2017
	S27	Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Myrtaceae	Mostaganem	35° 56' 00" N 0° 05' 00" E	Semi-aride	104	Été 2017
	S28	Oranger	<i>Citrus sinensis</i> L.	Rutaceae	Bouguirat	35° 45' 05" N 0° 15' 12" E	Semi-aride	66	Printemps 2017
Mascara									
	S29	Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae	Djebel Stamboul	35° 23' 00" N 0° 09' 00" E	Semi-aride	932	Printemps 2017
Tiaret									
	S30	Multifloral	Multifloral	-	Tiaret	34° 55' 00" N 1° 34' 60" E	Semi-aride	1189	Printemps 2018
Naâma									
	S31	Multifloral	Multifloral	-	Aïn Sefra	32° 45' 20" N 0° 35' 09" O	Aride	1073	Printemps 2017
	S32	Jujubier	<i>Ziziphus lotus</i> L.	Rhamnaceae	Aïn Sefra	32° 45' 20" N 0° 35' 09" O	Aride	1073	Printemps 2017
	S33	Jujubier	<i>Ziziphus lotus</i> L.	Rhamnaceae	Aïn Ben Khelil	33° 17' 25" N 0° 45' 51" O	Aride	1156	Printemps 2017
	S34	Sauge	<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	Naâma	33° 17' 25" N 0° 45' 51" O	Aride	1031	Printemps 2017
	S35	Harmal	<i>Peganum harmala</i> L.	Zygophyllaceae	Mecheria	33° 33' 00" N 0° 17' 00" O	Aride	891	Printemps 2017
Bechar									
	S36	Multifloral	Multifloral	-	Djebel Antar	31° 56' 34" N 1° 55' 52" O	Aride	1953	Hiver 2017
	S37	Moutarde blanche douce	<i>Sinapis alba</i> L.	Brassicaceae	Oued Zouzfana	32° 04' 01" N 1° 14' 27" O	Aride	830	Printemps 2017

Selon les tranches pluviométriques, les étages bioclimatiques sont : Zone Humide (> 900 mm), Zone Subhumide (600 – 900 mm), Zone Semi-aride (300 – 600 mm), Zone Aride (100 – 300 mm) & Zone Saharienne (<100 mm).

Les résultats des paramètres physico-chimiques des 37 miels étudiés sont représentés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2: Paramètres physico-chimiques des miels étudiés.

N°	Echan.	Humidité (%)	pH	Acidité libre (méq/Kg)	CE (mS/cm)	HMF (mg/Kg)	Proline (mg/Kg)	$[\alpha]_D^{20}$
1	S1	17,33±0,30	3,61±0,02	9,67±1,15	0,45±0,01	11,27±1,51	293,31±0,84	(-) 12,50±0,25
2	S2	17,13±0,11	3,47±0,15	12,50±0,87	0,26±0,00	32,26±0,91	431,32±5,32	(-) 10,89±0,03
3	S3	18,27±0,23	3,89±0,03	14,00±1,00	0,21±0,00	6,30±0,65	398,73±0,18	(-) 9,55±0,20
4	S4	17,43±0,15	4,85±0,18	28,33±1,52	0,27±0,01	25,70±1,06	587,93±0,73	(-) 9,92±0,06
5	S5	15,46±0,11	5,60±0,04	13,00±0,87	0,25±0,00	47,43±2,22	265,95±1,28	(-) 8,85±0,03
6	S6	18,60±0,00	4,00±0,03	18,67±1,53	0,55±0,00	33,93±2,94	987,08±2,61	(-) 14,08±0,04
7	S7	20,87±0,61	4,29±0,02	17,33±0,58	0,29±0,00	9,73±0,93	421,04±4,32	(-) 10,39±0,25
8	S8	17,07±0,11	4,29±0,04	11,00±1,00	0,47±0,01	7,63±1,98	725,14±6,43	(-) 11,32±0,21
9	S9	16,80±0,40	4,66±0,03	22,67±1,15	0,25±0,02	3,82±0,59	655,21±0,27	(-) 11,17±0,01
10	S10	18,40±0,00	4,39±0,19	15,83±1,04	0,42±0,01	26,55±4,23	800,42±2,75	(-) 8,87±0,02
11	S11	15,93±0,30	4,62±0,03	30,33±1,53	0,44±0,01	19,76±0,32	924,54±6,14	(-) 11,02±0,02
12	S12	18,73±0,30	4,37±0,02	8,00±1,00	0,72±0,02	40,62±4,41	684,42±2,57	(-) 11,40±0,01
13	S13	15,13±0,11	4,11±0,01	20,00±1,00	0,91±0,01	17,81±0,98	734,81±2,23	(-) 10,37±0,09
14	S14	18,07±0,30	4,61±0,05	11,00±1,00	0,51±0,01	6,02±0,82	359,58±1,76	(-) 10,59±0,07
15	S15	16,13±0,41	4,29±0,02	21,33±1,53	0,38±0,00	8,42±3,74	478,75±2,87	(-) 9,17±0,01
16	S16	18,00±0,00	4,27±0,01	15,00±1,00	0,16±0,01	49,43±0,72	412,83±4,41	(-) 8,75±0,02
17	S17	20,06±0,92	4,63±0,04	19,33±1,52	0,42±0,00	4,64±0,80	871,39±1,06	(-) 11,66±0,07
18	S18	16,67±0,11	3,81±0,09	15,67±1,15	0,32±0,01	35,63±0,42	905,82±3,13	(-) 10,69±0,16
19	S19	19,87±0,41	5,10±0,06	39,33±1,15	1,18±0,02	7,91±0,51	301,81±0,90	(-) 10,48±0,02
20	S20	16,33±0,23	4,38±0,02	10,33±0,11	1,04±0,01	2,45±0,34	1006,34±3,78	(-) 10,92±0,01
21	S21	18,06±0,23	4,19±0,01	11,83±0,29	0,50±0,00	9,48±1,73	899,21±2,61	(-) 9,86±0,02
22	S22	14,87±0,30	4,36±0,53	15,67±1,15	0,24±0,00	4,44±0,82	458,30±2,19	(-) 9,51±0,04
23	S23	16,66±0,11	4,52±0,43	20,33±1,52	0,44±0,01	7,54±0,64	1132,73±2,49	(-) 10,72±0,02
24	S24	17,60±0,00	3,96±0,15	20,67±3,05	0,16±0,00	19,31±0,89	794,23±2,37	(-) 9,70±0,03
25	S25	17,13±0,11	4,10±0,01	20,33±2,31	0,32±0,00	18,11±3,17	1078,64±8,87	(-) 10,46±0,20
26	S26	18,07±0,11	4,72±0,03	25,00±2,00	0,32±0,00	4,66±0,79	491,47±7,21	(-) 9,46±0,04
27	S27	16,13±0,11	4,29±0,02	33,67±1,53	0,58±0,01	10,47±2,35	741,25±2,06	(-) 11,35±0,03
28	S28	17,47±0,23	4,65±0,01	28,00±2,00	0,21±0,00	16,77±0,64	285,59±0,88	(-) 10,13±0,02
29	S29	16,80±0,00	4,21±0,02	40,33±2,52	0,25±0,00	34,90±2,54	1200,66±1,92	(-) 10,56±0,02
30	S30	15,87±0,30	4,01±0,02	9,33±0,76	0,36±0,00	1,79±0,02	1117,33±3,63	(-) 8,30±0,14
31	S31	16,33±0,23	3,94±0,01	17,16±0,76	0,44±0,00	4,34±0,26	326,50±1,05	(-) 9,57±0,20
32	S32	15,80±0,40	4,69±0,01	17,16±1,52	0,25±0,00	28,29±0,37	478,67±0,77	(-) 10,40±0,03
33	S33	15,27±0,30	5,31±0,01	12,33±1,52	0,22±0,00	15,25±3,75	637,61±1,35	(-) 10,10±0,02
34	S34	14,67±0,11	4,53±0,07	22,67±2,08	0,20±0,00	36,53±1,27	508,88±1,78	(-) 10,96±0,03
35	S35	16,60±0,20	4,99±0,01	15,83±0,76	0,24±0,00	45,36±1,43	394,83±0,63	(-) 10,98±0,02
36	S36	18,20±0,53	5,01±0,04	9,00±1,00	0,46±0,00	4,54±0,53	279,72±2,74	(-) 10,59±0,33
37	S37	16,93±0,11	4,48±0,06	13,83±1,26	0,25±0,00	40,64±0,63	845,61±4,48	(-) 10,22±0,01

Echan.: Echantillon ; CE : Conductivité électrique ; HMF : Hydrométhylfurfural ; $[\alpha]_D^{20}$: Rotation optique spécifique.

Taux d'humidité

Le taux d'humidité est un critère très important. Il permet d'estimer le degré de maturité du miel et renseigne sur sa stabilité vis-à-vis la fermentation et la cristallisation pendant le stockage (Bogdanov et coll., 2004).

Les valeurs des taux d'humidité varient entre $14,67 \pm 0,11$ et $20,87 \pm 0,61\%$. Les miels de thym et multifloral de Tlemcen contiennent le plus d'humidité ($20,87 \pm 0,61$, S7 ; $20,06 \pm 0,92\%$, S17, respectivement), tandis que ceux de la sauge de Naâma (S34) et d'Euphorbe de Sidi Bel Abbès (S22) renferment le moins avec des moyennes respectives estimées à $14,67 \pm 0,11$ et $14,87 \pm 0,30\%$.

Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent que les taux d'humidité de certains miels algériens sont légèrement inférieurs à ceux cités dans la littérature. En effet, les taux d'humidité des miels d'eucalyptus Algérien ($17,13 \pm 0,11$, S25 ; $16,13 \pm 0,11\%$, S27, resp.) sont plus faibles que ceux publiés pour les miels d'eucalyptus du Maroc ($19,8 \pm 0,1\%$) (Azzaa et coll., 2014) et de Tunisie ($19,12 \pm 0,07\%$) (Boussaid et coll., 2018). La même observation est notée pour les miels de caroube d'Algérie ($18,40 \pm 0,00$, S10 ; $18,73 \pm 0,30\%$, S12) qui présentent des taux d'humidité inférieurs à ceux du Maroc ($20,0 \pm 0,10\%$) (Azzaa et coll., 2014).

Le tableau 2 regroupe aussi des miels algériens dont les taux d'humidité sont similaires à ceux publiés. Il s'agit, notamment, du miel de romarin et des miels multif floraux algériens ($17,13 \pm 0,11$, S2 ; $17,43 \pm 0,15$, S4 ; $18,27 \pm 0,23\%$, S3, resp.) comparés au romarin de Tunisie ($17,27 \pm 0,01\%$) (Boussaid et coll., 2018) et aux miels multif floraux du Maroc ($17,8 \pm 0,10\%$) (Azzaa et coll., 2014) et de la Turquie ($18,39 \pm 1,30\%$) (Akgün et coll., 2021).

Sur les 37 miels analysés, presque un tiers (12) présentent des teneurs en humidité supérieures à 18% et risquent donc de subir une fermentation pendant le stockage (Laredj et Wafa, 2017). En effet, généralement, une quantité d'eau élevée provoque la fermentation du miel mais aussi une perte de sa saveur et de sa qualité.

Du point de vue réglementaire, deux miels provenant de la région de Tlemcen (S7 et S17) contiennent des teneurs en humidité supérieures à la limite maximale fixée par le *Codex Alimentarius* (20%). La forte teneur en eau de certains miels s'explique par une récolte précoce (avant maturation). Aussi, elle peut être due aux mauvaises conditions d'extraction, d'entreposage et de conditionnement de stockage, responsables d'une réhydratation du miel (El Sohaimy et coll., 2015).

Deux échantillons renferment des taux d'humidité inférieurs à 15%. Ils sont donc trop secs et visqueux ce qui favorise la cristallisation. Pour corriger le taux d'humidité d'un miel certaines techniques sont employées. Il s'agit notamment de la déshydratation ou bien la

.....
pasteurisation. Cependant, ces techniques modifient les qualités diététiques et thérapeutiques du miel, raisons pour lesquelles elles sont critiquées (Laallam, 2018). Il est à noter que les taux d'humidité des miels varient en fonction de leurs zones de production. En effet, les miels produits dans les zones arides et semi-arides, où le climat est plus sec, les taux sont les plus faibles avec des valeurs moyennes de $16,47 \pm 0,20$ et $16,43 \pm 0,32\%$, respectivement. Tandis que ceux collectés dans les zones subhumides semblent contenir en moyenne plus d'humidité ($18,00 \pm 0,36\%$). Ces résultats montrent l'impact du climat sur les taux d'humidité des miels. Ces variations peuvent s'expliquer en partie par les facteurs tels que la nature du sol et la pluviométrie des zones de production (Lewoyehu et Amare, 2019).

Des études antérieures ont également mentionné l'influence de l'origine botanique sur le taux d'humidité des miels (Almasi et Sekarappa, 2019). Ceci semble être confirmé dans cette étude. En moyenne, les miels dont les taux d'humidité sont les plus élevés correspondent à ceux du caroubier ($18,56 \pm 0,15\%$; S10 & S12), du thym ($18,40 \pm 0,45\%$; S7 & S11), de l'oranger ($18,10 \pm 0,26\%$; S16 & S28) et du camphre ($18,07 \pm 0,11\%$; S26). Ces derniers sont suivis de miels de moutarde blanche douce ($17,76 \pm 0,05\%$; S6 & S37), de lavande ($17,33 \pm 0,30\%$; S1), du romarin ($16,96 \pm 0,05\%$; S2 & S29), du chardon-Marie ($16,80 \pm 0,11\%$; S8, S18 & S23), d'eucalyptus ($16,63 \pm 0,11\%$; S25 & S27) et de harmal ($16,60 \pm 0,20\%$; S35). Enfin, les miels qui contiennent le moins d'humidité sont ceux du jujubier ($15,53 \pm 0,35\%$; S32 & S33), d'euphorbe ($14,87 \pm 0,30\%$; S22) et de sauge ($14,67 \pm 0,11\%$; S34).

pH et acidité libre

a) pH

Les miels contiennent des acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide pyruvique, l'acide malique et l'acide citrique qui contribuent à leur saveur et leur stabilité contre la détérioration microbienne (Achouri et coll., 2015). Ils sont, naturellement, acides indépendamment de leur origine géographique (Ibrahim et coll., 2011).

La mesure du pH d'un miel caractérise son acidité. Aussi, c'est un paramètre qui renseigne sur son origine florale. Un miel de nectar est, en général, plus acide et moins riche en minéraux qu'un miel de miellat. Des valeurs de pH comprises entre 3,5 et 4,5 indiquent qu'il s'agit d'un miel de nectar tandis que celles incluses dans l'intervalle 4,5 et 5,5 correspondent à un miel de miellat (Makhloufi et coll., 2021).

Les pH des miels étudiés varient de $3,47 \pm 0,15$ (S2) à $5,60 \pm 0,04$ (S5) (Tableau 2). Ils sont donc jugés comme ayant un caractère acide et sont en conformité avec les normes du *Codex Alimentarius* (2001). Les valeurs de pH mesurées sont similaires à celles rapportées pour d'autres échantillons de miels provenant d'Algérie (3,75 – 5,56) (Makhloufi et coll., 2021), ($3,6 \pm 0,16$ –

6,2±0,30) (Bella et coll., 2020) et (3,5 – 4,7) (Homrani et coll., 2020). Aussi, nos résultats demeurent dans l'intervalle des miels du Maroc (4,17±0,05 – 5,05±0,13) (El-Haskoury et coll., 2018), de Tunisie (3,45 – 4,63) (Boussaid et coll., 2018) et de la Palestine (3,03 - 5,98) (Abdulkhaliq et coll., 2016). Ces résultats sont aussi similaires à ceux des miels d'Espagne (4,4±0,20) pour les miels de miellat mais également pour les miels de nectar (Escuredo et coll., 2019).

Il a été constaté, également, une variation du pH des miels de nectar en fonction de leur origine florale. Les miels de romarin (3,47±0,15 ; S2) et de lavande (3,61±0,02 ; S1) sont les plus acides suivis successivement des miels de moutarde blanche douce (4,00±0,03 ; S6), d'eucalyptus (4,10±0,01 ; S25), d'oranger (4,27±0,01 ; S16), de thym (4,29±0,02 ; S7), d'euphorbe (4,36±0,53 ; S22) et de caroubier (4,39±0,19 ; S10) (Tableau 2). Ces résultats confirment l'influence de la flore butinée sur le pH des miels (Almasi et Sekarappa, 2019). D'autres facteurs peuvent influencer sur le pH. Il s'agit, notamment, de l'origine géographique, de la nature du sol et de la teneur en minéraux etc. (Khalafi et coll., 2016).

Il est à noter qu'une augmentation de l'acidité d'un miel peut constituer un indicateur de sa fermentation (Selvaraju et coll., 2019). D'autre part, un pH trop élevé révèle une dégradation biochimique résultant de conditions de récolte ou de conservation inadéquates (Achour et Khalil., 2014). Les échantillons de miels étudiés ne dépassent pas la limite permise, ce qui peut être considéré comme un indice de fraîcheur.

b) Acidité libre

L'acidité est un critère important qui affecte les propriétés organoleptiques et physiques telles que la couleur et la conductivité. Plus de 30 acides différents ont été identifiés dans le miel. Bien que le nectar soit une source d'acides organiques (citrique, malique, oxalique), la majorité de l'acide est générée par l'activité enzymatique des abeilles, par exemple l'acide gluconique qui est formé par la dégradation du glucose par l'enzyme glucose oxydase (Akgün et coll., 2021). Certains acides sont libres alors que d'autres sont combinés sous forme de lactones (Bogdanov et coll., 2004). Le type d'acides organiques présents dans le miel est important car l'acide organique dominant peut donner des indications sur l'origine botanique du miel (Kaškonienė et Venskutonis, 2010). De plus, une acidité élevée est généralement associée à un miel de couleur foncée (Machado De-Melo et coll., 2018).

Les valeurs d'acidité libre des miels analysés sont données dans le tableau 2. Elles varient de 8,00±1,00 (S12) à 40,33±2,52 (S29) méq/kg. Il est à noter que toutes les valeurs d'acidité totale sont en conformité avec la norme fixée par le *Codex Alimentarius* (2001) qui est de 50 méq/kg.

Les résultats obtenus pour l'acidité libre dans cette étude sont en accord avec ceux publiés pour les miels d'Algérie (14,1 – 46,5 méq/kg) (Ghorab et coll., 2021), (13,72 – 40,33 méq/kg) (Zerrouk et coll., 2020), du Maroc (11,0±2,29 – 42,50±2,29 méq/kg) (El-Haskoury et coll., 2018), de Tunisie (7,11±0,20 – 27,20±0,20 méq/kg) (Boussaid et coll., 2018) et de Turquie (16,33±3,00 – 34,33±13,04 méq/kg) (Akgün et coll., 2021).

La variation de l'acidité libre observée dans les différents miels peut être due à l'origine botanique ou à des variations en rapport avec la saison de la récolte (Perez-Arquillue et coll., 1995).

Conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique représente un paramètre de qualité fiable lors des contrôles de routines. Elle permet de distinguer entre un miel de nectar et un miel de miellat (Terrab et coll., 2004a). En effet, les miels de miellat, fortement minéralisés, ont une conductibilité électrique plus grande que celle des miels de nectar. De plus d'après Sanz et coll. (2005), la conductivité électrique d'un miel est en rapport avec sa couleur. Plus le miel est foncé, plus il conduit le courant électrique.

La conductivité des miels analysés enregistre des valeurs se situant entre 0,16±0,01 et 1,18±0,02 mS/cm (Tableau 2). Il est à noter qu'à l'exception des miels multif floraux (S13, S19 & S20) qui ont enregistré des conductivités électriques > 0,8 mS/cm, la majorité des miels sont des miels de nectar (CE ≤ 0,8 mS/cm). L'ensemble des miels sont en accord avec les normes établies par le *Codex Alimentarius*.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux publiés, dans des travaux antérieurs, pour les miels algériens : 0,29 - 1,35 mS/cm (Ghorab et coll., 2021), 0,133 - 1,460 mS/cm (Homrani et coll., 2020) et 0,22±0,02 - 0,42±0,16 mS/cm (Makhloufi et coll., 2021). De plus, les valeurs des conductivités électriques enregistrées pour nos miels sont aussi similaires à celles publiées pour les miels de Tunisie (0,39±0,02 – 0,89±0,06 mS/cm) (Boussaid et coll., 2018), de Turquie (0,19±0,06 – 1,13±0,25 mS/cm) (Akgün et coll., 2021) et du Maroc (0,36±0,02 – 1,35±0,03 mS/cm) (El-Haskoury et coll., 2018).

Généralement, les miels de couleur foncé ou riches en pollens contiennent plus de matière minérale ionisable et sont donc de bons conducteurs de courant, raisons pour lesquelles leurs conductivités sont plus élevées. Aussi, il est possible que ces miels soient des miels mixtes constitués d'un mélange de nectar et de miellat (Bogdanov, 2002 ; *Codex Alimentarius*, 2000).

D'autre part, la source florale des miels influe sur leur conductivité électrique. En effet, une corrélation linéaire existe entre les deux variables quantitatives que sont la conductivité électrique et la teneur en matières minérales d'un miel (Majewska et coll., 2019). Cette

.....
constatation a été confirmée par plusieurs auteurs (Almasi et Sekarappa, 2019 ; Khalafi et coll., 2016). Les conductivités électriques les plus élevées sont enregistrées pour les miels multifloreaux ($0,91\pm 0,01$ mS/cm, S13 ; $1,18\pm 0,02$ mS/cm, S19 & $1,04\pm 0,01$ mS/cm, S20) suivis de celles des miels de caroubier ($0,72\pm 0,02$ mS/cm ; S12), d'eucalyptus ($0,58\pm 0,01$ mS/cm ; S27), de la moutarde blanche douce ($0,55\pm 0,00$ mS/cm ; S6), de chardon-Marie ($0,47\pm 0,01$ mS/cm ; S8), de lavande ($0,45\pm 0,01$ mS/cm ; S1) et de thym ($0,44\pm 0,01$ mS/cm ; S11). Les valeurs les plus faibles de conductivité sont obtenues pour les miels de camphre ($0,32\pm 0,00$ mS/cm ; S26), de romarin ($0,26\pm 0,00$ mS/cm ; S2), de jujubier ($0,25\pm 0,00$ mS/cm ; S32), d'euphorbe ($0,24\pm 0,00$ mS/cm ; S22), de harnal ($0,24\pm 0,00$ mS/cm ; S35), d'oranger ($0,21\pm 0,00$ mS/cm ; S28) et de sauge ($0,20\pm 0,00$ mS/cm ; S34).

La variabilité des résultats obtenus peut s'expliquer par des concentrations différentes en sels minéraux, en acides organiques et en protéines dans chacun des miels étudiés (Terrab et coll., 2004). De plus, l'origine botanique de ces miels ainsi que les conditions climatiques de la région de récolte peuvent aussi expliquer cette disparité des résultats (Fechner et coll., 2016).

Hydrométhylfurfural (HMF)

Le HMF est un composé chimique généré par la dégradation du sucre, Maillard ou la caramélisation, et sa concentration est augmentée avec le traitement thermique ou l'exposition à la chaleur (Zarei et coll., 2019). La CLHP s'avère être la méthode la plus appropriée pour la détermination du HMF dans le miel jusqu'à présent car, contrairement aux méthodes basées sur les UV, elle n'interfère pas avec les substances formées par la chaleur et/ou les dommages de stockage (Zappala et coll., 2005). Cependant, un HMF élevé pourrait également être trouvé dans le miel récolté dans les régions chaudes (Sodré et coll., 2011). Étant donné que le miel frais ne contient pas ou des traces de HMF, la faible teneur en HMF est généralement attribuée à la fraîcheur (Zarei et coll., 2019 ; Akgün et coll., 2021).

Les teneurs en HMF des miels étudiés sont mentionnées dans le tableau 2. Les valeurs obtenues, par spectrophotométrie dans l'UV (la méthode de White), se situent entre $1,79\pm 0,02$ et $49,43\pm 0,72$ mg/Kg. Hormis, les cinq miels S5, S12, S16, S35 et S37 ($47,43\pm 2,22$; $40,62\pm 4,41$; $49,43\pm 0,72$; $45,36\pm 1,43$ et $40,64\pm 0,63$ mg/Kg, respectivement), tous les échantillons sont conformes à la valeur seuil fixée par le *Codex Alimentarius* (40 mg/Kg). De plus et en prenant en considération la norme appliquée aux miels produits sous les climats chauds (< 60 mg/Kg), les cinq échantillons de miel restent inclus de cette norme de qualité. Cependant, ces valeurs élevées de HMF peuvent être expliquées soit par un traitement thermique soit par de mauvaises conditions de stockage (Zappala et coll., 2005) dans les cas des miels S12 et S16. Les microclimats semi-

arides et arides des régions d'El Aricha, Mecheria et Bechar (S5, S35 et S37, respectivement), peuvent aussi expliquer cette hausse des valeurs de HMF.

Parmi les 37 échantillons de miels analysés, 18 affichent des valeurs inférieures à 15 mg/kg, ce qui est révélateur de leur très bonne qualité. En effet, ils correspondent aux normes de qualité optimale d'un miel.

La teneur en HMF du miel est affectée par le type de miel. Les plus faibles teneurs en HMF sont déterminées dans les miels multif floraux, l'euphorbe et le camphre (1,79±0,02 mg/kg, S30 ; 2,45±0,34 mg/kg, S20 ; 4,44±0,82 mg/kg, S22 ; 4,66±0,79 mg/kg, S26, respectivement) tandis que les plus élevées sont dans les miels d'oranger et de harmal (49,43±0,72 mg/Kg, S16 ; 45,36±1,43 mg/Kg, S35). Au regard des résultats, il est difficile de faire une affirmation sur la teneur en HMF des types de miel à moins qu'ils ne soient récoltés, transformés et stockés dans les mêmes conditions.

Les valeurs du HMF des miels étudiés sont légèrement supérieures à celles trouvées pour les miels d'Algérie (8,80 – 39,62 mg/Kg) (Zerrouk et coll., 2020) et (1,30 – 31,8 mg/kg) (Ghorab et coll., 2021), de Tunisie (12,07±1,00 – 27,43±1,50 mg/Kg) (Boussaid et coll., 2018), du Portugal (7,4±0,10 – 28,4±0,1 mg/Kg) (Gonçalves et coll., 2018) et de la Turquie (1,59±1,32 – 11,83±4,17 mg/Kg) (Akgün et coll., 2021). Néanmoins, ces valeurs restent inférieures à celles publiées pour d'autres miels algériens (11,04±0,66 – 82,00±0,58 mg/Kg) (Mouhoubi-Tafinine et coll., 2018) et (2,84 - 117,7 mg/kg) (Guerzou et coll., 2021) et palestiniens (10,16±0,53 – 81,86±2,64 mg/kg) (Imtara et coll., 2018).

Pour qu'un kg de miel atteigne un niveau de 40 mg de HMF, qui est le niveau le plus élevé de HMF autorisé par la directive européenne sur le miel (2001), il faut 2 à 4 ans lorsqu'il est stocké à 20 °C (Bogdanov, 2011). Étant donné que la teneur en HMF d'un miel constitue une propriété extrinsèque, elle ne peut être utilisée pour la détermination de son origine florale.

Proline

Dans le miel la quantité d'acides aminés est de l'ordre de 1,0% et la proline est le composant principal avec 50 à 85% du total des acides aminés. Outre la proline, le miel contient 26 acides aminés et leur quantité dépend de l'origine du miel (nectar ou miellat) (Belitz et coll., 2009). La teneur en proline diminue constamment pendant le stockage. Elle pourrait donc être un indicateur de la maturité du miel (Czipa et coll., 2019 ; Bouhlali et coll., 2019). La teneur minimale en proline a été déterminée par la directive européenne sur le miel (2001). Pour la proline, la valeur minimale de 180 mg/kg est internationalement acceptée (Hermosín et coll., 2003).

La teneur en proline des échantillons de miel étudiés est présentée dans le tableau 2. Elle varie entre $265,95 \pm 1,28$ et $1200,66 \pm 1,92$ mg/kg. La concentration la plus faible dans les miels de fleurs est mesurée dans le miel d'oranger ($285,59 \pm 0,88$ mg/kg, S28) et que la quantité la plus élevée dans les miels de romarin ($1200,66 \pm 1,92$ mg/kg, S29) et de chardon marie ($1132,73 \pm 2,49$ mg/kg). Les miels de lavande ($293,31 \pm 0,84$ mg/kg, S1), de harmal ($394,83 \pm 0,63$ mg/kg, S35), de thym ($421,04 \pm 4,32$ mg/kg, S7), d'euphorbe ($458,30 \pm 2,19$ mg/kg, S22), de jujubier ($478,67 \pm 0,77$ mg/kg, S32) et de camphre ($491,47 \pm 7,21$ mg/kg, S26) suivent les miels d'oranger. Dans les autres types de miel, la teneur en proline est supérieure à 500 mg/kg. Dans les miels de fleurs, la teneur en proline a changé dans une large mesure car dans ces miels les rapports nectar et pollen sont très différents.

Comme il n'y a pas de valeur limite pour la teneur en proline du miel en Algérie, la valeur internationale c'est-à-dire un minimum de 180 mg/kg est utilisé pour l'évaluation (Hermosín et coll., 2003). Les niveaux de proline obtenus sont supérieurs à la concentration minimale autorisée, ce qui confirme l'état de maturité et l'absence de falsification des sucres des miels étudiés. Ces concentrations de proline sont très proches de celles rapportées par plusieurs équipes pour les miels du Maroc (Bouhlali et coll., 2019) ($441,67 - 1207,55$ mg/kg) et d'Espagne ($510 \pm 216 - 1322$ mg/kg) (Manzanares et coll., 2014). Cependant, elles restent supérieures à celles trouvées pour les miels d'Algérie ($551,88 \pm 10,50 - 852,0 \pm 9,90$ mg/Kg) (Mouhoubi-Tafnine et coll., 2018), de la Palestine ($229,44 \pm 3,24 - 720,87 \pm 5,18$ mg/kg) (Imtara et coll., 2018), de la Turquie ($357,00 \pm 34,38 - 758,56 \pm 67,73$ mg/Kg) (Akgün et coll., 2021) et du Portugal ($412,3 \pm 4,8 - 566,6 \pm 4,8$ mg/Kg) (Gonçalves et coll., 2018).

Dans cette étude et étant donné que la proline provient principalement de l'abeille mellifère lors de la transformation du nectar en miel, sa concentration varie dans les différents miels selon leur type floral. Cette variabilité est observée aussi au sein des miels d'une même source botanique.

Rotation optique spécifique $[\alpha]_D^{20}$

La rotation optique du miel dépend de la composition et de la concentration des sucres (Bogdanov et coll., 1999 ; Dinkov, 2003). Dans certains pays, comme la Grèce, l'Italie et le Royaume-Uni, la rotation optique est utilisée pour aider à distinguer les miels de fleurs (lévogyres) et de miellat (dextrogyres). La rotation optique positive (dextrogyre) des miels de miellat (Bogdanov et coll., 2004) est attribuée à leur plus faible teneur en fructose et à leur fraction massique plus élevée en di- et oligosaccharides à rotation spécifique positive (exemples : maltose $[\alpha]_D^{20} = +137,0^\circ$, mélézitose $[\alpha]_D^{20} = +88,2^\circ$, erlose $[\alpha]_D^{20} = +121,8^\circ$, raffinose $[\alpha]_D^{20} = +104,1^\circ$) (Bogdanov et Martin, 2002 ; Primorac et coll., 2011 ; Serrano et coll., 2019).

Dans cette étude, tous les échantillons analysés ont montré des moyennes de rotation spécifique optique négatives (lévogyres), y compris les miels de miellat (Tableau 2). La valeur négative la plus élevée est révélée par le miel de moutarde blanche douce (S6), avec une valeur moyenne ($[\alpha]_D^{20} = -14,08 \pm 0,04^\circ$), suivie du miel de lavande (S1) ($[\alpha]_D^{20} = -12,50 \pm 0,25^\circ$) tandis que les valeurs négatives les plus faibles sont obtenues pour les miels multif floraux (S30 et S5), d'oranger et de caroubier ($[\alpha]_D^{20} = -8,30 \pm 0,14^\circ$, S30 ; $[\alpha]_D^{20} = -8,85 \pm 0,03^\circ$, S5 ; $[\alpha]_D^{20} = -8,75 \pm 0,02^\circ$, S16 et $[\alpha]_D^{20} = -8,87 \pm 0,02^\circ$, S10, respectivement). Ces résultats sont similaires à ceux publiés pour les miels algériens ($[\alpha]_D^{20} = -14,35 \pm 0,03^\circ$ - $[\alpha]_D^{20} = -4,65 \pm 0,03^\circ$) (Issaad et coll., 2021) et ($[\alpha]_D^{20} = -18,46 \pm 0,76^\circ$ - $[\alpha]_D^{20} = -2,07 \pm 0,24^\circ$) (Ouchemoukh et coll., 2021), le miel de sarrasin polonais ($[\alpha]_D^{20} = -12,0 \pm 1^\circ$ - $[\alpha]_D^{20} = -7,5 \pm 0,5^\circ$) (Džugan et coll., 2020), les miels portugais ($[\alpha]_D^{20} = -15,4 \pm 0,6^\circ$ - $[\alpha]_D^{20} = -11,9 \pm 0,8^\circ$) (Gonçalves et coll., 2018) et les miels espagnoles ($[\alpha]_D^{20} = -8,94^\circ$ - $[\alpha]_D^{20} = -14,13^\circ$) (Serrano et coll., 2019).

De plus, la rotation spécifique peut être un paramètre utile pour la différenciation des miels monofloraux même si un chevauchement notable se produit avec différents types de miel (Bogdanov et coll., 2004 ; Bogdanov, 2009).

Étant donné que la rotation spécifique est un paramètre potentiellement utile pour la caractérisation du miel et que sa mesure est simple, rapide et peu coûteuse, il serait intéressant qu'une recherche collaborative internationale mette en place et établisse une procédure harmonisée pour l'analyse de la rotation optique du miel.

Minéraux

La présente étude vise aussi à identifier les éléments minéraux majeurs et oligo-éléments contenus dans différents échantillons de miel collectés dans l'ouest algérien. Outre les méthodes physico-chimiques, les techniques d'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) sont utilisées pour évaluer la possibilité de différencier les miels algériens, d'origines botaniques différentes, en fonction de leur teneur en minéraux et du choix d'éléments à pouvoir discriminant plus élevé.

Les concentrations des oligo-éléments et des métaux lourds trouvées dans les échantillons de miel collectés dans trente-sept localités situées dans l'ouest algérien, sont regroupées dans le tableau 3.

Table 3: Données de distribution de la teneur en minéraux ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans les miels de l'ouest algérien.

Echan.	Eléments analysés ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ou ppb à l'exception de Ru, Rh, Pt and Au (ppb ppb)										
	Cr ^{b,c}	Co ^{b,c}	V ^{b,c}	W ^{b,c}	Ru ^{b,c}	Rh ^{b,c}	Pt ^{b,c}	Au ^{b,c}	As ^b	Cd ^{b,c}	Pb ^{b,c}
S1	70,11	9,01	8,62	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	1,27	21,44
S2	55,56	8,73	9,00	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,93	0,83	16,62
S3	38,73	10,33	4,83	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	7,70	1,09	9,73
S4	37,2	12,14	10,04	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	21,56	0,36	0,54
S5	34,07	20,8	6,88	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	3,38	0,9	20,25
S6	56,21	4,57	7,30	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,70	0,79	21,05
S7	27,63	5,96	1,57	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	1,75	8,14	9,87
S8	45,89	4,73	4,94	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	18,2	0,24	- ^d
S9	41,02	17,32	6,00	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,05	0,54	11,94
S10	87,37	12,67	7,29	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	5,36	0,55	14,83
S11	43,74	6,61	79,73	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	3,95	1,50	23,2
S12	53,39	1,45	4,48	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	5,54	0,77	10,78
S13	59,05	3,36	5,12	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,80	0,97	9,21
S14	74,83	4,2	13,98	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6,43	1,04	13,75
S15	29,6	3,56	6,52	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	5,27	1,26	17,93
S16	38,58	1,02	1,44	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	1,61	1,05	12,84
S17	39,84	0,36	2,10	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	1,68	- ^d	132,73
S18	41,39	3,29	3,42	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6,28	1,14	15,28
S19	55,46	5,77	13,84	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6,31	0,84	14,39
S20	34,15	2,82	3,23	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	5,93	0,83	10,18
S21	42,62	4,6	10,26	10,65	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6,68	3,38	89,44
S22	39,17	8,42	4,58	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6,23	1,43	14,23
S23	46,89	5,25	9,09	17,18	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	7,73	0,41	40,55
S24	30,18	3,25	6,40	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	6,28	0,98	14,95
S25	29,13	4,18	4,55	11,10	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	8,19	0,86	24,57
S26	58,86	7,82	106,51	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	3,95	0,69	9,74
S27	27,36	3,07	4,75	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,92	0,9	26,52
S28	37,06	7,04	7,68	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	7,38	0,56	11,15
S29	27,81	1,89	0,81	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	2,70	1,05	11,91
S30	37,61	16,64	7,65	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	2,81	2,94	91,36
S31	62,04	17,78	27,11	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	10,41	1,14	24,70
S32	53,73	16,95	15,35	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	5,64	0,89	21,32
S33	50,33	12,11	11,62	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	2,90	0,99	20,95
S34	44,25	12,94	10,24	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,35	1,00	74,99
S35	72,11	21,19	16,47	24,30	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	8,30	0,84	16,41
S36	55,96	1,01	44,33	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,95	1,02	8,21
S37	47,23	6,74	12,37	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	3,96	1,19	27,3
Statistiques											
Moyenne	46,65	7,83	13,52	15,81	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	5,86	1,23	24,73
Max.	87,37	21,19	106,51	24,30	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	21,56	8,14	132,73
Min.	27,36	0,36	0,81	10,65	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	1,61	0,24	0,54
SD	14,43	5,82	21,05	4,93	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	4,03	1,32	27,59

Echantillon : Echan. ; ^aEléments majeurs; ^bOligo-éléments; ^{b,c}Oligo-éléments/Métaux lourds; ^dConcentrations inférieures à la LOQ; SD: Écart-type.

Table 3 (Suite): Données de distribution de la teneur en minéraux (mg/kg) dans les miels de l'ouest algérien.

Echan.	Eléments analysés (mg/kg)								Minéraux totaux
	K ^a	Na ^a	Ca ^a	Mg ^a	Cu ^{b,c}	Mn ^{b,c}	Fe ^{b,c}	Zn ^{b,c}	
S1	808	21,60	56,20	142,0	3,66	13,30	59,6	2,62	1107,58
S2	460	49,20	58,50	126,0	5,70	10,80	24,5	2,39	737,53
S3	418	37,00	64,90	142,0	4,46	11,10	24,4	4,41	706,68
S4	451	30,70	73,60	92,70	9,62	7,67	26,1	3,38	695,19
S5	327	34,10	50,60	77,60	- ^d	5,52	19,6	0,22	514,92
S6	946	146,0	104,0	149,0	5,92	13,90	23,2	3,39	1392,47
S7	241	13,30	33,10	159,0	5,08	12,70	22,6	5,29	492,53
S8	790	22,10	97,80	162,0	4,81	10,50	11,7	4,42	1104,26
S9	441	97,80	85,80	88,80	- ^d	7,85	34,6	9,33	765,57
S10	667	64,40	205,0	120,0	7,86	10,80	57,3	13,9	1147,04
S11	589	104,0	102,0	79,00	3,44	7,61	33,7	4,98	924,28
S12	153	15,30	33,50	116,0	2,80	11,50	24,3	3,08	359,77
S13	572	102,0	104,0	127,0	1,66	13,70	16,3	4,99	942,24
S14	989	77,10	377,0	137,0	- ^d	11,50	17,6	3,45	1613,0
S15	722	32,30	99,90	69,10	5,29	1,36	26,8	0,62	957,88
S16	254	62,30	81,10	89,20	1,95	9,26	26	4,37	528,41
S17	375	129,0	33,30	134,0	7,16	12,10	14,9	4,59	710,58
S18	526	68,20	53,80	133,0	- ^d	13,40	21,6	5,20	821,65
S19	400	110,0	119,0	118,0	2,13	8,12	22,6	2,33	782,65
S20	247	26,50	70,00	112,0	- ^d	10,20	25,1	2,29	493,45
S21	776	23,60	80,80	51,60	6,08	3,83	24	2,59	969,0
S22	675	281,0	100,0	99,50	6,61	7,38	18,1	3,30	1191,51
S23	802	71,70	215,0	55,30	4,67	1,47	26,2	3,63	1180,73
S24	425	156,0	101,0	20,80	- ^d	1,93	8,48	1,87	715,40
S25	777	275,0	287,0	77,80	- ^d	1,69	11,3	2,82	1433,12
S26	470	92,50	132,0	57,00	4,17	9,25	21,1	3,41	789,77
S27	987	23,60	165,0	124,0	7,25	6,55	21,8	4,75	1340,8
S28	338	179,0	91,00	66,80	- ^d	6,50	19,1	2,46	703,31
S29	384	102,0	77,70	85,40	5,46	8,63	26,3	3,17	692,92
S30	471	44,30	70,70	78,40	4,88	3,45	24,1	1,44	699,04
S31	504	64,60	90,80	80,20	3,75	6,10	35,8	2,75	788,61
S32	442	165,0	117,0	92,80	3,59	4,70	38,3	3,62	867,55
S33	510	51,20	70,70	123,0	8,97	6,15	29,5	1,78	801,68
S34	441	114,0	502,0	111,0	- ^d	3,90	25,6	3,68	1201,59
S35	460	66,10	71,90	98,60	2,52	7,28	29,6	2,69	739,34
S36	411	35,90	49,00	42,50	- ^d	6,46	28	2,58	576,28
S37	452	97,40	90,50	92,60	2,78	5,87	15,4	1,93	758,88
Statistiques									
Moyenne	532,46	83,40	113,92	100,83	4,90	7,95	25,28	3,61	871,55
Max.	989,0	281,0	502,0	162,0	9,62	13,9	59,60	13,9	1613,0
Min.	153,0	13,30	33,10	20,80	1,66	1,36	8,48	0,22	359,77
SD	212,69	64,85	95,38	33,88	1,65	3,66	10,39	2,35	290,66

Echantillon : Echan. ; ^aEléments majeurs; ^bOligo-éléments; ^{b,c}Oligo-éléments/Métaux lourds; ^dConcentrations inférieures à la LOQ; SD: Écart-type.

Une validation détaillée de la procédure analytique est effectuée au préalable, y compris la limite de détection des paramètres de performance (LD) et la limite de quantification (LQ); précision, exactitude et incertitude (Tableau 4).

Table 4: Paramètres de validation de la procédure analytique pour la détermination des minéraux.

Elément	Analyse de matériaux de référence certifiés		Paramètres de validation			
	Résultat déclaré par le fabricant	Résultat obtenu dans la recherche personnelle	LD	LQ	Récupération (%)	Incertitude (%)
As ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	112,6 ^a	112,21	0,5	1,0	100,35	16
	39 ^b	42,10			92,64	21
Au ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	2,3	4,6	109,12	26
Ca (mg/kg)	50450 ^a	53700,23	12,1	24,2	93,95	17
	2500 ^b	2356,45			106,09	19
Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1517 ^a	1498,03	0,1	0,2	101,27	13
	233 ^b	276,2			84,36	16
Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	577,3 ^a	774,82	0,1	0,2	74,51	18
	61 ^b	62,76			97,20	20
Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1988 ^a	2123,2	8,0	16,0	93,63	11
	61 ^b	62,76			97,20	14
Cu (mg/kg)	4,7 ^a	4,92	0,7	1,4	95,68	19
	2,8 ^b	3,10			90,32	25
Fe (mg/kg)	367,5 ^a	391,09	3,7	7,2	93,97	10
	46 ^b	39,21			117,32	15
K (mg/kg)	26760 ^a	30207	23,2	46,4	88,59	15
	4170 ^b	4376			95,29	14
Mg (mg/kg)	12000 ^a	12096	9,3	18,6	99,21	17
	2610 ^c	2734			95,46	12
Mn (mg/kg)	246,3 ^a	242,02	0,5	1,0	101,77	19
	488 ^b	460,5			105,97	11
Na (mg/kg)	136,1 ^a	157,15	6,0	12,0	86,61	14
	63 ^b	67,89			92,80	20
Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	167 ^b	163,58	0,2	0,4	102,09	23
Pt ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	3,0	6,0	107,12	24
Ru ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	2,5	5,0	85,34	33
Rh ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	2,2	4,4	105,23	28
V ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	835 ^a	867,58	0,4	0,8	96,24	25
W ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-	-	4,1	8,2	88,12	35
Zn (mg/kg)	30,94 ^a	36,49	0,1	0,2	84,79	21
	38 ^b	38,50			98,70	16

^a NIST-1573a Feuilles de tomates; ^b NIST-1575a Aiguilles de pin (*Pinus taeda*).

La précision et le pourcentage de récupération de la procédure analytique sont déterminés en utilisant des miels sélectionnés au hasard, enrichis individuellement avec des concentrations enrichies et connues d'oligo-éléments et des métaux lourds étudiés (K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn, V, Cr, Co, As, Ru, Rh, Cd, W, Pt, Au et Pb), utilisés comme contrôles positifs. Le pourcentage moyen de récupération des oligo-éléments et des métaux lourds analysés variait entre 74,51% (Co) et 117,32% (Fe) (Tableau 4), ce qui indique une bonne exactitude, précision et validité de la méthode employée.

Les résultats de la teneur en minéraux des miels sont relativement faibles et varient sur une plage comprise entre 0,04 et 0,16% de la composition totale, ce qui est en accord avec la composition des miels de nectar (Hernández et coll., 2005 ; Solayman et coll., 2016).

Au total, 19 oligo-éléments et métaux lourds sont analysés. A noter que les concentrations de 19 éléments sont variables selon l'origine florale du miel (Bogdanov et coll., 2007). Parmi ces éléments les plus abondants sont K, Ca, Na et Mg avec des teneurs moyennes (moyenne \pm écart-type) de $532,46 \pm 212,69$ mg/kg, $113,92 \pm 95,38$ mg/kg, $83,40 \pm 64,85$ mg/kg et $100,83 \pm 33,88$ mg/kg, respectivement.

a-Teneur en minéraux

- Teneurs en potassium (K)

Les échantillons de miel de l'ouest algérien dans la présente enquête ont montré une large gamme de teneurs en K ($153,00-989,00$ mg/kg) représentant 80,08% du total des minéraux présents dans le miel de Bouzedjar (S21).

Conformément à nos données, des quantités similaires de K dans des échantillons de miel ont été précédemment signalées dans les miels produits dans les provinces d'Azilal et de Beni Mellal au Maroc ($256-1023$ mg/kg) (Moujanni et coll., 2017) et en Tunisie ($172,48-976,75$ mg/kg) (Boussaid et coll., 2018). En général, les concentrations de K dans les miels de l'ouest algérien sont plus élevées que celles rapportées pour les miels de Turquie ($1,18-268$ mg/kg) (Kılıç Altun et coll., 2017), de Cisjordanie en Palestine ($42,80-585,00$ mg/kg) (Abdulkhaliq et Swaileh 2017 ; Imtara et coll., 2018) et des provinces de Jableh et Tartous dans la partie occidentale de la Syrie ($38,2-174$ mg/kg) (Khuder et coll., 2010), mais les niveaux sont inférieurs que ceux publiés pour les miels du Portugal ($117,55-2590,60$ mg/kg) (Silva et coll., 2009 ; 2017), d'Italie ($237-6520$ mg/kg) (Conti et coll., 2018 ; Pisani et coll., 2008), de la Libye ($1120,1-1980,6$ mg/kg) (Salama et coll., 2019) et un ensemble de miels d'Espagne ($1615-3770$ mg/kg) (Fernandez-Torres et coll., 2005 ; de Alda-Garcilope et coll., 2012 ; González Paramás et coll., 2000 ; Frías et coll., 2008 ; Rodríguez-Flores et coll., 2016 ; Terrab et coll., 2004a).

Le miel d'eucalyptus présente la deuxième concentration la plus élevée ($987,00$ mg/kg, S27) de K parmi les miels étudiés, tandis que le miel de caroubier contient la quantité la plus faible ($153,00$ mg/kg, S12). Des concentrations élevées de K sont également présentes dans les miels de moutarde blanche douce ($946,00$ mg/kg, S6), de lavande ($808,00$ mg/kg, S1) et de chardon-Marie ($802,00$ mg/kg, S23) par rapport aux autres échantillons de miel étudiés. La concentration de K dans la présente étude est également beaucoup plus élevée que celles des miels de Citrus spp. de Syrie ($38,2-174$ mg/kg) (Khuder et coll., 2010). Cet écart peut être dû à la variation géographique des sources de miel (Conti., 2000).

- Teneur en calcium (Ca)

Une valeur moyenne élevée ($113,92 \pm 95,38$ mg/kg) de Ca est observée dans les miels de l'ouest algérien avec des concentrations allant de ($33,10$ à $502,00$ mg/kg) supérieures aux valeurs

retrouvées dans les miels marocains (19,71 à 200,1 mg/kg) (Moujanni et coll., 2017), tunisiens (113,85-221,07 mg/kg) (Boussaid et coll., 2018), portugais (6,24-134,35 mg/kg) (Silva et coll., 2009 ; Silva et coll., 2017), espagnols (11,69 -218,5 mg/kg) (Fernandez-Torres et coll., 2005 ; de Alda-Garcilope et coll.,2012 ; González Paramás et coll., 2000 ; Terrab et coll., 2004), français (8,90-130,90 mg/kg) (Devilleers et coll., 2002 ; Saunier et coll., 2013), italiens (< 43-283 mg/kg) (Conti et coll., 2018 ; Pisani et coll., 2008), turques (< 0,001-4,5 mg/kg) (Kılıç Altun et coll., 2017), palestiniens (44,50-150,70 mg/kg) (Abdulkhaliq et Swaileh 2017 ; Imtara et coll., 2018), syriens (43,3-118 mg/kg) (Khuder et coll., 2010), grecques (15,22-65,93 mg/kg), chypriotes (23,66-143,47 mg/kg) et égyptiens (44,79-112,10 mg/kg) (Karabagias et coll., 2018) (Tableau 5).

En outre, des échantillons de miel prélevés à différents endroits dans l'ouest de la Libye montrent les concentrations les plus élevées, de toutes les régions méditerranéennes considérées, avec une fourchette comprise entre (923,92 et 1117,5 mg/kg) (Salama et coll., 2019). Il serait intéressant, du fait de la présence en grande quantité de ce minéral, de le proposer dans une stratégie de prévention de l'ostéoporose.

Le miel de sauge présente la concentration la plus élevée (502,00 mg/kg, S34) de Ca, suivi du miel multifloral (377,00 mg/kg, S14), du miel d'eucalyptus (287,00 mg/kg, S25) et du miel de chardon-Marie (215,00 mg/kg, S23). Il est à noter qu'il existe certaines similitudes entre les teneurs en Ca de certains types de miels de l'ouest algérien et ceux provenant des pays voisins. Par exemple, la concentration en Ca du miel d'eucalyptus est similaire à celle du miel de caroube de la province de Rabat au Maroc (286,01±5,79 mg/kg) (El-Haskoury et coll., 2018), tandis que le miel de chardon-Marie a une concentration en Ca similaire à celle du miel de menthe tunisienne (221,07±5,16 mg/kg) (Boussaid et coll., 2018).

-Teneur en sodium (Na)

Les concentrations de Na dans les échantillons de miel de l'ouest algérien sont plus élevées que celles rapportées pour les miels du Portugal (0,36-95,13 mg/kg) (Silva et coll., 2017), d'Espagne (11-84 mg/kg) (Rodríguez-Flores et coll., 2016), d'Italie (4,8-176 mg/kg) (Conti et coll., 2018 ; Pisani et coll., 2008) et de Turquie (0,48-13,1 mg/kg) (Kılıç Altun et coll., 2017).

Les miels d'euphorbe et d'eucalyptus contiennent les concentrations les plus élevées de Na (281,00 mg/kg, S22 ; 275,00 mg/kg, S25, respectivement) parmi les types de miel, tandis que les miels de thym, de lavande et de chardon-Marie renferment les quantités les plus faibles (13,30 mg/kg, S7 ; 21,60 mg/kg, S1 ; 22,10 mg/kg, S8, respectivement).

Tableau 5: Comparaison des teneurs en minéraux dans les échantillons de miel provenant des régions méditerranéennes.

Element	Present study	Maroc ^a N=29	Maroc ^b N=8	Tunisie ^c N=6	Portugal ^d N=38	Portugal ^e N=16	Espagne ^f N=40	Espagne ^g N=8	Espagne ^h N=60	Espagne ⁱ N=140	Espagne ⁱ N=41
Cr	27.36-87.37 µg/kg	-	-	0.02-0.32	-	-	-	-	0.049-4.480	-	-
Co	0.36-21.19 µg/kg	-	nd	-	-	-	-	-	0.015-0.720	-	-
V	0.81-106.51 µg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	10.65-24.30 µg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ru	< LQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rh	< LQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt	< LQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Au	< LQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
As	1.61-21.56 µg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd	0.24-8.14 µg/kg	-	nd	-	-	-	-	-	nd-0.355	4.21-4.56 µg/kg	-
Pb	0.54-132.73 µg/kg	≤ 0.1	nd	0.01-0.05	-	-	-	-	-	46.32-31.50 µg/kg	-
K	153.00-989.00	256-1023	644.02-1883.15	172.48-976.75	117.55-2590.60	42.98-1352.90	434.1-1935	545.45-5570.73	514-6785	-	1615-3770
Na	13.30-281.00	18.81-118.74	367.52-855.24	251.34-521.22	90.22-727.79	0.36-95.13	11.69-218.5	9.18-151.65	38-476	-	11-84
Ca	33.10-502.00	19.71-200.1	129.35-688.43	113.85-221.07	6.24-134.35	2.77-234.63	42.59-341.0	15.14-181.69	107-420	-	68-476
Mg	20.80-162.00	19.85-45.84	18.42-131.21	-	10.62-70.41	1.79-230.81	13.26-74.38	42.11-1078.95	19-173	-	30-402
Cu	1.66-9.62	≤ 0.1	0.11-1.82	0.12-0.34	-	0.00-5.35	0.531-2.117	nd	0.547-2.300	0.74-1.88	1-7
Mn	1.36-13.90	0.28-1.74	-	-	-	0.00-22.62	0.133-9.471	-	3.4-45	-	-
Fe	8.48-59.60	1.46-13.95	0.71-4.68	0.83-3.54	-	0.18-2.68	-	nd-7.07	0.71-60	2.26-4.70	0-7
Zn	0.22-13.90	≤ 0.1-0.69	1.41-4.26	0.42-2.06	-	0.03-3.29	1.332-7.825	0.30-7.06	0.93-5.9	2.34-3.47	0-7

Pour chaque teneur, l'intervalle min-max est mentionné. Toutes les valeurs sont en mg/kg, sauf indication contraire. nd : non détecté ; < LQ : Concentrations inférieures à la LQ ; N : Nombre d'échantillons de miel.

^aMoujanni et coll. (2017), ^bEl-Haskoury et coll. (2018), ^cBoussaid et coll. (2018), ^dSilva et coll. (2009), ^eSilva et coll. (2017), ^fFernandez-Torres et coll. (2005), ^gde Alda-Garcilope et coll. (2012), ^hGonzález Paramás et coll. (2000), ⁱFrias et coll. (2008), ^jRodríguez-Flores et coll. (2016), ^kTerrab et coll. (2004a), ^lDevillers et coll. (2002), ^mSaunier et coll. (2013), ⁿConti et coll. (2018), ^oPisani et coll. (2008), ^pKılıç Altun et coll. (2017), ^qKarabagias et coll. (2018), ^rAbdulkhalik and Swaileh (2017), ^sImtara et coll. (2018), ^tKhuder et coll. (2010), ^uSalama et coll. (2019).

Tableau 5 (Suite): Comparaison des teneurs en minéraux dans les échantillons de miel provenant des régions méditerranéennes.

Element	Espagne ^k N=25	France ^l N=86	France ^m N=40	Italie ⁿ N=40	Italie ^o N=51	Turquie ^p N=71	Grèce ^q N=12	Chypre ^q N=14	Egypte ^q N=8	Palestine ^r N=21	Palestine ^s N=10	Syrie ^t N=6	Libye ^u N=8
Cr	-	0.08-0.36	-	10-328	-	< 1 µg/kg	< 0.12	< 0.12	< 0.12	0.00-0.51	-	< 0.018-0.054	-
Co	-	0.10-0.23	-	1.0-17	2.9-30.2	-	< 0.03	< 0.03	< 0.03	-	-	-	-
V	-	-	-	< 3-24	-	-	< 0.11	< 0.11	< 0.11	-	-	-	-
W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ru	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Au	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
As	-	-	nd-8.0	< 25	2.8-11.1	-	< 0.08	< 0.08	< 0.08	-	-	-	0.006-0.018
Cd	-	0.08-0.25	1-22	1.3-4.2	1.0-15.3	< 1 µg/kg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	-	-	-	0.125-0.150
Pb	-	0.28-1.08	3-101	9-209	28-304	< 1 µg/kg	< 0.08	< 0.08	< 0.08	-	0.51-0.94	< 0.082	2.42- 10.98
K	261-1380	-	-	237-6520	178-4140	1.18-268	-	-	-	42.80-585.00	203.92-495.48	38.2-174	1120.1- 1980.6
Na	256-501	-	-	4.8-176	60-147	0.48-13.1	-	-	-	41.80-306.30	35.19-196.51	-	506.8- 804.6
Ca	110-248	8.90-130.90	36-219	< 43-283	159-373	< 0.001-4.5	15.22-65.93	23.66-143.47	44.79-112.10	44.50-150.70	64.49-138.41	43.3-118	923.92- 1117.5
Mg	37-139	3.62-68.78	33-145	6.2-148	22-159	-	20.13-109.53	9.24-80.48	12.17-22.04	12.30-46.70	20.48-54.15	-	-
Cu	-	0.06-1.71	-	0.06-5.4	0.20-2.79	< 1-929 µg/kg	< 0.35	< 0.35	< 0.35	0.00-1.52	0.61-1.22	0.616-2.21	-
Mn	-	0.11-42.81	1.4-12.8	0.09-2.8	0.13-16.9	< 1-274 µg/kg	0.26-5.54	0.07-4.11	0.17-0.55	0.11-0.99	-	0.153-1.69	-
Fe	-	0.56-86.76	-	< 1-4.4	1.0-6.3	< 1-7254.62 µg/kg	0.75-4.16	0.96-3.97	2.18-8.45	2.00-10.80	2.25-8.75	1.46-16.9	-
Zn	-	0.17-6.42	nd-1.4	< 0.5-8.9	0.72-3.66	< 1-237 µg/kg	0.97-9.30	0.86-6.94	0.55-1.68	1.00-19.90	0.13-25.20	0.206-2.76	-

Pour chaque teneur, l'intervalle min-max est mentionné. Toutes les valeurs sont en mg/kg, sauf indication contraire. nd : non détecté ; < LQ : Concentrations inférieures à la LQ ; N : Nombre d'échantillons de miel.

^aMoujanni et coll. (2017), ^bEl-Haskoury et coll. (2018), ^cBoussaid et coll. (2018), ^dSilva et coll. (2009), ^eSilva et coll. (2017), ^fFernandez-Torres et coll. (2005), ^gde Alda-Garcilope et coll. (2012), ^hGonzález Paramás et coll. (2000), ⁱFrías et coll. (2008), ^jRodríguez-Flores et coll. (2016), ^kTerrab et coll. (2004a), ^lDevillers et coll. (2002), ^mSaunier et coll. (2013), ⁿConti et coll. (2018), ^oPisani et coll. (2008), ^pKılıç Altun et coll. (2017), ^qKarabagias et coll. (2018), ^rAbdulkhalik and Swaileh (2017), ^sImtara et coll. (2018), ^tKhuder et coll. (2010), ^uSalama et coll. (2019).

D'autres miels de l'ouest algérien comme les miels d'oranger, de jujubier et de moutarde blanche douce sont également riches en Na (179,00 mg/kg, S28 ; 165,00 mg/kg, S32 ; 146,00 mg/kg, S6, respectivement) par rapport aux autres échantillons de miels étudiés. D'autre part, il convient de noter que des concentrations plus élevées de K et de Na sont présentes dans le miel de moutarde blanche douce collecté à Aïn Fezza (S6), située dans la province de Tlemcen (Tableau 1). La teneur élevée en K et Na dans ce type de miel le rend moins dangereux lorsqu'il est consommé par des patients hypertendus.

-Teneur en magnésium (Mg)

Le magnésium est le quatrième élément le plus abondant dans la présente étude, avec des teneurs allant de 20,80 à 162,00 mg/kg. Ces concentrations sont similaires à celles des miels italiens (22-159 mg/kg) comme rapporté par Pisani et coll., (2008), et sont plus élevés que ceux provenant de la plupart des pays de la région méditerranéenne (Tableau 5) à l'exception des miels du Portugal (2,77-234,63 mg/kg) (Silva et coll., 2017) et d'Espagne (30,00-402,00 mg /kg) (Rodríguez-Flores et coll., 2016).

Le miel de chardon-Marie contient la concentration la plus élevée (162,00 mg/kg, S8) de Mg parmi les miels étudiés, tandis que les miels multif floraux S24 et S36 (20,80 mg/kg et 42,50 mg/kg, respectivement) renferment la plus faible. Des concentrations élevées de Mg sont également présentes dans les types de miel de thym (159,00 mg/kg, S7), de moutarde blanche douce (149,00 mg/kg, S6) et de lavande (142 mg/kg, S1), qui sont similaires aux miels d'Espagne (159 mg/kg) (Pisani et coll., 2008) et de France (145 mg/kg) (Saunier et coll., 2013).

-Teneur en Fer (Fe)

Dans le cas du Fe, ses concentrations dans les miels de l'ouest algérien varient de 8,48 à 59,60 mg/kg. Des échantillons de miel provenant des pays méditerranéens ont montré des teneurs en Fe plus faibles (Tableau 5). Il est à souligner que les niveaux de Fe les plus élevés sont trouvés dans le miel de lavande (59,60 mg/kg, S1), tandis que le miel multifloral (8,48 mg/kg, S24), l'eucalyptus (11,30 mg/kg, S25) et le chardon-Marie (11,70 mg/kg, S8) contiennent les teneurs les plus faibles. Les valeurs obtenues sont bien inférieures à la dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) par poids corporel (5,6 mg/kg de poids corporel) recommandée par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) (Joint FAO/WHO 1983).

-Teneur en manganèse (Mn)

La concentration de Mn dans les miels de l'ouest algérien est comprise entre 1,36 et 13,90 mg/kg. Parmi les miels étudiés, le miel de moutarde blanche douce est le plus riche en Mn (13,90 mg/kg, S6). Des concentrations élevées de Mn sont également présentes dans les miels de

chardon-Marie et de lavande (13,40 mg/kg, S18 ; 13,30 mg/kg, S1, respectivement) ainsi que dans le miel de thym (12,70 mg/kg, S7). Les niveaux de Mn dans les miels étudiés dans cette étude sont plus élevés que ceux rapportés pour la plupart des miels provenant de la région méditerranéenne (Tableau 5).

-Teneur en zinc (Zn)

Dans la présente étude, les concentrations de Zn varient de 0,22 à 13,90 mg/kg (moyenne±écart-type ; 3,61±2,35 mg/kg). La teneur en Zn la plus élevée est de 13,90 mg/kg dans le miel de caroubier (S10), tandis que la plus faible est de 0,22 mg/kg dans le miel multifloral (S5). Les niveaux de Zn dans les miels de l'ouest algérien sont inférieurs à ceux des miels de la Palestine (0,13-25,20 mg/kg et 1,00-19,90 mg/kg, respectivement) (Imtara et coll., 2018 ; Abdulkhaliq et Swaileh 2017), mais restent supérieurs aux miels du Maroc (\leq 0,1-0,69 mg/kg) (Moujanni et coll., 2017), de Tunisie (0,42-2,06 mg/kg) (Boussaid et coll., 2018), du Portugal (0,03-3,29 mg/kg) (Silva et coll., 2017), d'Espagne (2,34-3,47 mg/kg) (Frías et coll., 2008), de France (nd-1,4 mg/kg) (Saunier et coll., 2013), d'Italie (0,72-3,66 mg/kg) (Pisani et coll., 2008), de Turquie ($<$ 1-237 μ g/kg) (Kılıç Altun et coll., 2017), de Grèce (0,97-9,30 mg/kg), de Chypre (0,86-6,94 mg/kg), d'Égypte (0,55-1,68 mg/kg) (Karabagias et coll., 2018) et de la Syrie (0,206-2,76 mg/kg) (Khuder et coll., 2010). Dans le cas des concentrations de Zn, 91% de nos miels se situent dans l'intervalle d'apport hebdomadaire maximal tolérable (2,1-7 mg/kg de poids corporel) (Joint FAO/WHO 1982a).

-Teneur en cuivre (Cu)

Les concentrations de Cu dans les miels de l'ouest algérien varient de 1,66 à 9,62 mg/kg (moyenne±écart-type ; 4,90±1,64 mg/kg). Les concentrations les plus élevées de Cu se trouvent dans les miels multif floraux, de jujubier et de caroubier (9,62 mg/kg, S4 ; 8,97 mg/kg, S33 et 7,86 mg/kg, S10, respectivement), mais le Cu n'a pas été détecté dans plus d'un quart des miels étudiés. Malheureusement, les niveaux dans environ 54 % des miels étudiés sont supérieurs à la DHTP (3,5 mg/kg de poids corporel) pour le Cu établie par la FAO/OMS (1982b). Généralement, Cu est transféré et accumulé dans les aliments sous l'influence de l'environnement et également en raison des apports humains (engrais, pesticides,..) (Provenzano et coll., 2010).

Les teneurs en cuivre du miel de l'ouest algérien sont légèrement supérieures à celles des miels du Maroc (\leq 0,1 mg/kg) (Moujanni et coll., 2017), de Tunisie (0,12-0,34 mg/kg) (Boussaid et coll., 2018), du Portugal (0,00-5,35 mg/kg) (Silva et coll., 2017), de France (0,06-1,71 mg/kg) (Devillers et coll., 2002) et autres pays méditerranéens (Tableau 5).

En résumé, le miel d'eucalyptus contient les valeurs de K et de Na les plus élevées. Le miel de sauge est riche en Ca, tandis que le miel de chardon-Marie est riche en Mg. Le miel de lavande renferme des niveaux élevés de Fe lorsque le caroubier est le plus riche en Zn. Notre étude montre également que le miel de moutarde blanche douce contient le plus haut niveau de Mn, alors que les miels de jujubier et de caroubier contiennent du Cu à des concentrations élevées.

Généralement, les miels de l'ouest algérien sont riches en minéraux. Ces derniers constituent une fraction importante des micronutriments faisant des miels des produits alimentaires précieux. Certains de ces éléments sont absolument vitaux, d'autres simplement souhaitables ou bénéfiques. En effet, ils ont des rôles importants dans l'activation de certaines enzymes ; ceux-ci incluent Mg, Fe, Mn, Zn et Cu, qui jouent un rôle important dans les transformations métaboliques du corps humain, tandis que K, Ca et Na sont essentiels à la construction d'os et de dents solides, aux contractions musculaires, aux signaux nerveux et à la régulation du rythme cardiaque et l'équilibre hydrique dans les cellules, etc. (Pohl et coll., 2012). Leurs carences jouent un rôle critique dans de nombreux troubles tels que l'hypertension et l'ostéoporose (Grosvenor et Smolin, 2009). Certains miels étudiés sont une source importante de micronutriments utiles au bon fonctionnement de l'organisme humain, et par conséquent leur consommation est fortement recommandée notamment en cas de carence.

b-Teneur en métaux lourds et métalloïdes

Afin vérifier la qualité des miels de l'ouest algérien, en plus de Mn, Fe, Zn et Cu, il est très important d'évaluer et de surveiller les concentrations d'autres métaux lourds et métalloïdes, qui sont potentiellement toxiques. Parmi eux figurent l'arsenic, le plomb, le chrome, le cadmium, le vanadium, le tungstène, le cobalt, le ruthénium, le rhodium, le platine et l'or. Dans la présente étude, les concentrations relatives de ces éléments dans les échantillons de miel ont diminué dans l'ordre suivant : $Pb > V > Cr > W > As > Co > Cd > Ru, Rh, Pt$ et Au . Tous sont détectés à un niveau < 1 mg/kg. Les données résultantes, regroupées dans le tableau 5, sont cohérentes avec les intervalles indiquées pour les miels d'autres études (González Paramás et coll., 2000 ; Frías et coll., 2008 ; Devillers et coll., 2002 ; Kılıç Altun et coll., 2017 ; Karabagias et coll., 2018).

-Teneur en plomb (Pb)

Le plomb est considéré comme contaminant et toxique pour les organismes vivants, même à de très faibles concentrations. Sa teneur en miel est examinée dans plusieurs études. Les valeurs de l'intervalle de teneur en Pb dans les échantillons de miel de la région ouest algérienne comprises entre 0,54 et 132,73 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Le Pb se trouve à des concentrations élevées dans les échantillons de miels multif floraux (132,73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S17 ; 91,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S30 et 89,44 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S21), et

totallement absent dans le chardon-Marie (S8). De plus, les concentrations de Pb observées sont supérieures à celles mesurées pour les miels du Maroc ($\leq 0,1$ mg/kg) (Moujanni et coll., 2017), de Tunisie (0,01-0,05 mg/kg) (Boussaid et coll., 2018), de Grèce ($< 0,08$ mg/kg), de Chypre ($< 0,08$ mg/kg), d'Égypte ($< 0,08$ mg/kg) (Karabagias et coll., 2018), d'Espagne (46,32-31,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Frías et coll., 2008) et de Syrie ($< 0,082$ mg/kg) (Khuder et coll., 2010). Cependant, les concentrations trouvées sont inférieures à celles publiées pour les miels de la Palestine (0,51-0,94 mg/kg) (Imtara et coll., 2018), de France (3-101 mg/kg) (Saunier et coll., 2013) et d'Italie (28-304 mg/kg, Pisani et coll., 2008 ; 9-209 mg/kg, Conti et coll., 2018).

Dans cette étude, le niveau moyen de Pb dans les échantillons de miel est de 24,73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ce qui est toujours dans la DHTP de Pb pour les adultes (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel) (Joint FAO/WHO 1999). Les niveaux extrêmement élevés de Pb trouvés dans les miels italiens dépeignent une contamination causée par des sources externes ou par des procédures incorrectes lors du traitement du miel, comme l'ont rapporté Pisani et coll. (2008).

-Teneur en Vanadium (V)

Le vanadium est un composant naturel de la croûte terrestre, qui est répandu dans la nature. L'une des principales sources de pollution environnementale par V provient de la combustion de combustibles fossiles (Awofolu, 2004). La valeur moyenne de la teneur en V dans les échantillons de miel des trente-sept localités de l'ouest algérien est de 13,52 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Parmi les miels étudiés, les miels de camphre et de thym sont les plus riches en V (106,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S26 ; 79,73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S11, respectivement), tandis que le miel de romarin (0,81 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S29) est le plus pauvre.

Dans cette étude, les niveaux de V sont inférieurs à ceux rapportés par Conti et coll., (2018) (Tableau 5). Il n'existe actuellement aucune norme sanitaire de référence attribuée par le JECFA pour le vanadium.

-Teneur en Chrome (Cr)

Le chrome est abondant dans l'environnement à l'état trivalent ou hexavalent. On le trouve à l'état trivalent, à faible concentration, dans une large gamme d'aliments (Cefalu et Hu, 2004). Sa teneur dans les aliments peut être fortement affectée par des facteurs anthropiques et géochimiques.

Les valeurs moyennes et extrêmes de la teneur en Cr des échantillons de miel étudiés sont de 46,65 et 27,36-87,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les niveaux observés sont inférieurs à ceux rapportés pour les miels de Tunisie (0,02-0,32 mg/kg) (Boussaid et coll., 2018), de France (0,08-0,36 mg/kg) (Devillers et coll., 2002), de la Palestine (0,00-0,51 mg/kg) (Abdulkhaliq et Swaileh, 2017) et

d'Espagne (0,049-4,480 mg/kg) (González Paramás et coll., 2000). En revanche, de très faibles teneurs en Cr sont trouvées dans les miels d'eucalyptus, de thym et de romarin (27,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S27 ; 27,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S7 et 27,81 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S29, respectivement) alors que le caroubier contient la concentration la plus élevée (87,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S10). Le chrome a une faible toxicité dans les aliments en partie en raison de sa faible biodisponibilité. Actuellement, il n'y a pas d'apport nutritionnel recommandé formel pour le Cr (SCF, 2003).

-Teneur en tungstène (W)

Le tungstène se trouve naturellement sur Terre presque exclusivement à l'état combiné avec d'autres éléments dans les minerais comme le wolframite et la scheelite. Parce que c'est un métal rare et que ses composés sont généralement inertes, les effets du W sur l'environnement sont limités (Strigul et coll., 2005).

Peu d'échantillons de miel de la région ouest algérienne contiennent des concentrations quantifiables de W. La concentration la plus élevée de W est trouvée dans le miel harmal (24,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S35). De plus, les concentrations en W d'environ 90% des miels sont inférieures à la LQ. Le tungstène n'est pas étudié dans d'autres études autour de la région méditerranéenne. Par conséquent, il n'est pas possible de commenter les différences de niveau de W dans les miels.

-Teneur en Arsenic (As)

L'arsenic est un élément omniprésent aux propriétés métalloïdes. Il se produit naturellement sous forme organique et inorganique. Celui-ci, en fait, est le plus toxique et est considéré comme cancérigène pour l'homme (Kapaj et coll., 2006). Les composés d'As sont principalement utilisés dans l'agriculture et la foresterie comme pesticides et herbicides (OMS 2010). Les niveaux d'As varient de 1,61 à 21,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec une concentration moyenne de 5,86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Tableau 3). Les niveaux les plus élevés d'As sont trouvés dans les miels multif floraux et de chardon-Marie (21,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S4 et 18,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S8, respectivement) alors que sa concentration est inférieure à la LQ dans le miel de lavande (S1). De plus, de faibles concentrations sont trouvées dans les miels d'oranger et de thym (1,61 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S16 et 1,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S7, respectivement).

Les teneurs en As, dans cette étude, sont similaires à celles publiées pour les miels collectés en Libye (0,006-0,018 mg/kg) (Salama et coll., 2019) et sont inférieures à celles des miels du Maroc (0,00-0,045 mg/kg) (Chakir et coll., 2011), de la Grèce, de Chypre et d'Égypte (< 0,08 mg/kg) (Karabagias et coll., 2018).

Des teneurs très élevées en As sont rapportées dans certains miels de France (nd-8,0 mg/kg) (Saunier et coll., 2013) et d'Italie (< 25 mg/kg ; 2,8-11,1 mg/kg, respectivement) (Conti et coll., 2018 ; Pisani et coll., 2008), qui peuvent provenir d'une contamination environnementale.

Jusqu'à 94% de nos valeurs sont inférieures à la DHTP d'As inorganique (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel) établie par le JECFA en 1983 (Joint FAO/WHO 1988).

-Teneur en Cobalt (Co)

De faibles concentrations de Co (0,36-21,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sont observées dans les échantillons de miel de l'ouest algérien étudiés. Elles sont inférieures à celles précédemment rapportées pour les miels marocains (0,00-1,435 mg/kg) (Chakir et coll., 2011), français (0,10-0,23 mg/kg) (Devillers et coll., 2002), espagnols (0,015-0,720 mg/kg) (González Paramás et coll., 2000) et italiens (1,0-17 mg/kg et 2,9-30,2 mg/kg, respectivement) (Conti et coll., 2018; Pisani et coll., 2008). Par ailleurs, les niveaux de Co sont similaires à ceux publiés pour les miels provenant de Grèce, de Chypre et d'Égypte (< 0,03 mg/kg) rapportés par Karabagias et coll. (2018). Les concentrations les plus élevées de Co sont trouvées dans le miel de harmal (21,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S35), tandis que les plus faibles se trouvent dans les miels multif floraux et d'oranger (0,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S17 ; 1,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S16, respectivement). Dans l'ensemble, les résultats obtenus indiquent qu'il existe de faibles niveaux de contamination au Co dans les échantillons de miel de l'ouest algérien. Il n'existe actuellement aucun niveau supérieur d'apport établi par l'OMS et le JECFA pour le cobalt.

-Teneur en Cadmium (Cd)

Le cadmium est un élément métallique qui se produit naturellement à de faibles concentrations dans l'environnement. Il a été ajouté à l'environnement par des activités anthropiques telles que la production de métal Cd dans les processus industriels ou par l'utilisation d'engrais phosphatés sur les sols agricoles (OMS 1992).

Le niveau de Cd dans les échantillons de miel de l'ouest algérien varie de 0,24 à 8,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ce qui est inférieur à celui rapporté pour les miels de la plupart des pays méditerranéens. Cependant, les teneurs en Cd de la moitié d'entre eux sont supérieures à celles des miels de Turquie (< 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) comme le rapportent Kılıç Altun et coll. (2017) (Tableau 5). De plus, le Cd est présent à une concentration élevée dans le miel de thym (8,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S7) et en dessous de la LQ dans le miel multifloral (S17). En 2005, le Joint FAO/WHO a établi une DHTP (7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ du poids corporel) pour le Cd. Il est à noter que la valeur moyenne (1,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$) des miels étudiés est inférieure à celle recommandée par Joint FAO/WHO (2005).

-Teneur en Ru, Rh, Pt, Au et Ag

Le ruthénium, le rhodium et le platine font partie des métaux du groupe du platine appartenant aux métaux de transition du groupe VIII. Ils sont généralement regroupés avec l'or et l'argent en tant que métaux précieux. Chacun d'eux se produit naturellement sous sa forme native

et, dans les gisements économiquement exploitables, les éléments se présentent en très grande majorité sous forme d'espèces minérales. Les utilisations de ces métaux se répartissent entre les industries chimiques, électriques, de la joaillerie et du verre. Afin de savoir si ces métaux se sont retrouvés dans les miels de l'ouest algérien, leurs niveaux sont contrôlés dans tous les échantillons considérés. Dans cette étude, les résultats montrent que les teneurs en éléments Ru, Rh, Pt et Au sont inférieures à la LQ dans tous les échantillons de miel testés.

En résumé, les niveaux de métaux lourds et de métalloïdes sont généralement faibles et comparables aux résultats publiés pour les miels provenant de régions non contaminées (Kılıç Altun et coll., 2017 ; Moujanni et coll., 2017 ; Boussaid et coll., 2018), ce qui indique que les miels de l'ouest algérien sont de bonne qualité.

-Méthodes statistiques multi variées

L'ACP et la CAH des 37 échantillons de miel sont réalisées par le logiciel XLSTAT 2014.5.03 pour les oligo-éléments et les métaux lourds (Tableau 3). Les éléments Ru, Rh, Pt et Au sont exclus de cette analyse à cause de leur non détection. Les résultats de l'estimation de la variance (valeurs propres) obtenus sont mentionnés dans le tableau 6.

Tableau 6: Valeurs propres et pourcentages cumulés de la variance totale (%).

Echantillons de miel		
Composants principaux	Valeur propre	% Cumulé
1	1,937	30,38
2	1,607	54,33
3	1,562	54,79
4	1,209	60,89

L'ACP est une technique très puissante de reconnaissance des échantillons qui décrit la variance d'un grand ensemble de données de variables intercorrélées avec un ensemble inférieur de variables indépendantes (Lanjwani et Channa 2019). D'après le tableau 6, une PCA contenant 60,89 % de la variance totale de l'ensemble des données est observée. Les valeurs propres de la première composante et le % cumulé sont 1,937 et 30,38, les valeurs propres de la deuxième composante 1,607, % cumulé 54,33, les valeurs propres de la troisième composante 1,562, % cumulé 54,79 et les valeurs propres de la quatrième composante 1,209, % cumulé 60,89 de la variance totale.

La CAH est réalisée pour classer les données selon l'origine botanique et la teneur en minéraux et pour souligner la similitude entre les différents groupes. Le niveau de similarité dans

lequel les explications sont jointes peut être utilisé pour créer un dendrogramme. Dans le présent travail, le niveau de distance de liaison optimal est de 410, représenté par la ligne pointillée sur la figure 4. Il représente une mesure relative de similarité entre les miels analysés.

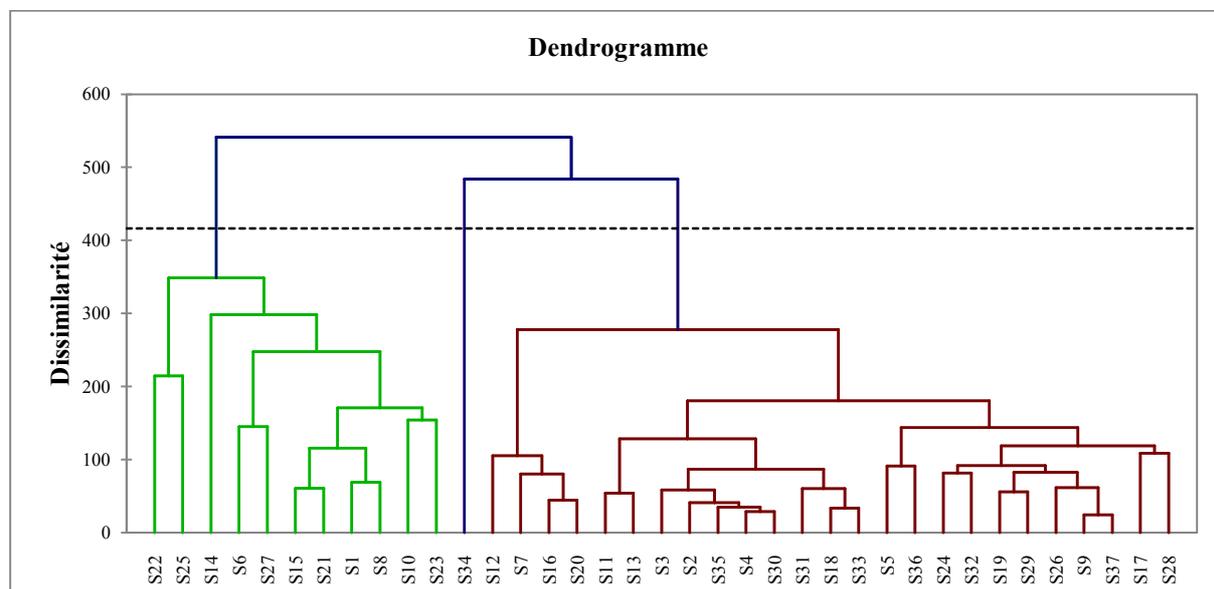


Figure 4: Dendrogramme des paramètres de 37 miels collectés dans l'ouest algérien.

La figure 4 montre que trois groupes sont formés, et qui peuvent être identifiés comme suit : 11 échantillons sont regroupés dans le groupe I (S1, S6, S8, S10, S14, S15, S21, S22, S23, S25 et S27) ; un échantillon dans le groupe II (S34) ; et 25 échantillons dans le groupe III (S2, S3, S4, S5, S7, S9, S11, S12, S13, S16, S17, S18, S19, S20, S24, S26, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S35, S36 et S37).

Le groupe I contient les types de miel de lavande, de moutarde blanche douce, de chardon-Marie, de caroubier, d'euphorbe et d'eucalyptus à haute teneur en minéraux, et qui montrent des similitudes entre eux. Le groupe II contient le miel de sauge. De plus, le groupe III comprend le romarin, le thym, l'oranger, le camphre, le harmel, le jujubier et de nombreux miels multif floraux à faible teneur en minéraux, corrélés entre eux. Ces résultats montrent que les miels de l'ouest algérien varient selon leurs origines géographiques mais aussi selon leurs caractéristiques mono ou multiflorales (Tableau 1). En outre, il convient de souligner que des séparations claires entre les échantillons sont obtenues à partir de plusieurs emplacements géographiques différents dans l'ouest de l'Algérie. À partir de l'ACP, il peut être vérifié que les caractères qui ont le plus influencé le regroupement des échantillons de miel sont les éléments majeurs K, Na, Ca, Mg et Fe, tandis que les éléments mineurs comme Cr, Co, V, W, As, Cd, Pb sont considérés comme moins importants.

En résumé, la visualisation des données par CAH et PCA offre suffisamment d'informations permettant de développer une méthode de classification pour déterminer l'origine botanique des échantillons de miel en tenant compte de la composition en éléments minéraux.

Dosage des sucres

La détermination de la teneur en sucre est utilisée pour distinguer le miel pur des miels frelatés. L'une des principales caractéristiques du miel est que le fructose est présent en plus grande quantité que le glucose. Environ 40 % de fructose et 30 % de glucose dans le miel, mais cela peut être modifié en fonction de la durée et de la température de stockage, entre autres facteurs. Le sucrose est également présent en faible quantité, idéalement pas plus de 5 % (ou 5 g/100g de miel), avec quelques exceptions, pour lesquelles une quantité plus élevée est autorisée, comme les miels de *Citrus* spp., d'*Eucalyptus camadulensis* (jusqu'à 10 g/100 g) et de *Lavandula* spp. (jusqu'à 15 g/100 g) (Aljohar et coll., 2018).

Dans cette étude, 4 sucres sont identifiés et quantifiés, dont deux monosaccharides (fructose et glucose) et deux disaccharides (saccharose et maltose). La quantification des sucres est résumée dans le tableau 7. Les sucres totaux des 37 échantillons de miel se situent entre $68,12 \pm 0,55$ et $81,47 \pm 0,05$ g/100 g de miel, soit $68,12 \pm 0,55$ et $81,47 \pm 0,05\%$. Les résultats chromatographiques montrent la présence de sucres comme le fructose et le glucose dans tous les échantillons de miel. La teneur en sucre total est la plus élevée dans le miel multifloral ($81,47 \pm 0,05\%$, S20) tandis que le miel de harmal contient la plus faible quantité de sucre total ($68,12 \pm 0,55\%$, S35) parmi tous les échantillons.

La quantité de fructose dans chaque échantillon est supérieure à la quantité de glucose, caractéristique du miel naturel. L'échantillon de miel multifloral contient la plus grande quantité de fructose ($47,47 \pm 1,21\%$, S31). En revanche, la plus faible, avec $33,88 \pm 0,34\%$, est observée dans le miel de harmal (S35). Parmi tous les échantillons de miel, la plus petite quantité de glucose est contenue dans le miel multifloral ($22,07 \pm 0,17\%$, S4), tandis que la plus grande quantité de ce monosaccharide se trouve dans le miel de moutarde blanche douce ($38,01 \pm 0,90\%$, S37). Il est à noter que les miels d'euphorbe (S22) et de moutarde blanche douce (S37) contiennent plus de glucose que de fructose (Tableau 7). La littérature mentionne l'existence de tels miels dits exceptionnels. C'est le cas des miels de colza et pissenlit par exemple (Crane, 1980).

L'analyse CLHP des échantillons de miel testés révèle également la présence de maltose et sucrose dans tous les miels. Leur somme est comprise entre $2,24 \pm 0,03$ (S6) et $8,22 \pm 0,02\%$ (S36) avec une moyenne de 5,41%, ce qui suppose que ces valeurs sont toutes

inférieures à la limite du rapport massique de 5 % pour le sucrose qui est autorisée dans le miel pur. Sur la base des données présentées, les 37 échantillons de miel ne semblent pas être frelatés avec des édulcorants moins chers.

Il est bien connu que pour préciser le potentiel de cristallisation du miel, il faut connaître les sucres et les rapports glucose/eau (G/Eau) et fructose/glucose (F/G) (Laos et coll., 2011). Ce dernier est également typique pour le miel. Plus un miel contient de glucose, plus il a tendance à se cristalliser rapidement. Dans le miel, le rapport fructose/glucose doit idéalement se situer entre 0,9 et 1,35. Un rapport fructose/glucose inférieur à 1,0 conduit à une cristallisation plus rapide du miel alors que la cristallisation devient plus lente lorsque ce rapport est supérieur à 1,0 (El Sohaimy et coll., 2015 ; Aljohar et coll., 2018). Cependant, la cristallisation basée sur le rapport F/G n'est pas clairement démontrée, car le miel contient d'autres sucres et des substances insolubles qui facilitent sa cristallisation.

Dans la présente étude, le rapport moyen du fructose au glucose est de 1,24 indiquant leur origine florale. En effet, les miels de fleurs montrent un rapport F/G d'environ 1 et les miels de miellat d'environ 1,5-2,0 (Gleiter et coll., 2006). De plus, trois miels ont des rapports inférieurs à 1,0. Il s'agit notamment des miels de moutarde blanche douce, d'euphorbe et multifloral ($0,90 \pm 0,02$, S37 ; $0,97 \pm 0,00$, S22 et $0,98 \pm 0,00$, S5, respectivement), ce qui indique leur cristallisation plus facile comparée aux autres miels. Aussi, les miels multif floraux de Sidi Djillali et d'Aïn Sefra (F/G = $1,97 \pm 0,02$, S4 et $1,75 \pm 0,00$, S31, respectivement) présentent des niveaux élevés de fructose par rapport au glucose et au sucrose, ce qui suggère que ces miels pourraient avoir un faible index glycémique (IG). Les avantages de la régulation de l'insuline d'un régime alimentaire à faible IG pour les personnes atteintes de diabète sont bien connus. En effet, des études ont rapporté que les régimes à faible IG sont pertinents pour la prévention et la gestion du diabète et des maladies coronariennes (Augustin et coll., 2015). Par conséquent, les miels S4 et S31 peuvent être recommandées pour les sujets ayant une tolérance réduite au glucose au lieu du sucrose dans les préparations alimentaires pour prévenir le développement du diabète et des maladies coronariennes des artères.

En outre, le rapport G/eau est plus approprié que le F/G pour la prédiction de la cristallisation du miel (Louveaux, 1985). Celle-ci est lente ou nulle lorsque le rapport G/Eau est inférieur à 1, et elle est complète et rapide lorsque le rapport est supérieur à 2 (Amir et coll., 2010). D'après les résultats obtenus, aucun échantillon ne présente un rapport inférieur à 1 ; en revanche 33% des échantillons révèlent des rapports supérieurs à 2 les rendant plus sensibles à la cristallisation, car la teneur en eau est faible et les molécules de glucose ont tendance à se

regrouper rapidement pour former des cristaux. En plus des rapports F/G et G/Eau, plusieurs facteurs, notamment la teneur en sucres (le sucrose, le maltose...), les substances insolubles (la dextrine, les colloïdes, le pollen) et la température de stockage, pourraient également influencer le processus de cristallisation (Buba et coll., 2013). Pendant le vieillissement du miel, il y a une perte de dextrose et de lévulose et une augmentation significative des disaccharides réducteurs (maltose,..) entraînant une modification du rapport F/G (Amir et coll., 2010).

D'autre part, tous les miels contiennent du sucrose qui semble inférieur à la limite de 5 % fixée par la directive européenne sur le miel (2001) et le *Codex Alimentarius* 2001. Habituellement, le miel pur contient une faible quantité de sucrose en raison de la présence de l'enzyme invertase dans le miel qui décompose le sucrose. Aussi, la falsification du sucrose dans le miel peut être suspectée par la présence d'une teneur en sucrose plus élevée, c'est-à-dire supérieure à 8 % (El Sohaimy et coll., 2015, Siddiqui et coll., 2017).

La concentration en maltose est généralement inférieure à 30 mg/g de miel (3%). Elle peut, cependant, atteindre jusqu'à 50 mg/g dans des miels provenant de certaines plantes (Devillers et coll., 2004). Néanmoins, aucune réglementation n'exige un seuil limite. Une concentration trop élevée en maltose peut être un indicateur de falsification.

Les résultats obtenus montrent que la teneur totale en glucose et fructose varie entre $61,71 \pm 0,45$ et $77,94 \pm 0,08$, dépassant 60 g/100 g de miel, ce qui est conforme aux normes fixées par la directive européenne sur le miel (2001) qui préconisent une valeur seuil $> 60\%$ pour le miel de nectar et > 45 g/100 g pour les miels de miellat. La totalité des échantillons de miels étudiés contiennent des quantités supérieures à 60% de monosaccharides et sont donc conformes aux normes et sont en parfait accord avec les résultats des recherches antérieures pour les miels algériens (77,72 - 84,40%) (Zerrouk et coll., 2020), tunisiens (64.71% - 73.69%) (Boussaid et coll., 2018), marocains (67,06 - 79,85%) (Bouddine et coll., 2022), portugais (61 - 78%) (Machado et coll., 2022) et espagnols (63,42 - 73,43%) (Jara-Palacios et coll., 2019).

La composition en sucre dépend en grande partie de la source végétale du miel, de la zone géographique et est influencée par le climat, la transformation et le stockage (Da Silva et coll., 2016 ; Escuredo et coll., 2013). La concentration de fructose et de glucose ainsi que leur rapport sont des indicateurs utiles pour la classification des miels monofloraux (Da Silva et coll., 2016).

Tableau 7: Quantification des sucres.

N°	Echan.	G (%)	F (%)	(M + S) (%)	(F + G) (%)	F/G	G/Eau	Teneur en sucre total
1	S1	31,48±0,24	38,94±0,47	5,94±0,22	70,42±0,71	1,23±0,00	1,83±0,04	76,37±0,93
2	S2	30,65±1,42	40,36±0,40	7,11±0,74	71,01±1,82	1,31±0,05	1,79±0,07	78,13±2,56
3	S3	32,40±0,20	40,76±0,79	6,67±0,09	73,16±0,99	1,25±0,02	1,78±0,02	79,84±1,08
4	S4	22,07±0,17	43,53±0,14	7,75±0,22	65,60±0,03	1,97±0,02	1,27±0,01	73,35±0,26
5	S5	34,64±0,46	34,12±0,15	6,39±0,16	68,76±0,61	0,98±0,00	2,25±0,03	75,15±0,76
6	S6	32,13±0,00	36,22±0,28	2,24±0,03	68,34±0,28	1,12±0,00	1,73±0,00	70,59±0,25
7	S7	30,01±0,34	37,24±0,65	8,14±0,01	67,26±0,99	1,24±0,01	1,42±0,00	75,40±0,98
8	S8	31,98±0,06	41,50±2,06	3,76±0,01	73,49±2,12	1,29±0,06	1,87±0,02	77,24±2,11
9	S9	34,33±0,08	37,88±0,09	5,21±0,05	72,21±0,18	1,10±0,00	2,07±0,04	77,43±0,23
10	S10	31,10±0,07	41,65±0,31	5,33±0,05	72,76±0,38	1,33±0,00	1,69±0,01	78,09±0,44
11	S11	33,99±2,42	40,31±2,07	4,54±0,06	74,30±4,50	1,18±0,02	2,11±0,13	78,84±4,43
12	S12	34,32±0,09	35,87±0,04	4,11±0,06	70,20±0,05	1,04±0,00	1,85±0,03	74,31±0,11
13	S13	33,07±0,13	39,08±0,51	3,91±0,07	72,15±0,64	1,18±0,01	2,19±0,03	76,06±0,71
14	S14	30,25±0,07	41,23±0,48	3,87±0,83	71,49±0,54	1,36±0,01	1,66±0,02	75,36±1,38
15	S15	28,31±2,63	39,91±1,62	5,66±0,16	68,22±4,26	1,41±0,07	1,78±0,15	73,88±4,42
16	S16	28,26±2,69	39,85±1,69	5,60±0,23	68,11±4,38	1,41±0,08	1,57±0,15	73,71±4,61
17	S17	35,27±0,87	38,77±0,68	4,22±0,02	74,04±1,55	1,09±0,00	1,71±0,04	78,26±1,52
18	S18	34,67±0,35	39,93±0,82	4,19±0,09	74,61±1,17	1,15±0,01	2,08±0,01	78,80±1,26
19	S19	30,81±0,00	37,53±0,07	6,23±0,01	68,35±0,06	1,22±0,00	1,53±0,01	74,58±0,05
20	S20	37,17±0,02	40,78±0,09	3,53±0,02	77,94±0,08	1,09±0,00	2,29±0,00	81,47±0,05
21	S21	31,92±0,61	37,34±1,34	4,93±0,17	69,27±1,95	1,17±0,01	1,75±0,03	74,20±1,78
22	S22	36,99±0,14	35,85±0,01	5,33±0,09	72,84±0,12	0,97±0,00	2,52±0,02	78,18±0,21
23	S23	28,84±0,25	39,15±0,27	5,11±0,01	67,99±0,52	1,35±0,00	1,73±0,00	73,10±0,53
24	S24	27,87±0,06	38,67±0,23	4,64±0,01	66,53±0,29	1,38±0,00	1,58±0,01	71,17±0,28
25	S25	27,87±0,06	38,67±0,23	4,64±0,01	66,53±0,29	1,38±0,01	1,63±0,01	71,17±0,28
26	S26	30,03±0,62	43,13±0,97	6,08±0,00	73,16±0,35	1,43±0,06	1,66±0,02	79,24±0,35
27	S27	30,53±0,48	37,45±0,40	4,09±0,01	67,98±0,88	1,22±0,01	1,90±0,01	72,08±0,90
28	S28	31,16±0,08	37,91±0,12	7,02±0,06	69,07±0,04	1,21±0,01	1,79±0,03	76,09±0,03
29	S29	31,45±0,18	41,27±0,11	5,90±0,16	72,72±0,29	1,31±0,00	1,87±0,01	78,62±0,45
30	S30	35,60±0,01	40,13±0,07	5,12±0,79	75,73±0,08	1,13±0,00	2,27±0,02	80,85±0,88
31	S31	27,16±0,71	47,47±1,21	6,24±0,09	74,63±1,92	1,75±0,00	1,68±0,04	80,87±2,01
32	S32	33,04±0,06	39,78±0,25	5,88±0,02	72,82±0,31	1,20±0,01	2,07±0,04	78,70±0,33
33	S33	30,96±0,04	37,53±0,01	6,62±0,13	68,50±0,04	1,21±0,00	2,01±0,03	75,12±0,17
34	S34	34,50±0,27	36,38±0,06	5,97±0,18	70,89±0,21	1,05±0,01	2,35±0,01	76,86±0,39
35	S35	27,83±0,11	33,88±0,34	6,41±0,10	61,71±0,45	1,21±0,01	1,67±0,02	68,12±0,55
36	S36	30,53±0,03	35,39±0,10	8,22±0,02	65,92±0,07	1,16±0,00	1,71±0,01	74,14±0,05
37	S37	38,01±0,90	34,45±0,12	3,82±0,16	72,47±1,03	0,90±0,02	2,24±0,05	76,29±1,19

Echantillon: Echan. ; Glucose: G; Fructose: F; Maltose: M; Sucrose ou saccharose: S

Couleur

La couleur du miel est le principal critère de qualité, d'acceptation et de préférence pour les différents types de consommateurs. Aussi, c'est un critère utile pour la classification des miels monofloraux (El Sohaimy et coll., 2015 ; Karabagias et Karabournioti, 2018).

L'échelle des couleurs du miel est très large, allant d'une couleur presque blanche à une couleur ambrée presque foncée selon son origine botanique, et par conséquent selon son origine géographique. Il est à noter que les méthodes analytiques de mesure de la couleur du miel se font par des techniques instrumentales précises, considérant une échelle de plusieurs couleurs (Tuberoso et coll., 2014). La technique la plus courante qui a été largement utilisée pour le miel est le comparateur visuel permettant d'appréhender la couleur des miels en les comparant à des plaques de verre teinté qui servent d'étalons (échelle Pfund) (Tuberoso et coll., 2014 ; Escuredo et coll., 2019).

Ces dernières années, des techniques instrumentales utilisant des spectrophotomètres ou des colorimètres ont été étendues avec succès à des miels, ce qui nécessite moins de temps et fournit des résultats facilement comparables (Tuberoso et coll., 2014). Parmi les différents systèmes d'espaces de couleur, le CIELab est actuellement utilisé et recommandé pour les miels (Terrab et coll., 2004b; Wilczyńska, 2014; Tuberoso et coll., 2014 ; Oroian et coll., 2017), car il couvre uniformément tout le spectre visible de l'œil humain (Szabó et coll., 2016). Cette méthode utilise des coordonnées cartésiennes pour calculer les attributs chromatiques dans un espace colorimétrique. L'espace couleur est basé sur une représentation cartésienne séquentielle ou continue à trois axes orthogonaux : L, a* et b* (Wilczyńska, 2014; Tuberoso et coll., 2014 ; Bayram et coll., 2020). L* représente la clarté ($L^* = 0$, noir et $L^* = 100$, incolore), a* composante de couleur vert/rouge ($a^* > 0$, rouge et $a^* < 0$, vert) et b* composante de couleur bleu/jaune ($b^* > 0$, jaune et $b^* < 0$, bleu). Ces coordonnées chromatiques sont également définies par ses grandeurs dérivées : la chromaticité ou chroma (C_{ab}^*) et l'angle de teinte (h_{ab}°) (Carvalho et coll., 2015). En outre, ces grandeurs sont calculées comme suit : $C_{ab}^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ et $h_{ab}^\circ = \arctan (b^*/a^*)$

Les résultats montrent les différences et les similitudes dans la chromaticité des miels étudiés produits dans l'ouest d'Algérie (Tableau 8). Le paramètre de la clarté L* varie de $34,18 \pm 0,20$ à $60,02 \pm 2,47$ avec une moyenne estimée à 44,18. Les valeurs de luminosité les plus faibles, correspondants aux miels ambres foncés, sont observées dans les miels de caroubier, d'eucalyptus et de romarin ($34,18 \pm 0,20$, S10 ; $35,12 \pm 2,71$, S27 et $35,19 \pm 0,14$, S29,

respectivement), tandis que les valeurs de L^* sont plus élevées dans le miel multifloral ($60,02 \pm 2,47$, S13), de harmal ($57,84 \pm 0,45$, S35) et de thym ($57,30 \pm 0,57$, S7).

Plus de différences sont trouvées dans les coordonnées a^* et b^* . Alors que le paramètre de couleur verte ($a^* < 0$) est présent dans le miel de caroubier ($(-0,57) \pm 0,07$, S10), le miel d'oranger ($10,24 \pm 0,05$, S16) présente la valeur la plus élevée du paramètre de couleur rougeâtre ($a^* > 0$) suivi des miels multif floraux et de chardon-Marie ($10,21 \pm 0,05$, S15 ; $8,36 \pm 1,40$, S23 et $7,39 \pm 0,77$, S31, respectivement). Les valeurs du paramètre de couleur rougeâtre ($a^* > 0$) montrent une grande variabilité dans les différents échantillons de miel. Ainsi, les valeurs les plus faibles et légèrement positives ($0,85 \pm 0,23$, S14 ; $1,10 \pm 0,12$, S24 et $1,13 \pm 0,07$, S12 et $1,34 \pm 0,18$, S22) sont relevées dans les miels multif floraux (S14 et S24), de caroubier (S12) et d'euphorbe (S22) (les types de miel les plus clairs et les plus jaunes).

Le paramètre de couleur jaune ($b^* > 0$) a également montré une grande variation avec des valeurs de b^* variant entre $0,78 \pm 0,18$ et $13,90 \pm 0,38$ avec une moyenne de 6,67. Les échantillons les plus jaunâtres sont le miel multifloral ($13,90 \pm 0,38$, S36) et de sauge ($13,84 \pm 2,67$, S34). En outre, les miels ambres foncés présentent des valeurs plus faibles tels que les miels d'euphorbe ($2,32 \pm 0,28$, S22), d'eucalyptus ($3,06 \pm 0,07$, S27), de camphre ($3,11 \pm 0,04$, S26), de moutarde blanche douce ($3,37 \pm 0,01$, S37), de romarin ($3,48 \pm 0,12$, S29) et de chardon-Marie ($3,51 \pm 0,35$, S8). Les valeurs positives de a^* et b^* indiquent un penchant vers les proportions de couleurs rouge et jaune. Cependant, seul le miel de caroubier (S10) montre une légère proportion de couleur verte.

Le chroma (C_{ab}^*) ou la couleur d'une zone représente la quantité de couleur et augmente avec la luminosité ayant le miel le plus clair les valeurs plus élevées de chroma. Les valeurs basses sont indiquées pour le miel ambre foncé et les valeurs les plus élevées sont indiquées pour le miel clair. Dans cette étude, le chroma varie de $0,81 \pm 0,06$ à $14,21 \pm 2,75$, avec une moyenne de 7,48. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour les miels de sauge ($14,21 \pm 2,75$, S34), multifloral ($14,11 \pm 0,38$, S36), de chardon-Marie ($13,59 \pm 0,87$, S18), de harmal ($13,17 \pm 0,34$, S35), d'oranger ($12,56 \pm 0,17$, S16) et de moutarde blanche douce ($11,55 \pm 0,84$, S6). Au contraire, les valeurs les plus basses correspondent aux miels de caroubier ($0,81 \pm 0,06$, S10), d'euphorbe ($2,68 \pm 0,33$, S22) et de camphre ($3,74 \pm 0,08$, S26).

Compte tenu de l'angle de teinte (h_{ab}°) ou de la perception visuelle selon laquelle une zone semble être similaire à l'une des couleurs: rouge, jaune, vert et bleu, ou à une combinaison de paires adjacentes de ces couleurs considérées dans un anneau fermé, il peut être observé comment les échantillons ambres foncés présentent des valeurs de h_{ab}° basses. Les

miels d'oranger (S16) et de harmal (S35) ont des valeurs considérablement plus élevées dans ce paramètre.

Les différences dans les valeurs de couleur révèlent que la région dans laquelle les échantillons de miel sont produits peut être un facteur déterminant pour les propriétés de couleur. Les miels avec une valeur L^* inférieure à 50 sont considérés comme foncés tandis que ceux avec une valeur L^* supérieure à 50 sont considérés comme plus clairs (Tornuk et coll., 2013). D'après cette constatation, 84% des échantillons de miel étudiés sont de couleur foncé ou ambre foncé, à l'exception des miels de thym (S7), de chardon-Marie (S8 et S18), des multifloraux (S13 et S17) et de Harmal (S35). Généralement, il est rapporté que le miel de couleur foncée est plus riche en pigments, en composés phénoliques, en pollen et en minéraux (Can et coll., 2015 ; Bayram et coll., 2020). Par conséquent, les résultats obtenus suggèrent que les miels de l'ouest algérien pourraient avoir ces caractéristiques.

Aussi, il est constaté, au vu des résultats de L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* et h_{ab}° (Tableau 8), une hétérogénéité des miels produits dans les zones subhumides, semiarides et arides, de telle manière que les couleurs dans les mêmes zones diffèrent considérablement. D'autre part selon leur origine florale, les miels sont aussi non homogènes ce qui indique une variation de couleurs même entre ceux de la même origine.

Il est à noter que les résultats trouvés dans cette étude, pour les coordonnées L^* , a^* et b^* , sont comparables à ceux obtenus pour les miels de Tunisie ($25,42 \pm 0,145$ – $63,19 \pm 0,95$; $2,71 \pm 0,14$ – $10,75 \pm 0,12$; $16,29 \pm 0,185$ – $42,97 \pm 0,23$, respectivement) (Boussaid et coll., 2018), du Maroc ($36,47$ – $70,39$; $6,30$ – $19,56$; $5,14$ – $28,71$, resp.) (Moujanni et coll., 2018) et aussi pour les miels d'*Euphorbia resinifera* d'Espagne ($46,2$; $7,7$; $19,9$, resp.) (Hernanz et coll., 2022). D'autre part, ces valeurs restent supérieures à celles trouvées pour les miels de Turquie ($24,56$ – $34,16$; $0,08$ – $0,67$ et $0,60$ - $5,09$, resp.) (Özcan et Ölmez, 2014) et ($20,06$ – $29,73$; $0,85$ – $3,25$; $3,67$ – $7,80$, resp.) (Bayram et coll., 2020).

Les paramètres de couleur, à savoir L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* et h_{ab}° , se sont révélés être une variable importante dans l'analyse des échantillons, comme l'ont montré d'autres auteurs (Tuberoso et coll., 2014). La comparaison des résultats présente des défis importants, puisque les méthodes de mesure des coordonnées et la procédure de mesure ont une influence considérable sur les résultats. Il est par conséquent nécessaire d'unifier ce type de procédures expérimentales, ce qui entraîne des différences significatives dans les valeurs des coordonnées CIELab du miel.

Tableau 8: Résultats de la couleur.

N°	Echan.	L*	a*	b*	C _{ab} *	h _{ab} [°]
1	S1	37,61±0,76	2,87±0,24	5,31±0,18	6,04±0,24	61,63±1,90
2	S2	42,80±2,51	2,81±0,21	4,98±0,21	5,72±0,28	60,59±0,85
3	S3	40,50±0,40	6,79±0,07	5,93±0,05	9,01±0,08	41,15±0,48
4	S4	40,50±1,12	6,79±0,42	5,93±0,31	9,01±0,52	41,15±0,27
5	S5	42,74±1,01	2,17±0,02	7,17±0,81	7,49±0,78	73,01±1,81
6	S6	42,63±0,58	2,23±0,17	11,34±0,83	11,55±0,84	78,85±0,36
7	S7	57,30±0,57	1,91±0,07	4,81±0,06	5,17±0,08	68,33±0,53
8	S8	53,69±2,27	1,90±0,29	3,51±0,35	4,01±0,18	61,36±5,98
9	S9	37,91±0,68	2,89±0,22	4,96±0,30	5,74±0,37	59,79±0,47
10	S10	34,18±0,20	(-0,57)±0,07	(-0,57)±0,04	0,81±0,06	225,09±3,71
11	S11	41,51±3,19	1,84±0,37	4,49±0,49	4,85±0,59	67,85±2,06
12	S12	45,06±1,36	1,13±0,07	5,81±0,24	5,92±0,23	78,93±0,91
13	S13	60,02±2,47	1,99±0,69	7,94±0,74	8,22±0,55	75,65±5,90
14	S14	41,14±4,54	0,85±0,23	0,78±0,18	1,18±0,12	43,16±12,35
15	S15	38,55±0,40	10,21±0,05	7,29±0,37	12,55±0,24	35,50±1,32
16	S16	38,60±0,40	10,24±0,05	7,30±0,36	12,56±0,17	35,45±1,29
17	S17	54,43±6,18	2,84±0,35	6,33±0,16	6,94±0,20	65,87±2,75
18	S18	50,86±0,46	3,02±0,14	13,25±0,86	13,59±0,87	77,17±0,26
19	S19	42,81±1,76	2,97±0,35	7,77±0,83	8,31±0,90	69,10±0,23
20	S20	45,34±0,06	2,37±0,04	9,34±0,13	9,64±0,12	75,73±0,45
21	S21	49,45±2,49	2,32±0,08	5,86±0,44	6,30±0,42	68,31±1,32
22	S22	48,45±1,78	1,34±0,18	2,32±0,28	2,68±0,33	60,04±0,62
23	S23	41,79±2,53	8,36±1,40	7,56±1,07	11,27±1,75	42,24±0,87
24	S24	44,41±2,99	1,10±0,12	5,40±0,40	5,52±0,39	78,41±1,47
25	S25	37,64±1,13	1,86±0,21	5,56±0,35	5,87±0,40	71,51±0,97
26	S26	45,97±2,28	2,07±0,09	3,11±0,04	3,74±0,08	56,39±0,79
27	S27	35,12±2,71	2,35±0,36	3,06±0,07	3,86±0,25	52,71±4,00
28	S28	41,65±1,10	2,10±0,16	4,53±0,27	4,99±0,31	65,10±0,40
29	S29	35,19±0,14	2,09±0,04	3,48±0,12	4,06±0,13	59,05±0,44
30	S30	40,14±0,17	2,01±0,37	6,86±0,12	7,15±0,22	73,68±2,52
31	S31	37,77±1,70	7,39±0,77	7,80±0,95	10,74±1,22	46,52±0,70
32	S32	48,36±3,28	2,30±0,16	7,28±0,81	7,64±0,81	72,40±1,18
33	S33	43,10±0,34	2,74±0,07	8,90±0,32	9,32±0,32	72,88±0,30
34	S34	49,77±2,60	3,21±0,67	13,84±2,67	14,21±2,75	76,98±0,25
35	S35	57,84±0,45	1,67±0,11	13,06±0,34	13,17±0,34	82,73±0,38
36	S36	43,60±0,80	2,41±0,07	13,90±0,38	14,11±0,38	80,18±0,02
37	S37	46,23±0,35	1,73±0,08	3,37±0,01	3,79±0,04	62,89±0,98

L: la clarté (L = 0, noir et L = 100, incolore) ; a*: composante de couleur vert/rouge (a* > 0, rouge et a* < 0, vert), b*: composante de couleur bleu/jaune (b* > 0, jaune et b* < 0, bleu); C_{ab}*: chroma et h_{ab}[°]: angle de teinte.

II-3-Conclusion

Du point de vue commercial, la caractérisation physico-chimique des miels étudiés (14 multifloraux et 23 unifloraux) peut augmenter considérablement leur valeur commerciale. Certains paramètres (humidité, pH, acidité et HMF), fortement associés à la qualité du miel, sont conformes aux normes internationales. Les valeurs trouvées pour la conductivité électrique et les minéraux sont, en majorité, caractéristiques de la couleur foncé ou ambre foncé. En ce qui concerne les teneurs en minéraux, il convient de souligner qu'elles étaient suffisantes pour déterminer l'origine florale, et leurs variabilités peuvent être liées à des différences géochimiques et géographiques. En revanche, tous les éléments détectés étaient à des niveaux inférieurs aux seuils de sécurité. Les paramètres de couleur ont montré des valeurs typiques des miels ambrés, à la fois en termes de luminosité (L^* ; intervalle : $34,18 \pm 0,20$ - $60,02 \pm 2,47$ unités) et de chroma ou saturation (C_{ab}^* ; intervalle : $0,81 \pm 0,06$ - $14,21 \pm 2,75$ unités). Par ailleurs il a été constaté que les résultats obtenus étaient similaires à d'autres études, par conséquent les miels algériens se sont révélés être d'une valeur compétitive à l'échelle internationale.

***Chapitre III: Valorisation des Miels
par Évaluation de leurs Propriétés
Biochimiques***

Chapitre III: Valorisation des miels de l'ouest algérien: Propriétés biologiques

III-1-Introduction

Le miel naturel est un nutriment chimique complexe ; composé principalement de saccharides (environ 80 %) et d'eau (Sindi et coll., 2019). De plus, les miels renferment divers constituants extrêmement complexes et relativement mineurs, notamment des saccharides complexes, des minéraux, des antioxydants, des composés phénoliques, des vitamines, des protéines, des enzymes et certaines molécules non identifiées (Owayss et coll., 2020). Ces composés déterminent la variabilité et les activités biologiques du miel (Anand et coll., 2019).

Les propriétés thérapeutiques du miel sont bien connues et sont introduites en milieu médical pour prévenir et limiter les infections bactériennes (Laallam et coll., 2015), guérir les plaies et les brûlures (Samarghandian et coll., 2017), soulager l'inflammation et présenter des effets antioxydants, en plus de sa valeur alimentaire (Anand et coll., 2019).

Les travaux récents portant sur les propriétés thérapeutiques du miel se concentrent sur les potentiels antioxydants, antimicrobiens et antidiabétiques. Généralement, ces activités sont liées et s'influencent les unes les autres, et de leur combinaison résulte des propriétés intéressantes du miel (Dzugan et coll., 2018). Le pouvoir antioxydant est attribué à la présence de flavonoïdes, d'acides phénoliques, d'enzymes (peroxydase et catalase), d'oligo-éléments et de vitamines (C et E).

Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont généralement disséminés dans les plantes et classés comme métabolites secondaires. Ils sont dérivés de trois voies : shikimate, pentose phosphate et phénylpropanoïde (Anand et coll., 2019). De plus, il faut souligner leurs activités bactéricides, anti-allergènes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et anticoagulantes en plus de l'effet antioxydant (Cornara et coll., 2017). Outre le pouvoir antioxydant, l'effet antimicrobien du miel provient de plusieurs facteurs clés tels que la faible activité de l'eau, la teneur élevée en sucre, le peroxyde d'hydrogène, les composés polyphénoliques, les protéines dérivées de l'abeille, la défensine-1 de l'abeille et le méthylglyoxal (MGO) (Nolan et coll., 2019).

L'activité antimicrobienne du miel est largement étudiée, *in vitro*, contre un spectre de microorganismes comprenant; bactéries, levures et champignons à Gram positif et négatif (Owayss et coll., 2020). Il est à noter qu'aucun des microorganismes n'a développé de mécanismes de résistance contre le miel (Maddocks et Jenkins, 2013 ; Nolan et coll., 2019).

Les potentiels antioxydants et antimicrobiens varient considérablement et dépendent des constituants clés cités précédemment et/ou de la présence de chaque constituant. Un grand nombre de ces constituants sont directement liés à la source florale, aux conditions climatiques, à la situation géographique et à la santé des abeilles (Nolan et coll., 2019) ainsi qu'aux conditions de stockage, au traitement et au moment de la récolte (Al-Waili et coll., 2011).

De nombreuses études ont décrit les effets antioxydants et antimicrobiens du miel (Pérez Martín et coll., 2008 ; Bouhlali et coll., 2016 ; Combarros-Fuertes et coll., 2019). Malheureusement, aucun n'a étudié simultanément les potentiels des miels algériens et les données sont très limitées et axées uniquement sur le profil pollinique et la qualité physicochimique (Ouchemoukh et coll., 2007 ; Nair et Maghraoui, 2017 ; Bereksi-Reguig et coll., 2020 ; Homrani et coll., 2020) ou l'origine botanique (Zerrouk et coll., 2017).

L'apiculture est pratiquée de manière intensive dans le nord de l'Algérie où la biodiversité floristique est importante et donne des ressources pour la production de miel. La superficie mellifère est de 797 122 hectares avec environ 3150 espèces (Homrani et coll., 2020). De plus, le climat est assez favorable ; caractérisé par un été chaud avec une période sèche tandis que l'hiver est doux et les précipitations sont estimées à 400 et 1000 mm (Makhloufi et coll., 2015). En Algérie, la principale source de miel provient de *Citrus* spp., *Eucalyptus* spp., *Rosmarinus officinalis* L., *Helianthus annuus* L. et la moutarde sauvage (Homrani et coll., 2020). Néanmoins, des types de miel inhabituels et moins connus sont produits tels que les miels *Ziziphus* et *Euphobia* (Haderbache et coll., 2013) et le miel *Erica* (Ouchemoukh et coll., 2017).

Sur la base de ces faits, les objectifs de ce travail sont donc multiples :

- i) estimer la teneur en composés bioactifs de 37 miels algériens collectés dans la région ouest d'Algérie,
- ii) évaluer leur activité antioxydante,
- iii) évaluer leur pouvoir antimicrobien par rapport à des souches de référence et établir la relation entre l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de miel et la teneur en composés bioactifs,
- iv) et enfin, évaluer l'activité antidiabétique *in vivo* du miel S4 (cf. Tableau 1).

L'objectif global est de sélectionner un miel algérien qui démontre les meilleures propriétés biologiques.

III-2-Activité antioxydante

III-2-A-Stress oxydatif

L'antioxydant joue un rôle indispensable dans la neutralisation des radicaux libres dans l'organisme et la protection contre la dégradation oxydative. Le manque d'antioxydants dans le corps humain conduit au stress oxydatif (Trifunski et coll., 2015).

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre des systèmes producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des systèmes antioxydants, enzymatiques (super-oxyde dismutases [SOD], glutathion peroxydases [GPx], etc.) ou non (glutathion, vitamines, etc.). Par sa nature même, le stress oxydant reste un phénomène physiopathologique difficile à appréhender (Zbadi et coll., 2018).

Les mauvaises habitudes alimentaires, et styles de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), augmentent anormalement la production des espèces oxygénées activées dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaire, et les maladies inflammatoires car les ERO sont des acteurs essentiels dans la défense non liée aux anticorps (Haleng et coll., 2007 ; Baudin, 2021).

On distingue deux types de radicaux libres :

- ✓ Les radicaux primaires : espèces radicalaires (avec un électron impair) tels que le radical hydroxyle (OH^\bullet), le radical alkoxy (RO^\bullet), le radical peroxyde (ROO^\bullet) et le radical monoxyde d'azote (NO^\bullet).
- ✓ Les espèces non radicalaires (secondaires) : tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et le nitroperoxyde (ONOOH). Ces composés se forment par réaction des radicaux primaires sur les espèces chimiques.

Le moyen le plus efficace pour lutter contre ces maladies, c'est la consommation des aliments naturels antioxydants.

III-2-B-Propriétés des antioxydants

Les antioxydants ont un rôle important dans la conservation des aliments et la santé humaine, par stabilisation des agents d'oxydation (Gorjanović et coll., 2013). Généralement les antioxydants sont apportés par l'alimentation (polyphénols, vitamines, oligoéléments), mais on trouve aussi des antioxydants endogènes tels que les enzymes et les protéines et des antioxydants de petite taille (glutathion, acide urique).

- Antioxydants d'origine alimentaire

Les polyphénols : Ils représentent un groupe essentiel des métabolites secondaires. Aussi, ils constituent une large gamme de composés phytochimiques bioactifs et sont classés en

molécules flavonoïdes (flavonols, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et anthocyanes) et non flavonoïdes (acides phénoliques, acides hydroxycinnamiques, lignanes, stilbènes et tanins) (Di Lorenzo et coll., 2021). Plus de 8000 molécules phénoliques ont été identifiées, et contiennent au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes -OH (Stockley et coll., 2012). Des études animales, humaines et épidémiologiques prouvent que différents polyphénols provenant des fruit, des légumes, du thé et du café ont des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires qui peuvent avoir des effets préventifs et/ou thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer et l'obésité (Cory et coll., 2018).

La vitamine E : Evans et Bishop ont découvert la vitamine E en 1922. Grâce à des recherches minutieuses, ils ont découverts la capacité de la vitamine E à piéger les ERO dans les membranes cellulaires ainsi, la vitamine E a été définie comme un puissant antioxydant liposoluble. Elle représente un mélange de tocophérols et de tocotriénols, et est présente dans plusieurs aliments, allant des céréales (orge, avoine, seigle, etc.) et les huiles végétales (maïs, blé, huile de tournesol, huile de noisette, etc.), des graines (surtout des amandes, arachides et tournesol), des œufs et quelques fruits et légumes (Mohd Mutalip et coll., 2018 ; Manosso et coll., 2022).

La vitamine C : C'est un nutriment hydrophile important qui est utilisé comme antioxydant et additif dans de divers produits pharmaceutiques et alimentaires. C'est une espèce réactive dérivée de l'oxygène, et un piègeur et désactivateur de radicaux libres (Parhizkar et coll., 2018).

Les oligoéléments : Ils sont présents en très petite quantité dans l'organisme, mais pour la plupart des cofacteurs enzymatiques. Ils sont considérés comme des éléments essentiels car ils ne sont pas fabriqués par l'organisme vivant. A titre d'exemple, la littérature mentionne le cuivre (Cu), un cofacteur enzymatique pour plusieurs enzymes dont des oxydases, le zinc (Zn) pour son rôle est dans la régulation transcriptionnelle et son action dans le contrôle de la synthèse de nombreuses protéines dirigeant en particulier la production d'hormones et l'immunité, et le sélénium (Sn), par son rôle de cofacteur des glutathion peroxydases et thiorédoxine réductases et aussi sa participation à la prévention de l'altération causée sur l'ADN par les radicaux libres (Baudin, 2021).

Les caroténoïdes : Se sont des pigments tétraterpéniques qui présentent des couleurs jaune, orange, rouge et violet. Ils sont partagés dans les bactéries photosynthétiques, certaines espèces d'archées et de champignons, les algues, les plantes et les animaux (Maoka, 2019). Les caroténoïdes sont bénéfiques pour la santé humaine. Ils ont principalement des effets antioxydants, mais ils peuvent opérer individuellement par d'autres mécanismes ; par exemple, le

β-carotène à une fonction de pro-vitamine A, tandis que la lutéine/zéaxanthine constitue un pigment maculaire dans l'œil (Eggersdorfer et Wyss, 2018).

- Antioxydants endogènes enzymatiques

Les superoxydes dismutases (SOD) : Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, éliminent l'anion super-oxyde $O_2^{\cdot-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Haleng et coll., 2007).

Les glutathions peroxydases (GPxs) : La GPx est une sélénoprotéine, son rôle consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Arthur, 2002).

Catalase : C'est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Elle se trouve dans les peroxysomes des cellules eucaryotes (Arthur, 2002).

- Antioxydants endogènes non enzymatiques

Glutathion, protéines-thiols : Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). C'est le thiol majoritaire au niveau intracellulaire. Il est présent sous forme réduite, et est cofacteur de la GPx. Aussi, il joue le rôle de chélateur des métaux de transition et régénérateur final des vitamines E et C (Haleng et coll., 2007).

III-2-C-Pouvoir antioxydant du miel

Le miel est utilisé comme source naturelle d'antioxydants qui sont efficaces pour la réduction des risques de maladies cardiovasculaires, des cancers, de l'Alzheimer et des maladies inflammatoires. Le rôle bienfaisant du miel est attribué à ses composés antioxydants comme les acides aminés, les protéines, les enzymes, les caroténoïdes, les acides organiques, et les polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques (Ávila et coll., 2019). De plus, le miel contient une quantité abondante de piègeurs de radicaux, capables de réduire le déséquilibre entre la production de radicaux libres et le taux d'antioxydants (Kishore et coll., 2011).

Parmi les composés phénoliques biomarqueurs, les antioxydants essentiels dans le miel ont été très bien examinés. Plus de 150 composés phénoliques du miel ont été identifiés, y compris les acides phénoliques et les flavonoïdes (Dzugan et coll., 2018). Ces composés sont insensibles aux effets de la température élevée (Elbanna et coll., 2014). D'autre part, plus la couleur du miel est foncée plus la teneur en polyphénols est importante, ce qui est à l'origine d'une activité antioxydante élevée (Dzugan et coll., 2018).

III-2-D-Méthodes pour déterminer l'activité antioxydante

Afin de déterminer le potentiel antioxydant du miel, de nombreuses méthodes analytiques ont été développées (Dzugan et coll., 2018) :

Test DPPH : Le test DPPH n'est pas affecté par certaines réactions secondaires telles que la chélation des ions métalliques et l'inhibition enzymatique. Ce test est considéré comme l'un des premiers radicaux libres utilisés pour évaluer la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams et coll., 1995). Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH[•] (Hartmann, 2007).

Test FRAP : Le pouvoir réducteur est caractérisé par la capacité d'un antioxydant à transférer un électron ou à libérer un atome d'hydrogène. Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de Fe⁺³ (fer ferrique) en Fe²⁺ (fer ferreux) par les antioxydants contenus dans l'échantillon (Tuksitha et coll., 2018). La réduction peut être estimée en mesurant l'intensité de la couleur verdâtre dans le milieu (Mouhoubi et coll., 2016).

Test de l'inhibition du radical ABTS^{•+} : L'activité antioxydante d'une molécule dépend de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS [sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] par rapport à un antioxydant de référence : le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Munteanu et Apetrei, 2021).

Test de blanchiment β -carotène : C'est une technique spectrophotométrique développée par Marco puis modifiée par Miller. Elle consiste à mesurer à 470 nm la décoloration du β -carotène. Cette décoloration est due à l'oxydation du β -carotène par les produits de dégradation de l'acide linoléique (Miller, 1971). La présence d'un antioxydant pourra retarder la cinétique de blanchissement du β -carotène. La méthode est très sensible, simple et relativement rapide (2 heures environ) mais l'interprétation des résultats n'est pas facile car le β -carotène est lui-même un antioxydant sensible à l'oxygène (Laguerre et coll., 2007).

Test ORAC : Il mesure la capacité de fractionnement de la réaction radicalaire en chaîne par les antioxydants en surveillant l'inhibition de l'oxydation du radical peroxy (ROO[•]).

III-2-E-Résultats et discussion

L'ouest algérien est caractérisé par des conditions climatiques hétérogènes qui ont engendré une biodiversité riche en flore endémique. Sous ces facteurs, l'abeille produit de nombreux types de miel avec divers avantages pour la santé. Des études antérieures publiées ont rapporté l'efficacité des miels algériens en tant qu'agents antioxydants ou antimicrobiens (Khalil et coll., 2012 ; Laallam et coll., 2015). Cependant, ces dernières n'ont pas évalué la relation étroite entre ces deux propriétés et les compositions en composés bioactifs.

1-Quantification des composés bioactifs

a) Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés bioactifs dans les miels varie considérablement et dépend de la source botanique et des régions géographiques, comme le montre les résultats regroupés dans le tableau 9. La teneur en composés polyphénoliques (TCP) varie entre $24,17 \pm 1,38$ et $122,15 \pm 3,55$ mg EAG/100 g de miel.

Conformément à nos résultats, des teneurs en TCP similaires sont précédemment obtenues pour des échantillons de miel du Kosovo ($49,39 \pm 45,88$ - $100,95 \pm 4,51$ mg EAG/100 g) (Ibrahimi et Hajdari., 2020) et de Tunisie ($32,17 \pm 0,09$ - $119,42 \pm 0,25$ mg EAG/100g) (Boussaid et coll., 2018). Cependant, ces teneurs sont inférieures à celles rapportées pour les miels du Maroc ($75,52 \pm 7,45$ - $245,22 \pm 11,40$ mg EAG/100g) (El-haskoury et coll., 2018) et de Pologne ($181,0 \pm 5,0$ - $355,0 \pm 30,0$ mg EAG/100g) (Dzugan et coll., 2020). Cette variation est due à l'origine botanique, à l'année de récolte et à l'environnement de la ruche (Mouhoubi-Tafnine et coll., 2016).

Le miel de caroubier de la région de Beni Ghazli (Tlemcen) montre les valeurs les plus élevées ($122,15 \pm 3,55$ mg EAG/100 g, S12) de la teneur phénolique des miels étudiés, tandis que le miel de lavande contient la concentration la plus faible ($24,17 \pm 1,38$ mg EAG/100 g, S1). Des valeurs élevées sont également présentes dans les miels multif floraux ($82,49 \pm 2,06$ mg EAG/100 g, S4), de moutarde blanche douce ($71,18 \pm 5,65$ mg EAG/100 g, S6) et de chardon-Marie ($67,22 \pm 4,44$ mg EAG/100 g, S23). Il est à souligner qu'une différence significative élevée ($p < 0,001$) entre tous les miels étudiés est trouvée. Ces valeurs sont bien supérieures aux échantillons de miel d'acacia et de châtaignier du Kosovo ($25,76 \pm 10,16$ et $35,77 \pm 8,26$ mg EAG/100g, respectivement) (Ibrahimi et Hajdari, 2020).

b) Dosage des flavonoïdes totaux

Les valeurs de la teneur totale en flavonoïdes (TTF) dans les échantillons de miels varient entre $0,07 \pm 0,01$ et $33,49 \pm 4,90$ mg EQ/100 g de miel (Tableau 9). Les teneurs les plus élevées en flavonoïdes sont trouvées dans le miel de caroubier ($33,49 \pm 4,90$ mg EQ/100g, S12), suivi des miels multif floraux ($26,49 \pm 3,04$, S4 ; $19,15 \pm 2,51$ mg EQ/100g, S15) et de la moutarde blanche douce ($17,26 \pm 2,38$ mg EQ/100g, S6) alors que les valeurs les plus faibles sont enregistrées pour les miels de lavande ($0,07 \pm 0,01$ mg EQ/100g, S1), de thym ($1,63 \pm 0,83$ mg EQ/100g, S7) et d'oranger ($1,79 \pm 0,27$ mg EQ/100g, S28).

Tableau 9: Valeurs TCP, TTF, DPPH, ABTS, β -Carotène et FRAP des échantillons de miel analysés.

N°	TCP* (mg EAG/100g)	TTF* (mg EQ/100g)	DPPH* CI ₅₀ (mg/mL)	Test ABTS* CI ₅₀ (mg/mL)	β -Carotène* CI ₅₀ (mg/mL)	Valeur FRAP* (mg EAA/100g)
S1	24,17±1,38	0,07±0,01	33,05±0,61	64,86±2,94	56,50±0,96	6,69±0,22
S2	39,14±2,81	6,11±0,72	26,05±0,79	33,47±0,49	38,70±0,48	14,07±0,44
S3	57,64±1,20	2,47±0,45	28,09±1,67	39,86±1,49	25,23±0,16	16,08±0,17
S4	82,49±2,06	26,49±3,04	32,85±1,54	31,93±2,58	34,67±0,20	18,49±0,37
S5	42,91±0,71	9,35±1,65	61,60±1,23	71,58±7,79	69,10±6,28	16,72±0,53
S6	71,18±5,65	17,26±2,38	22,44±0,54	17,97±0,72	36,37±0,40	15,94±1,06
S7	57,45±3,18	1,63±0,83	49,17±4,42	49,54±2,03	56,47±1,26	26,06±0,70
S8	54,82±4,43	4,85±0,57	29,22±2,06	34,59±0,61	42,91±0,20	17,99±0,92
S9	40,19±5,47	9,08±0,75	60,39±1,96	48,27±1,25	68,86±0,68	18,00±0,62
S10	77,77±3,64	19,10±1,41	34,66±0,38	24,17±0,80	37,50±0,31	29,01±1,18
S11	44,25±4,02	5,76±0,80	35,23±1,24	36,14±0,20	47,65±0,16	18,05±0,44
S12	122,15±3,55	33,49±4,90	27,25±0,81	27,12±0,70	31,92±0,41	34,40±0,61
S13	52,23±0,98	13,37±2,27	17,73±1,53	57,39±2,52	32,38±0,16	39,79±0,86
S14	56,55±2,62	9,54±1,21	27,14±0,44	37,82±0,40	34,04±0,14	34,59±1,26
S15	57,23±2,75	19,15±2,51	22,91±0,91	24,51±0,57	29,20±0,13	13,78±0,27
S16	38,25±1,64	2,40±0,35	59,29±3,52	35,92±0,81	55,07±0,79	14,53±0,18
S17	48,90±2,95	2,22±0,50	44,14±0,76	48,90±1,22	38,17±0,29	14,47±0,26
S18	67,22±4,44	4,79±0,73	29,11±2,37	49,20±1,69	32,84±0,13	34,65±0,50
S19	39,62±1,06	5,04±0,11	25,94±0,41	37,75±0,57	37,66±0,12	31,90±2,32
S20	32,87±2,83	5,53±0,76	37,93±2,69	28,40±0,12	27,24±0,55	35,06±0,65
S21	61,57±3,48	7,11±0,94	38,58±0,86	33,28±0,79	44,88±0,70	39,27±0,75
S22	55,04±1,49	8,57±1,33	98,58±6,29	39,15±0,61	91,80±1,69	14,57±0,58
S23	48,69±1,86	13,37±0,78	50,36±1,01	36,75±1,22	50,43±0,31	26,32±1,04
S24	33,50±2,29	4,40±1,22	40,47±0,13	33,30±0,82	40,06±0,06	17,36±1,13
S25	43,34±2,31	9,40±1,25	49,36±0,68	41,21±0,68	42,43±0,25	29,23±0,99
S26	28,37±0,60	6,57±0,39	40,76±1,78	45,94±0,83	45,77±0,66	40,74±0,48
S27	46,53±2,73	10,84±1,55	43,62±1,25	32,29±0,24	47,44±0,77	42,36±1,14
S28	41,95±0,96	1,79±0,27	47,34±1,26	58,69±0,77	59,76±1,07	18,81±0,79
S29	36,52±1,12	2,94±0,61	47,45±0,63	49,37±0,42	49,28±0,79	36,89±0,61
S30	36,37±1,10	13,37±1,90	25,88±1,80	52,60±2,58	41,58±0,48	14,30±0,20
S31	48,47±3,13	13,34±1,91	45,13±0,62	24,02±0,50	46,41±0,56	16,58±0,41
S32	40,27±2,58	12,65±1,80	54,80±0,77	34,28±0,38	43,53±3,78	15,28±0,53
S33	42,22±1,73	7,33±0,91	33,75±2,59	30,07±0,22	36,96±4,15	11,08±0,84
S34	42,09±1,81	11,27±1,21	49,27±0,23	100,62±9,13	69,34±0,80	13,10±0,42
S35	36,43±1,16	9,64±0,66	46,51±2,20	29,23±0,29	33,64±0,54	11,02±0,58
S36	32,23±1,66	3,35±0,91	67,49±0,68	73,33±1,71	41,11±1,03	22,44±0,88
S37	49,85±3,12	4,01±0,42	58,53±1,64	118,12±10,22	85,22±0,65	12,45±0,35
Standard			Acide ascorbique	Trolox	BHT	
			CI ₅₀ (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	CI ₅₀ (mg/mL)	
	-	-	0,014±0,001	0,018±0,001	0,026±0,006	-

Chaque valeur est la moyenne±écart-type (n = 3). TCP : teneur en composés phénoliques déterminée par la méthode Folin-Ciocalteu ; TTF : teneur total en flavonoïdes déterminée par coloration AlCl₃ ; pH; CE : conductivité électrique ; DPPH : radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ; ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ; Inhibition du blanchiment du β -carotène ; FRAP : pouvoir ferrique réducteur/antioxydant. CI₅₀ : concentration provoquant 50 % d'inhibition.* : indique une différence significative élevée (p < 0,001). La TCP est exprimée en mg d'équivalent acide gallique/100 g d'échantillon de miel. Le TTF est exprimée en mg d'équivalent quercétine/100 g d'échantillon de miel. CE est affichée en millisiemens/centimètre. Pour DPPH, ABTS et β -carotène : les valeurs sont exprimées en mg/mL. FRAP : les valeurs sont exprimées en mg d'équivalent acide ascorbique/100g d'échantillon de miel.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux enregistrés dans les études antérieures pour les miels tunisiens ($9,58 \pm 0,03$ - $22,45 \pm 0,10$ mg EQ/100g) (Boussaid et coll., 2018), italiens ($5,09 \pm 2,51$ - $14,05 \pm 8,03$ mg EQ/100g) (Perna et coll., 2012) et polonais ($8,00 \pm 0,10$ - $20,00 \pm 0,20$ mg EQ/100g) (Dzuga et coll., 2020). De plus, les TTF observées sont supérieures à celles mesurées dans les miels du Kosovo ($1,11 \pm 0,62$ - $7,51 \pm 3,75$ mg EQ/100g) (Ibrahimi et Hajdari, 2020), et nettement inférieures à celles des miels du Maroc ($4,26 \pm 1,63$ - $139,62 \pm 1,63$ mg EQ/100g) (Aazza et coll., 2014).

Il convient de souligner que les flavonoïdes représentent plus de 50 % du total des composés phénoliques naturels qui peuvent être transférés avec d'autres dérivés polyphénoliques bioactifs des plantes mellifères au miel lors de la collecte du nectar par les abeilles (Silva et coll., 2016 ; Galhardo et coll., 2020). De plus, les taux de ces composés sont associés à la variation de la couleur du miel (Ferreira et coll., 2009). En effet, une diminution significative de $33,49 \pm 4,90$ mg EQ/100g (S12), $17,26 \pm 2,38$ mg EQ/100g (S6) et $1,79 \pm 0,27$ mg EQ/100g (S28) est notée pour les miels ambres foncés à presque incolores. Les résultats démontrent que les échantillons de miels sont assez riches en composés phénoliques bioactifs et représentent donc une source intéressante d'antioxydants alimentaires.

2-Mesure de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des miels de l'ouest algérien est mesurée par quatre tests différents : dosages DPPH, ABTS, β -carotène et FRAP. Dans l'ensemble, les résultats montrent que les miels présentent une activité antioxydante variable sur une large gamme (Tableau 9).

a) Méthode de piégeage du radical libre DPPH

Pour la plupart des miels étudiés, les valeurs d'activité de piégeage des radicaux libres DPPH varient entre $17,73 \pm 1,53$ et $98,58 \pm 6,29$ mg/mL (Tableau 9). L'activité la plus élevée (valeurs CI_{50} basses) est observée pour les miels multif floraux ($17,73 \pm 1,53$, S13 ; $22,91 \pm 0,91$ mg/mL, S15, respectivement) et de moutarde blanche douce ($22,44 \pm 0,54$ mg/mL, S6), tandis que le miel d'euphorbe ($98,58 \pm 6,29$ mg/mL, S22) présente l'activité la plus faible.

Les résultats de la présente étude sont similaires à ceux rapportés par Boussaid et coll., (2018) pour les miels d'oranger, de thym, d'eucalyptus, de romarin, de marrube et de menthe de Tunisie ($11,08 \pm 0,32$ - $93,26 \pm 0,37$ mg/mL) et par Gül et coll., (2018) pour les miels monofloraux de Turquie ($12,01 \pm 0,35$ - $65,52 \pm 0,88$ mg/mL), cependant les valeurs obtenues sont inférieures à celles des miels monofloraux du Portugal ($84,98 \pm 1,19$ - $168,94 \pm 19,20$ mg/mL) (Ferreira et coll., 2009).

En outre, des corrélations élevées sont observées entre l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH et le TCP et le TTF. Dans l'étude actuelle, le miel de moutarde blanche doux (S6), qui contient des concentrations élevées de TCP ($71,18 \pm 5,65$ mg EAG/100 g) et de TTF ($17,26 \pm 2,38$ mg EQ/100 g), montre la valeur CI_{50} la plus basse, donc l'activité antioxydante la plus élevée. De plus, nous avons remarqué que les valeurs de DPPH et des composés phénoliques totaux sont plus faibles dans les miels de couleur claire ; tels que les miels de romarin (S2, S29), de thym (S7) et d'oranger (S16, S28) par rapport aux miels de couleur foncée tels que les miels de caroubier (S12) et multif floraux (S13, S19 et S20) qui présentent également des valeurs moyennes élevées de la conductivité électrique ($CE > 0,70$ mS/cm) (Tableau 2). Globalement, les résultats obtenus sont en parfait accord avec ceux rapportés dans diverses autres études (Ferreira et coll., 2009 ; Gül et coll., 2018 ; Boussaid et coll., 2018).

b) Test de l'ABTS

Les résultats pour le test ABTS varient entre $17,97 \pm 0,72$ et $118,12 \pm 10,22$ mg/mL (Tableau 9). Les valeurs les plus élevées d'activité de piégeage des radicaux sont mesurées pour les miels de moutarde blanche douce et de sauge ($118,12 \pm 10,22$, S37 ; $100,62 \pm 9,13$ mg/mL, S34, respectivement), et les plus faibles pour les miels de caroubier ($24,17 \pm 0,80$, S10 ; $27,12 \pm 0,70$ mg/mL, S12) et multif floraux ($24,51 \pm 0,57$ mg/mL, S15). Les valeurs obtenues sont assez similaires à celles rapportées par Silva et coll. (2013) pour les miels brésiliens ($21,2 \pm 0,3$ - $53,1 \pm 0,8$ mg/mL) et restent cependant supérieures à celles des miels palestiniens ($3,26 \pm 0,20$ - $16,28 \pm 0,25$ mg/mL) (Imtara et coll., 2018) et marocains ($4,63 \pm 0,62$ - $31,00 \pm 0,62$ mg/mL) (Aazza et coll., 2014).

Dans l'ensemble, les échantillons de miel qui montrent une activité de piégeage ABTS⁺ intéressante, sont également plus efficaces dans le dosage DPPH. En effet, la corrélation entre ce couple de variables est confirmée.

c) Test de blanchiment β -carotène

L'activité antioxydante des miels varie entre $25,23 \pm 0,16$ et $91,80 \pm 1,69$ mg/mL, selon le test de blanchiment au β -carotène, ce qui est approximativement similaire à l'activité trouvée par le test DPPH. La valeur la plus faible, correspondant à l'activité antioxydante la plus élevée, est observée dans les échantillons de miel multif floraux ($25,23 \pm 0,16$, S3 ; $27,24 \pm 0,55$, S20 ; $29,20 \pm 0,13$ mg/mL, S15), tandis que les valeurs les plus élevées sont obtenues pour les miels d'euphorbe ($91,80 \pm 1,69$ mg/mL, S22) et de moutarde blanche douce ($85,22 \pm 0,68$ mg/mL, S37). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Ferrera et coll. (2012) pour les miels collectés dans le nord-est du Portugal ($12,01 \pm 0,96$ - $75,51 \pm 0,04$ mg/mL) et par Bouhlali et coll. (2016) pour les miels monof floraux marocains ($24,37 \pm 0,28$ - $79,08 \pm 0,62$ mg/mL).

d) Test de FRAP

Les résultats montrent que l'activité antioxydante déterminée par le test FRAP varie entre $6,69 \pm 0,22$ et $42,36 \pm 1,14$ mg EAA/100 g selon les types de miel (Tableau 9).

Les résultats du FRAP montrent une différence dans la réduction des antioxydants des différents échantillons de miel, ce qui suggère qu'ils ont des puissances antioxydantes différentes. Le miel d'eucalyptus de Mostaganem (S27) révèle la valeur d'activité antioxydante la plus élevée de tous les miels analysés, ce qui indique sa grande réduction et son puissant potentiel antioxydant. D'autre part, la valeur la plus faible est enregistrée dans le miel de lavande de Sidi Djillali (S1).

Les différences observées entre les miels peuvent s'expliquer, en partie, par les quantités relatives de composés mineurs, qui peuvent jouer un rôle important dans l'effet antioxydant. Selon Mayer et coll. (1998), l'activité antioxydante dépend principalement de la source florale du miel. Cependant, ce n'est pas le seul facteur qui contribue à ses propriétés antioxydantes. En fait, les différences d'activité antioxydante peuvent être attribuées à la présence de différents composés polyphénoliques ; tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et d'autres composés phénoliques qui ont des effets antioxydants différents.

Généralement, une activité antioxydante élevée est trouvée dans les échantillons de miel foncés. Les variations des activités antioxydantes du miel sont dues à la nature quantitative et qualitative de leur contenu polyphénolique (Beretta et coll., 2005). De plus, Taormina et coll. (2001) ont rapporté que les composés antioxydants phénoliques sont liés à l'activité antibactérienne du miel. L'investigation de l'étude actuelle a suscité la question de la puissance antimicrobienne des miels algériens et de sa relation avec la teneur en composés bioactifs.

3) Analyse statistique

À l'aide de l'analyse de Pearson, la corrélation est étudiée entre la teneur en composés bioactifs, les activités antioxydantes et les paramètres physicochimiques (pH et conductivité électrique) de tous les échantillons de miels. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 10.

Des corrélations positives élevées sont observées entre TCP/TTF (0,734), β -carotène/DPPH (0,766), β -carotène/ABTS (0,600) et entre DPPH/ABTS (0,330). En revanche, il existe une corrélation négative entre les composés bioactifs et l'activité antioxydante, à l'exception de la méthode FRAP, ce qui suggère que la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes pourrait ne pas être les seuls facteurs influençant la bioactivité du miel.

D'autre part, des corrélations significatives sont obtenues entre CE/FRAP (0,532) et pH/DPPH (0,328). Tandis que des corrélations statistiques négatives sont observées entre CE/DPPH (-0,415) et CE/ β -carotène (-0,392).

Tableau 10: Matrice de corrélation des paramètres étudiés (coefficients de corrélation de Pearson).

	TCP	TTF	pH	CE	DPPH	ABTS	β -Carotène	Valeur FRAP
TCP	1							
TTF	0,734**	1						
pH	-0,046	0,093	1					
CE	0,152	0,179	0,034	1				
DPPH	-0,269	-0,260	0,328*	-0,415*	1			
ABTS	-0,286	-0,344*	0,141	-0,214	0,330*	1		
β -Carotène	-0,229	-0,262	0,165	-0,392*	0,766**	0,600**	1	
Valeur FRAP	0,229	0,163	-0,062	0,532**	-0,218	-0,207	-0,321	1

Corrélation de Pearson entre la teneur en composés phénoliques (TCP), la teneur total en flavonoïdes (TTF), le pH, la conductivité électrique (CE) et les activités antioxydantes avec DPPH, ABTS, inhibition du blanchiment du β -carotène et pouvoir réducteur/antioxydant ferrique (FRAP).

* : La corrélation est significative au seuil de 0,05.

** : La corrélation est significative au seuil de 0,01.

Afin d'identifier les échantillons de miel avec des tests déterminés relativement similaires, une classification ascendante hiérarchique (CAH) est effectuée. A la distance de 5, quatre groupes affichent manifestement l'homogénéité. Le premier groupe est composé de 21 échantillons (de S2 à S23). Si l'on coupe le premier groupe à distance de 1, 11 sous-groupes se différencient nettement. Le deuxième groupe contient deux échantillons (S1 et S30). Le troisième groupe comprend cinq échantillons (S7, S28, S9, S16 et S5) se subdivisant en trois sous-groupes à la distance de 1.

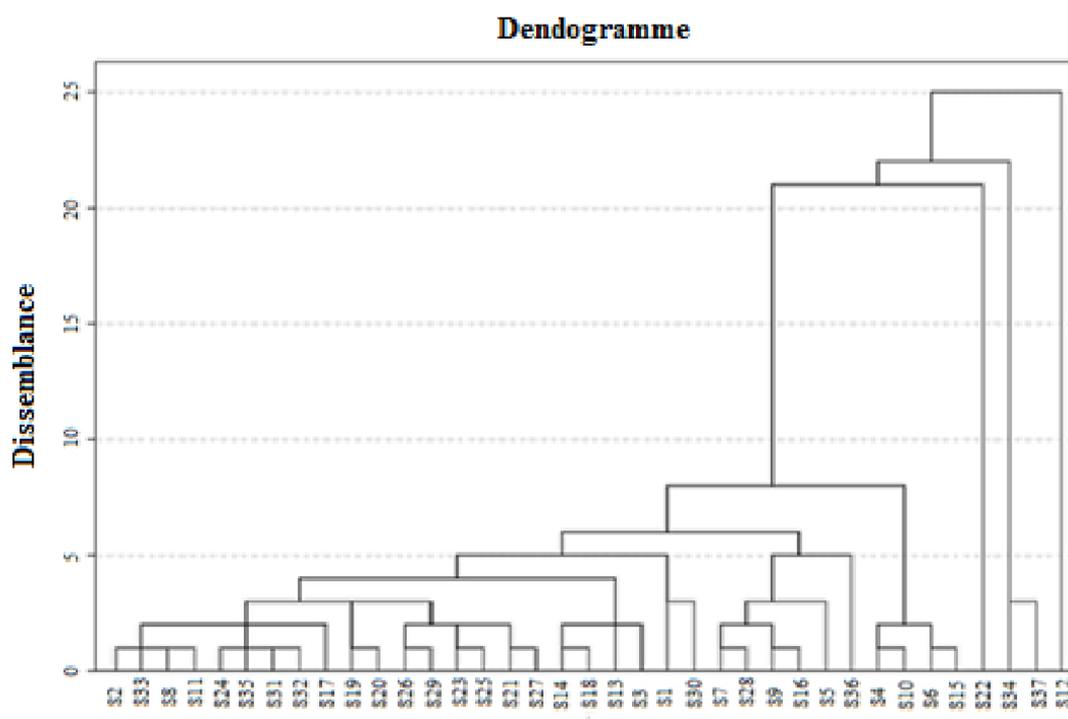


Figure 5: Dendrogramme de l'analyse typologique utilisant la distance euclidienne moyenne pour 37 échantillons de miel collectés dans l'ouest de l'Algérie, en relation avec les paramètres étudiés.

Le quatrième groupe est composé simplement d'un seul échantillon (S36). Ces quatre groupes constituent un cluster à la distance de 8, et le deuxième cluster est formé de quatre échantillons (S4, S10, S6 et S15). Les échantillons restants (S22, S34, S37 et S12) constituent trois groupes distincts.

III-3-Activité antimicrobienne

En Algérie, les Myrtaceae (*Eucalyptus*), Rutaceae (*Citrus*), Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae et Rhamnaceae (*Ziziphus*) représentent les sources botaniques les plus importantes pour la production de miel algérien (Homrani et coll., 2020). Peu d'enquêtes concernant les emplacements géographiques précis et les propriétés biologiques du miel algérien sont rapportées (khalil et coll., 2012 ; Laallam et coll., 2015).

D'autre part, le développement de nouveaux médicaments antimicrobiens a diminué au cours des 20 dernières années et peu de sociétés pharmaceutiques continuent d'être actives dans ce domaine. Pour remédier à cet échec, des médicaments non conventionnels ou non antibiotiques sont rappelés, notamment, la pouvoir du miel est évoquée (Morroni et coll., 2018).

III-3-A-Pouvoir antibactérien du miel

Le miel est un produit naturel complexe. De nombreuses études ont confirmé son pouvoir bactéricide et bactériostatique contre un large spectre de bactéries (Sherlock et coll., 2010 ; Hussain et coll., 2019 ; Kot et coll., 2020). Cette propriété antibactérienne du miel est liée à sa composition diverse, notamment: le peroxyde d'hydrogène, les composés non dépendants du peroxyde tels que le MGO, le lysozyme, la défensine-1 d'abeille et les composés phénoliques ainsi que ses caractéristiques physico-chimiques intrinsèques telles que l'acidité, la faible activité de l'eau et la concentration en sucre (Kot et coll., 2020).

De plus, les facteurs environnementaux influencent le profil floral, conditionnant les qualités et les propriétés biologiques du miel qui entravent son application à des fins cliniques (Oryan et coll., 2016 ; Velásquez et coll., 2020). Ces précisions soulignent le rôle important de la sélection des variétés importantes de miels non seulement pour leur propriété antibactérienne mais aussi pour leur composition en composés phénoliques ; dont la variation de ces molécules pourrait affecter le potentiel thérapeutique du miel.

D'après les données du protéome et du transcriptome, le miel présente un mode d'action unique et aucune résistance n'a été signalée, contrairement aux antibiotiques conventionnels (Blair et coll., 2005 ; Packer et coll., 2012 ; Nolan et coll., 2019).

III-3-B-Méthodes de détermination du pouvoir antimicrobien

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens provenant de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Par conséquent, une plus grande attention a été accordée aux méthodes de dépistage et d'évaluation de l'activité antimicrobienne. Plusieurs bioessais tels que la diffusion sur disque, la diffusion en puits et la dilution en milieu liquide sont bien connus et couramment utilisés, mais d'autres, tels que les méthodes de cytofluorométrie en flux et de bioluminescence, ne sont pas largement utilisés car ils nécessitent un équipement spécifique et une évaluation plus poussée pour la reproductibilité et la normalisation.

a) Méthodes de diffusion

-Méthode de diffusion sur disque de gélose

Le test de diffusion sur disque de gélose est la méthode officielle utilisée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour les tests de routine de sensibilité aux antimicrobiens. De nos jours, de nombreuses normes acceptées et approuvées sont publiées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les tests de bactéries et de levures (CLSI, 2016; CLSI, 2004).

Dans cette procédure bien connue, des plaques de gélose sont inoculées avec un inoculum standardisé du micro-organisme testé. Ensuite, des disques de papier filtre (environ 6 mm de diamètre), contenant le composé à tester à une concentration souhaitée, sont placés sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont incubées dans des conditions appropriées. Généralement, l'agent antimicrobien diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du micro-organisme testé, puis les diamètres des zones de croissance d'inhibition sont mesurés. L'antibiogramme fournit des résultats qualitatifs en classant les bactéries comme sensibles, intermédiaires ou résistantes (Jorgensen et Ferraro, 2009).

Cependant, étant donné que l'inhibition de la croissance bactérienne ne signifie pas la mort bactérienne, cette méthode ne peut pas distinguer les effets bactéricides et bactériostatiques. De plus, la méthode de diffusion sur disque en gélose n'est pas appropriée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), car il est impossible de quantifier la quantité d'agent antimicrobien diffusée dans le milieu gélosé. Néanmoins, une CMI approximative peut être calculée pour certains microorganismes et antibiotiques en comparant les zones d'inhibition avec des algorithmes stockés (Nijs et coll., 2003).

Le test de diffusion sur disque offre de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes : simplicité, faible coût, capacité à tester un nombre élevé de microorganismes et d'agents antimicrobiens, et facilité d'interprétation des résultats fournis.

-Méthode du gradient antimicrobien

La méthode du gradient antimicrobien combine le principe des méthodes de dilution avec celui des méthodes de diffusion afin de déterminer la valeur de la CMI. Elle est basée sur la possibilité de créer un gradient de concentration de l'agent antimicrobien testé dans le milieu gélosé. Cette méthode est utilisée pour la détermination de la CMI des antibiotiques, des antifongiques et des antimycobactériens. Plusieurs études antérieures ont montré une bonne corrélation entre les valeurs de CMI déterminées par cette méthode et celles obtenues par la méthode de dilution en milieu liquide (Gupta et coll., 2015 ; Berghaus et coll., 2015).

-Autres méthodes de diffusion

D'autres méthodes de diffusion sont utilisées dans les laboratoires de recherche en microbiologie pour cribler des extraits, des fractions ou des substances pures pour leur pouvoir antimicrobien ou pour étudier l'antagonisme entre les microorganismes. Parmi ces méthodes, les plus courantes sont mentionnées ci-dessous.

- ✓ Méthode de diffusion en gélose (méthode des disques et méthode des puits),
- ✓ Méthode de stries croisées.

b) Chromatographie sur couche mince (CCM) – bioautographie

Cette technique combine la CCM avec des méthodes de détection biologiques et chimiques. Plusieurs travaux ont été réalisés sur le criblage d'extraits organiques, principalement des extraits de plantes, pour une activité antibactérienne et antifongique par CCM-bioautographie (Horváth et coll., 2010 ; Mehrabani et coll., 2013).

Trois techniques bioautographiques sont citées dans la littérature pour l'étude des composés antimicrobiens par cette approche. Elles sont mentionnées ci-dessous :

- ✓ la diffusion en gélose (technique de disques et technique des puits),
- ✓ la bioautographie,
- ✓ et le test de superposition sur gélose.

c) Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de CMI, car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution en gélose) ou en milieu liquide (macrodilution ou microdilution).

La méthode de dilution en milieu liquide peut être utilisée pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries et les champignons. La valeur CMI enregistrée est définie comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien dosé qui inhibe la croissance visible du micro-organisme testé, et elle est généralement exprimée en $\mu\text{g/mL}$ ou mg/L .

✓ Méthode de dilution sur milieu liquide

La micro- ou macro-dilution sur milieu liquide est l'une des méthodes de test de sensibilité antimicrobienne les plus élémentaires. La procédure consiste à préparer des dilutions doubles en série de l'agent antimicrobien dans un milieu de croissance liquide distribué dans des tubes contenant un volume minimum de 2 mL (macrodilution) ou avec un volume plus petit volumes à l'aide d'une plaque de microtitration à 96 puits (microdilution). Ensuite, chaque tube ou puits estensemencé avec un inoculum microbien préparé dans le même milieu après dilution d'une suspension microbienne standardisée ajustée à 0,5 McFarland. Après agitation, les tubesensemencés ou la plaque de microtitration à 96 puits sont incubés dans des conditions appropriées en fonction du micro-organisme testé (Balouiri et coll., 2016).

La CMI est la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance de l'organisme dans les microplaques de microdilution (technique des microplaques), telle que détectée à l'œil nu (CLSI, 2012). Contrairement à la méthode de microdilution, les principaux inconvénients de la méthode de macrodilution (technique des tubes) sont le travail manuel fastidieux, le risque d'erreurs dans la préparation des solutions antimicrobiennes pour chaque test, et la quantité relativement importante de réactifs (Jorgensen et Ferraro, 2009). Ainsi, la reproductibilité et l'économie de réactifs qui se produit du fait de la miniaturisation du test sont les avantages majeurs de la méthode de microdilution.

Pour la détermination de la CMI, les dispositifs de visualisation peuvent faciliter la lecture des tests de microdilution et l'enregistrement des résultats avec une capacité élevée à discerner la croissance dans les puits. Par ailleurs, plusieurs méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation de réactifs colorants ont été développées. Les sels de tétrazolium sont souvent utilisés dans la détermination de la CMI pour les tests de microdilution antifongiques et antibactériens. Il est bien connu que la taille de l'inoculum, le type de milieu de croissance, le temps d'incubation et la méthode de préparation de l'inoculum peuvent influencer les valeurs de CMI. Par conséquent, la dilution en milieu liquide a été normalisée par le CLSI pour tester les bactéries qui se développent de manière aérobie, les levures et les champignons filamenteux.

La détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) ou de la concentration minimale fongicide (CMF), également connue sous le nom de concentration minimale létale (CML), est l'estimation la plus courante de l'activité bactéricide ou fongicide. La CMB est définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour tuer 99,9 % de l'inoculum final après 24 heures d'incubation, dans laquelle la CMB peut être déterminée après macrodilution ou microdilution par sous-culture d'un échantillon à partir de puits ou de tubes, donnant une croissance microbienne négative après incubation à la surface de

plaques de gélose non sélectives pour déterminer le nombre de cellules survivantes (CFU/mL) après 24 heures d'incubation. La MBC a été arbitrairement définie comme la concentration la plus faible, à laquelle 99,9 % de l'inoculum final est tué. La CMF est également définie comme la concentration la plus faible du médicament qui produit un effet destructeur de 98% à 99,9% par rapport à l'inoculum initial.

✓ Méthode de dilution en gélose

La méthode de dilution en gélose implique l'incorporation de différentes concentrations souhaitées de l'agent antimicrobien dans un milieu gélosé, en utilisant habituellement des dilutions doubles en série, suivies de l'inoculation d'un inoculum microbien défini sur la surface de la plaque de gélose. La CMI est enregistrée comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées. Cette technique convient aux tests de sensibilité antibactériens et antifongiques.

D'autres méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne sont décrites dans la littérature. Les méthodes suivantes sont les plus importantes :

- ✓ Test de cinétique d'efficacité,
- ✓ Test de bioluminescence de l'adénosine triphosphate (ATP),
- ✓ Méthode de cytofluorométrie en flux.

Actuellement, les infections microbiennes sont devenues une menace clinique importante, avec une morbidité et une mortalité associées élevées qui sont principalement dues au développement d'une résistance microbienne aux agents antimicrobiens existants. Par conséquent, les méthodes de test de sensibilité aux antimicrobiens et de découverte de nouveaux agents antimicrobiens ont été largement utilisées et continuent d'être développées.

Certaines techniques ont fait l'objet d'une normalisation par le CLSI, marquant les différentes étapes dans ce domaine. Cependant, lors de tests de produits naturels, certaines modifications des protocoles standardisés sont souvent demandées. Ainsi, il faut impérativement veiller à ne pas modifier les bases de la microbiologie en diluant les milieux de culture et en utilisant un inoculum très concentré.

III-3-C-Résultats et discussion

L'activité antimicrobienne des miels est d'abord évaluée à l'aide d'un test de diffusion en puits. Ainsi, en fonction du nombre d'échantillons de miel et de microorganismes cibles, le pouvoir inhibiteur est étudié à haute concentration (80% et 50%) (Tableau 11). Cependant, il y a une grande variation; non seulement d'un micro-organisme à l'autre mais aussi entre les miels de la même origine botanique.

Tableau 11: Activité antimicrobienne des miels de la région ouest algérienne.

Bactérie															
Gram-positif											Gram-négatif				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300						<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853				
N°	DZI ^a		Sig. ^b	CMI ^c [%]	CMB ^d [%]	DZI	50% (p/v)		CMI	CMB	DZI	50% (p/v)		CMI	CMB
	80% (p/v) ^e	50% (p/v)					80% (p/v)	50% (p/v)				80% (p/v)	50% (p/v)		
S1	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S2	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S3	/	/	-	/	/	12,33±0,58	9,33±0,58	*	60,00±0,00	60,00±0,00	/	/	-	/	/
S4	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S5	13,33±1,15	10,00±2,00	NS	80,00±0,00	80,00±0,00	28,33±0,58	25,00±0,00	**	100,00±0,00	100,00±0,00	/	/	-	/	/
S6	14,33±0,58	11,67±0,58	*	60,00±0,00	60,00±0,00	14,00±1,73	11,33±1,15	NS	60,00±0,00	60,00±0,00	/	/	-	/	/
S7	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S8	/	/	-	/	/	13,33±0,58	11,67±1,15	NS	80,00±0,00	100,00±0,00	/	/	-	/	/
S9	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S10	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S11	/	/	-	/	/	10,33±1,53	8,67±1,53	NS	80,00±0,00	80,00±0,00	8,00±0,00	/	-	60,00±0,00	60,00±0,00
S12	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S13	/	/	-	/	/	15,67±0,58	13,33±1,15	*	80,00±0,00	100,00±0,00	/	/	-	/	/
S14	/	/	-	/	/	9,00±0,00	/	-	60,00±0,00	60,00±0,00	/	/	-	/	/
S15	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S16	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S17	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S18	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S19	/	/	-	/	/	12,33±0,58	9,33±0,58	*	80,00±0,00	80,00±0,00	/	/	-	/	/
S20	/	/	-	/	/	13,00±1,00	11,33±0,58	NS	80,00±0,00	80,00±0,00	8,00±0,00	/	-	80,00±0,00	80,00±0,00
S21	14,33±0,57	8,33±1,53	*	80,00±0,00	80,00±0,00	14,33±0,58	12,67±0,58	*	80,00±0,00	80,00±0,00	/	/	-	/	/
S22	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S23	/	/	-	/	/	30,00±0,00	25,00±0,00	-	80,00±0,00	100,00±0,00	/	/	-	/	/
S24	/	/	-	/	/	17,67±1,15	14,67±1,15	*	80,00±0,00	80,00±0,00	/	/	-	/	/
S25	14,33±0,57	10,00±1,00	*	100,00±0,00	100,00±0,00	12,33±0,58	10,00±1,73	NS	80,00±0,00	80,00±0,00	/	/	-	/	/
S26	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S27	/	/	-	/	/	10,33±1,53	8,33±1,53	NS	60,00±0,00	60,00±0,00	8,00±0,00	/	-	80,00±0,00	80,00±0,00
S28	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S29	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S30	/	/	-	/	/	13,33±1,53	10,33±1,53	NS	80,00±0,00	100,00±0,00	8,67±0,58	/	-	80,00±0,00	80,00±0,00
S31	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S32	11,33±1,53	8,67±1,53	*	60,00±0,00	60,00±0,00	12,33±0,58	9,33±0,58	*	100,00±0,00	100,00±0,00	8,33±0,58	/	-	60,00±0,00	60,00±0,00
S33	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S34	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S35	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S36	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/
S37	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/	/	/	-	/	/

Les valeurs sont exprimées en moyenne ±Écart type (n = 3) ; ATCC : Collection de cultures types américaines. ^aDZI : Diamètre de la zone d'inhibition en mm incluant le diamètre du disque (6 mm). ^bSig. : Codes de signification. ^cCMI : Concentration Minimale Inhibitrice exprimée en %. ^dCMB : Concentration Minimale Bactéricide exprimée en %. ^e : Concentrations des échantillons de miel S(1-37). * : indique une différence significative (p< 0,05) ; ** : indique une différence significative élevée (p< 0,001) ; NS : Non significatif (p> 0,05) ; - : indique l'absence de variance entre les répétitions expérimentales ; / : aucune activité antimicrobienne.

En considérant les microorganismes, les miels actifs montrent une forte activité plus contre les bactéries Gram positives que contre les Gram négatives. En effet, l'espèce la plus sensible est *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 avec des diamètres de la zone d'inhibition (DZI) compris entre $9,00 \pm 0,00$ et $30,00 \pm 0,00$ mm alors que ceux de *P. aeruginosa* sont inclus dans l'intervalle $8,00 \pm 0,00$ et $8,67 \pm 0,58$ mm. Cependant, aucune activité n'est démontrée vis-à-vis de toutes les souches *C. albicans*.

En ce qui concerne la dilution, le modèle statistique indique que la concentration des échantillons de miel influence le DZI dans certains cas. A titre d'exemple, la variation du DZI est hautement significative ($p < 0,001$) pour le miel multifloral (S5) contre *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923. De plus, une différence significative ($p < 0,05$) est montrée pour le miel multifloral (S21) et de jujubier (S32) contre les deux souches de *S. aureus*, alors qu'aucune variance n'est montrée avec *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Compte tenu de l'origine botanique, le miel multifloral affiche généralement une activité antibactérienne efficace, avec une fluctuation de son pouvoir. Par exemple, le miel multifloral collecté à Sidi Djillali (S5), enregistre le DZI le plus élevé de $28,33 \pm 0,58$ mm, tandis que le miel multifloral provenant de Sebaa Chioukh (S14) (cf. Tableau 1) présente le DZI le plus bas estimé à $9,00 \pm 0,00$ mm, correspondant à une dilution de 80 % (p/v), contre *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923. Les mêmes constatations sont également observées pour les miels d'eucalyptus et de moutarde blanche douce.

Dans des tests séparés, la gentamicine et l'amphotéricine B sont testées contre les souches de référence. Les résultats sont présentés dans le tableau 12, et indiquent la sensibilité des souches. Il est à noter que le DZI des miels multif floraux (S5, S13, S24) et de chardon-Marie (S23) sont supérieurs à la limite supérieure des critères d'interprétation du CLSI pour les souches *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923. Ces résultats sont considérés comme indicatifs non concluants.

Tableau 12: Activités des antibiotiques contre les microorganismes étudiés.

Microorganismes	Antibiotiques	
	DZI ^b	
	Gent ^a (10 µg)	AMB ^a (100 µg)
Gram-positives		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	25,00±0,00	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	27,00±0,00	/
Gram-negative		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	21,00±0,00	/
Levures		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	/	27,50±3,54
<i>Candida albicans</i> ATCC26790	/	31,00±0,33
<i>Candida albicans</i> IPP444	/	26,00±0,33

Les valeurs sont exprimées en moyenne±Écart type (n = 3) ; ATCC : Collection de cultures types américaines.

^aAntibiotiques : Gent : Gentamicine ; AMB : Amphotéricine B ; ^bDZI : Diamètre de la zone d'inhibition en mm.

-Discussion des résultats de l'activité antimicrobienne des miels

Le test de diffusion en puits est utilisé pour cribler le pouvoir antimicrobien des 37 miels algériens. Cette méthode est simple, peu coûteuse et permet de différencier un grand nombre de miels avec et sans pouvoir antimicrobien. Les résultats obtenus à partir de ce test indiquent que les miels possèdent un pouvoir antibactérien substantiel. La comparaison de la sensibilité de chacune des souches cibles montre que *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 est la souche la plus sensible.

Des chercheurs ont déjà décrit la tendance similaire de la sensibilité spécifique aux microorganismes (Sindi et coll., 2019 ; Owayss et coll., 2020). En général, les bactéries Gram positives sont plus sensibles que les bactéries Gram négatives. Cette sensibilité est peut-être liée à la composition de l'enveloppe cellulaire. La paroi des Gram positifs est formée d'une épaisse couche de peptidoglycane qui facilite la pénétration des agents actifs dans le site actif (Sindi et coll., 2019).

En se basant sur l'échelle de Küçük et coll. (2007), la classification des miels actifs dépend de leurs concentrations. En effet, à 80% (p/v), les miels sont classés en agents antibactériens élevés ou modérés, tandis que les mêmes échantillons sont classés en agents modérés ou faibles à 50% (p/v). En revanche, en adoptant la concentration (80%) pour les miels actifs contre *P. aeruginosa* ATCC 27853, ces derniers sont classés comme agents très faibles selon l'échelle de Küçük et coll. (2007).

De plus, les miels algériens démontrent une activité antibactérienne dose-dépendante ; ils sont plus puissants à concentration élevée, par exemple : 80% (p/v). Nos résultats sont en accord avec ceux de Ghramh et coll. (2018); qui ont montré que les miels saoudiens étaient efficaces contre les bactéries Gram négatives à des concentrations comprises entre 40% et 80%. De plus, Laallam et coll. (2015) ont constaté que les miels algériens, collectés dans le Sahara, présentaient un effet contre les microorganismes cibles à l'état naturel (sans dilution).

Plusieurs observations pertinentes doivent être soulignées concernant le rôle de la source botanique comme facteur potentiel dans le pouvoir antibactérien des miels algériens. Tout d'abord, dans certains miels, la source botanique est identique alors que le pouvoir antibactérien est différent. Ceci suggère la contribution d'autres facteurs dans la propriété antibactérienne ; en particulier l'acidité et la conductivité électrique (CE) ; qui sont directement liées aux sources botaniques et agissent comme un effet additif. Pérez Martin et coll. (2008) et Laallam et coll. (2015) ont montré une corrélation inverse entre ces deux paramètres physico-chimiques et l'activité antimicrobienne des miels. Cela corrobore nos résultats, dans le sens où le fort pouvoir antibactérien dépend d'une faible CE et d'un faible pH. Aussi, la teneur en composés phénoliques

et flavonoïdes influence le potentiel antimicrobien. Les composés phénoliques inhibent la croissance d'un large éventail de bactéries, y compris les bactéries Gram positives et négatives (Sagdic et coll., 2013). En général, le pouvoir antimicrobien des composés phénoliques est lié à leur concentration ; à haute concentration; les composés phénoliques sont capables de dénaturer les protéines, alors qu'à faible concentration ils interfèrent avec les enzymes productrices d'énergie. Ces mécanismes modifient la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries (Bouacha et coll., 2018). Dans la présente étude, les échantillons de miel, avec TCP > 32,87±2,83 mg EAG/100 g de miel et TTF > 5,53±0,76 mg EQ/100 g de miel, montrent un effet puissant contre au moins deux bactéries, quel que soit leur Gram.

Nos résultats impliquent que le modèle du pouvoir antibactérien de plusieurs miels est complexe et dépend des interactions entre divers facteurs et composants du miel. Néanmoins, la teneur en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) semble être un facteur essentiel. Un autre facteur potentiel est la présence de la défensine-1 de l'abeille (Sindi et coll., 2019 ; Owayss et coll., 2020). Cependant, ces facteurs n'ont pas été explorés dans ce travail. Ils feront l'objet d'investigations plus poussées dans des travaux futurs.

De plus, pour obtenir des résultats performants et précis sur le pouvoir antibactérien; Les CMI et les CMB sont également étudiés. Ces dosages sont réalisés sur les miels actifs ; qui sont fournis par les résultats du test de diffusion en puits.

Bien qu'inattendus, les travaux actuels démontrent une faible relation entre les méthodes de diffusion et de CMI ; l'écart est apparu dans les miels S3, S6, S11, S14 et S27. Une tendance similaire est démontrée par Osés et coll. (2016) et Hussain et coll. (2019) et l'ont expliqué par la présence de certains composés à haut poids moléculaire qui ne peuvent diffuser facilement dans la gélose. Par conséquent; le microorganisme est capable de se développer sur la zone externe avant que le composé inhibiteur ne les atteigne. D'autre part, les composés non polaires diffusent difficilement à travers la gélose. Ainsi, la méthode de diffusion en puits a plusieurs limites et nécessite qu'elle soit combinée avec une autre méthode telle que CMI.

En outre, les CMI enregistrées pour les MSSA et SARM et pour les bactéries Gram positives et Gram négatives, dans certains miels, sont égales ; ce qui indique une activité à large spectre. De plus, les échantillons de miel actifs présentent principalement un effet bactéricide. Sur la base de ces résultats, les miels de l'ouest algérien pourraient présenter un potentiel thérapeutique précieux contre les bactéries pathogènes ou résistantes. Aussi, aucune résistance au miel n'est observée ; cela peut être due à ses composants multifactoriels et/ou à des facteurs qui agissent dans plusieurs sites de bactéries (Combarros-Fuertes et coll., 2019).

Les résultats de la CAH basée sur l'interaction entre « échantillons × effet sur les souches » classent les miels en cinq groupes délimités par une distance euclidienne égale à 1, comme le montre la figure 6. Le premier groupe formé par S3, S8, S13, S14, S19, S23 et S24 présentent un effet antimicrobien uniquement contre *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923.

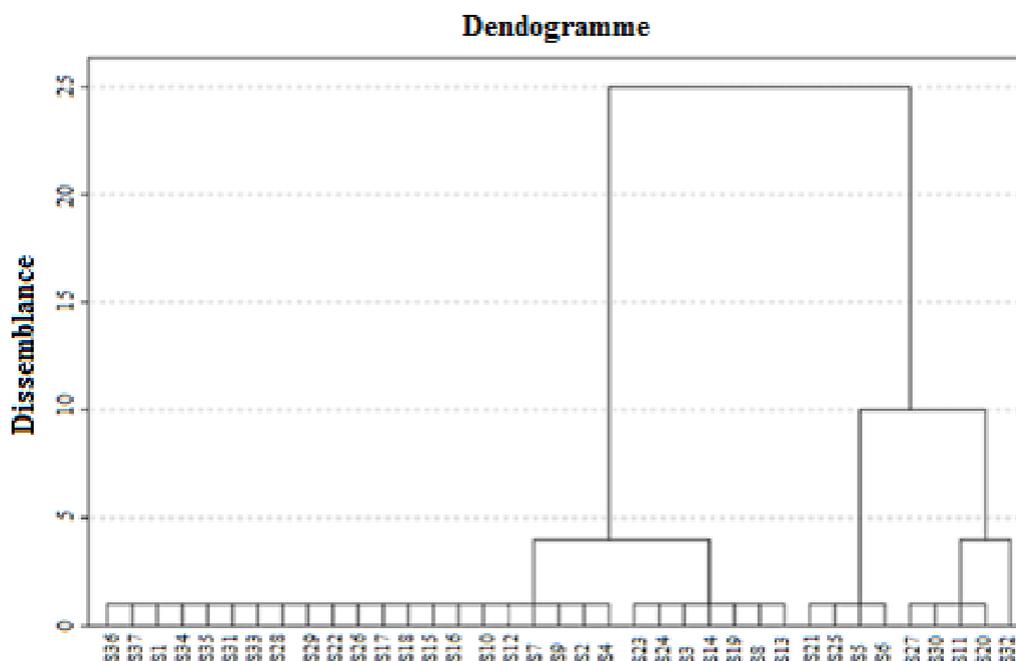


Figure 6: Dendrogramme de l'effet des échantillons de miel contre les souches de bactéries en utilisant la distance euclidienne.

Le deuxième groupe comprend les miels suivants : S5, S6, S21 et S25, qui montrent une activité envers les deux souches de *S. aureus*. Le troisième groupe est composé des miels S11, S20, S27 et S30 qui démontrent un effet contre les souches *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. Curieusement, le quatrième groupe contient simplement le miel S32 et c'est le seul miel qui présente une activité contre les trois bactéries de référence. Cependant, le cinquième regroupe le reste des échantillons de miel qui n'ont pas d'activité.

Les CMI et les CMB sont déterminées pour fournir des résultats plus précis, comme cela est résumé dans le tableau 11. Comme le test de diffusion en puits le montre, la souche *S. aureus* ATCC 25923 représente la souche sensible dont les valeurs de CMI sont comprises entre 60% (p/v) et 80% (p/v). De plus, les CMI et les CMB sont égales pour les miels S3, S6, S11, S14, S19, S20, S21, S24, S27 et S32 ou ne dépasse pas une dilution pour les miels S8, S13, S23 et S30. Cependant pour S5 et S25, des miels purs (100%) sont nécessaires pour obtenir un effet antibactérien. Des CMI égales sont obtenues pour les souches *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 et *S. aureus* (MRSA) ATCC43300 dans le cas des échantillons de miel S6 et S21. Une tendance similaire est observée entre les souches *S. aureus* (MSSA) ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC

27853 dans les échantillons de miel S20 et S30. Il est à noter que les miels S3, S6, S11, S14 et S27 démontrent un faible DZI dans le test de diffusion en puits ; toutefois, leurs valeurs de CMI sont les plus basses. Ces échantillons sont originaires de multifloral, de moutarde blanche douce (*Sinapis alba* L.), de thym (*Thymus vulgaris* L.) et d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill).

Enfin, lorsque l'activité antioxydante est mesurée, les échantillons de miels présentant le potentiel le plus élevé sont S3, S6, S13 et S15. Cependant et compte tenu du pouvoir antibactérien, les meilleurs échantillons de miels sont S6 et S32. En se basant sur la combinaison entre ces deux propriétés, l'échantillon S6 correspondant au miel de moutarde blanche douce (*Sinapis alba* L.) représente le meilleur miel bénéfique pour la santé. En effet, ce miel représente un miel particulier : forts pouvoirs antioxydant et antimicrobien ; TCP élevée (71,18±5,65 mg EAG/100 g de miel) ; TTF élevée (17,26±2,38 mg EQ/100 g de miel) ; faible acidité (pH = 3,99±0,05) et une valeur de conductivité électrique appropriée (CE = 0,553±0,001 mS/cm). Par conséquent, ces résultats mettent en évidence les relations étroites entre les composés bioactifs et l'activité antibactérienne et contribuent à élucider le manque de connaissances sur les propriétés bioactives du miel algérien.

Aussi, l'activité antimicrobienne, en particulier contre les bactéries Gram-négatives, les bactéries Gram-positives et les levures, suggère que les miels analysés peuvent jouer un rôle pertinent en tant que produits antibactériens naturels qui atténuent les effets des infections bactériennes et contribuent à l'amélioration de l'alimentation.

III-3-D-Conclusion

Le miel produit à partir de certaines sources botaniques présente une activité antimicrobienne élevée. Les possibilités d'application de ce produit pour le traitement des infections en pratique clinique devraient faire l'objet d'investigations intensives dans un proche avenir. À l'exception d'une activité élevée, les avantages les plus importants de ce produit sont les suivants :

- absence d'effets secondaires pour les patients (inconvenient important des antibiotiques) ;
- faibles coûts des thérapies ;
- faible possibilité de développement de souches résistantes – les cellules des agents pathogènes sont simultanément affectées par plusieurs facteurs, par exemple le peroxyde d'hydrogène, la défensine-1 d'abeille, le méthylglyoxal ou d'autres composés phytochimiques ;
- le miel fournit au corps du patient de nombreux composés favorables à la santé, par exemple des antioxydants, des micro-éléments, des oligo-éléments et des vitamines.

Cependant, il faut noter que plusieurs problèmes importants devraient être résolus pour une application plus courante du miel pour le traitement des infections.

- ✓ seul le miel classé de qualité médicale - avec une activité antibactérienne confirmée, exempt de microorganismes pathogènes et de composants toxiques pourrait être utilisé dans des applications médicales ;
- ✓ chaque miel devrait être testé pour son activité biologique avant son usage ;
- ✓ la méthode de stérilisation, sans danger pour les composants antibactériens protéiques du miel (glucose oxydase, défensine-1 d'abeille), devrait être développée (la stérilisation par irradiation gamma semble prometteuse) ;
- ✓ beaucoup plus d'études sont nécessaires pour vérifier les effets *in vivo* du traitement des infections ;
- ✓ une méthode de détermination de l'activité antimicrobienne du miel devrait être recommandée, en conséquence la comparaison de l'activité du produit testé dans différents laboratoires serait plus facile.

En résumé, nous ne doutons pas que le miel est une alternative intéressante et prometteuse aux antibiotiques classiques et devrait être plus sérieusement considéré comme agent thérapeutique.

III-4-Activité antidiabétique

L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages à long terme, un dysfonctionnement et une défaillance de divers organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (American Diabetes Association, 2001 ; UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998). Le diabète sucré est l'une des principales maladies des temps modernes, avec plus de 285 millions de personnes estimées en 2010 et environ 438 millions de personnes prévues pour 2030 dans le monde entier (Shaw et coll., 2010) ; cela est principalement dû à une alimentation déséquilibrée, à l'âge, à la surcharge pondérale et à l'inactivité physique des personnes. De nombreux diabétiques atteignent et/ou maintiennent difficilement l'objectif recommandé de 7% d'hémoglobine glyquée (HbA1c) pour le contrôle de la glycémie et sont donc exposés à des risques croissants de complications diabétiques à mesure que le contrôle glycémique se détériore avec le temps (Barr et coll., 2007).

Des études antérieures ont montré que le diabète sucré est une maladie évolutive qui ne peut pas être gérée efficacement avec une monothérapie médicamenteuse (Yale et coll., 2001). Les principaux changements métaboliques causés par l'hyperglycémie persistante sont l'accroissement du flux dans la voie des polyols, la formation élevée de radicaux libres d'oxygène et la glycosylation avancée (Yagihashi et coll, 2011).

Une concentration accrue de glucose provoque des anomalies métaboliques telles qu'un stress oxydatif accru et une lipotoxicité, qui à leur tour entraînent des anomalies endothéliales; provoquant une diminution du flux sanguin nerveux et de l'apport d'oxygène qui entraînent une dégénérescence nerveuse (Hosseini et Abdollahi, 2013).

La production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) résultant du métabolisme d'un excès de glucose et/ou d'acides gras libres est identifiée comme un facteur contribuant à la détérioration de la fonction des cellules β du pancréas (Robertson et Harmon, 2006). Aussi, la littérature mentionne que le traitement antioxydant prévient ou ralentit le développement de l'effet délétère du diabète sur le métabolisme dans des modèles animaux, signifiant une contribution majeure des espèces réactives de l'oxygène dans la physiopathologie (Coppey et coll., 2003).

Le miel est une substance naturelle aux diverses propriétés médicinales, notamment des effets antibactériens, antihypertenseurs, hépatoprotecteurs, hypoglycémiant et antioxydants (Rana et coll., 2018). Des études antérieures montrent que le miel exerce un effet hypoglycémiant et améliore le stress oxydatif chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (Omotayo et coll., 2010). De plus, des chercheurs ont étudié l'effet du miel comparé aux médicaments antidiabétiques tels que la metformine et la sitagliptine (Januvia) (Ozra et coll., 2012). Ces études rapportent que lorsque le miel est administré avec de la metformine ou de la sitagliptine, il y a une réduction de l'hyperglycémie et du bilan des lipides par rapport à la metformine ou à la sitagliptine seule.

Dans la présente étude, nous avons étudié comment l'ajout de miel comme adjuvant à la sitagliptine ou à la metformine affecte le contrôle glycémique chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine.

III-4-B-Effet du miel naturel sur le contrôle glycémique

Le diabète est une maladie chronique et reste la principale cause de mortalité dans le monde (Kokil et coll., 2010 ; Rao Kondapally Seshasai et coll., 2011). De nos jours, le monde médical se tourne de plus en plus vers les bienfaits pour la santé des produits naturels, des herbes médicinales, mais aussi du miel, dans la prise en charge de cette maladie. Avec un traitement médical classique, utilisant des recettes de la médecine traditionnelle, y compris l'utilisation de produits apicoles (miel,...), les patients diabétiques peuvent maintenir le niveau normal d'insuline dans le sang ainsi que leur état de santé général.

La composition du miel comprend plus de 200 composants, avec le fructose, le glucose et l'eau comme substances principales. Il était utilisé dans la médecine traditionnelle depuis longtemps, mais ses bienfaits pour la santé étaient basés uniquement sur des observations oculaires, sans aucune base scientifique. Ce n'est que dans les dernières décennies que le monde

scientifique s'est préoccupé de tester et d'expliquer les bienfaits du miel. Ces études de recherche expliquent dans une large mesure de nombreux effets médicinaux du miel tels que antioxydant (Erejuwa et coll., 2010), hépatoprotecteur (Asaduzzaman et coll., 2015), cardioprotecteur (Khalil et coll., 2015), antibactérien (Nishio et coll., 2016), anti-inflammatoire (Borsato et coll. 2014), ou antitumorale (Porcza et coll., 2016).

Pendant longtemps, il y a eu un mythe selon lequel le miel ne pouvait pas être utilisé dans l'alimentation des patients diabétiques, en raison de la forte teneur en glucides de sa composition chimique. Plusieurs études bibliographiques ont essayé de répondre aux questions suivantes : le miel est-il un bon substitut au sucre dans le régime alimentaire des diabétiques ? Les sucres simples naturels sont-ils importants dans la prévention et le traitement du diabète sucré ?

- Le fructose et l'effet hypoglycémiant du miel

En général, la teneur en fructose du miel varie de 21 à 43% et le rapport F/G de 0,4 à 1,6 voire plus. Bien que le fructose soit l'édulcorant naturel le plus sucré, il a un index glycémique de 19, comparé au glucose qui en a 100 ou au sucrose avec 60 (Bantle, 2009). Différentes études révèlent l'effet hypoglycémiant du miel, mais le mécanisme de cet effet reste incertain. Il a été suggéré que le fructose, les ions minéraux sélectifs (sélénium, zinc, cuivre et vanadium), les acides phénoliques et les flavonoïdes pourraient jouer un rôle dans le processus (Erejuwa et coll., 2010a ; Cortés et coll. 2011).

Il existe des preuves que le fructose a tendance à abaisser la glycémie dans les modèles animaux de diabète (Erejuwa et coll., 2012). Les mécanismes impliqués dans ce processus peuvent inclure une réduction du taux d'absorption intestinale (Kellet et coll. 2008), une prolongation du temps de vidange gastrique (Gregory et coll., 1989) et une réduction de l'apport alimentaire (Meirelles et coll., 2011). Le fructose stimule la glucokinase dans les hépatocytes, qui joue un rôle important dans l'absorption et le stockage du glucose sous forme de glycogène par le foie. D'autre part, le glucose, qui est présent à côté du fructose dans le miel, améliore l'absorption du fructose et favorise ses actions hépatiques grâce à son meilleur apport au foie (Ushijima et coll. 1995).

Le pancréas est un organe important dans le diabète, car il sécrète deux hormones régulatrices du glucose, l'insuline et le glucagon, et le miel pourrait protéger cet organe contre le stress oxydatif et les dommages causés par ses molécules antioxydantes, ce qui constitue un autre mécanisme potentiel de l'effet hypoglycémiant du miel (Erejuwa et coll., 2010b).

Différentes études ont été réalisées sur l'effet du fructose sur le contrôle glycémique, les hormones régulatrices du glucose, les hormones régulatrices de l'appétit, le poids corporel, la prise alimentaire et l'oxydation des glucides ou la dépense énergétique. Le fructose administré

seul ou dans le cadre d'une molécule de sucrose chez des rats normaux a amélioré l'homéostasie du glucose et la réponse à l'insuline par rapport aux rats qui ont reçu du glucose (Prieto et coll., 2004). D'autres études montrent que la supplémentation en fructose chez les rats normaux ou les rats diabétiques du type 2 a produit des niveaux plus faibles d'insuline et de glucose plasmatiques, plus que les autres sucres administrés (Kwon et coll., 2008).

- Effets du miel sur le foie

D'après la littérature, le foie est désigné comme l'un des trois organes les plus examinés dans le contrôle de la glycémie ; les deux autres étant le pancréas et les muscles du squelette (Klip et Vranic, 2006). Il est démontré que le fructose, présent en proportions importantes dans la plupart des miels, améliore les activités de la glucokinase et de la glycogène synthase et inhibe l'activité de la phosphorylase dans le foie. Les effets de ces actions ont tendance à entraîner une augmentation de la phosphorylation hépatique du glucose, une augmentation de la synthèse et une diminution de la dégradation du glycogène dans le foie. La présence du glucose et du fructose ensemble dans le miel est suggérée pour fournir un effet complémentaire sur le glucose et le glycogène dans le foie. Cependant, seules de faibles concentrations de fructose améliorent la tolérance au glucose et le métabolisme hépatique du glucose, tandis que des concentrations plus élevées ont un effet opposé (Wei et coll., 2004).

Bien qu'il existe de nombreuses preuves suggérant que la consommation de grandes quantités de fructose peut entraîner une prise de poids et d'autres conséquences métaboliques indésirables telles qu'une altération du métabolisme des lipides, une résistance à l'insuline et une augmentation du dépôt de graisse viscérale (Huynh et coll., 2008 ; Stanhope et coll., 2009), cette préoccupation est davantage liée à sa consommation excessive associée à des boissons riches en fructose et à des aliments susceptibles de produire des concentrations plus élevées de fructose délivré au foie (Lê et coll., 2006).

- Effets du miel sur les hormones régulatrices de la satiété, de l'apport alimentaire et du poids corporel

Quelques études expérimentales ont documenté les effets du miel sur les hormones qui régulent la satiété et l'apport et la dépense caloriques. Il est rapporté que les rats nourris au miel présentent des niveaux inférieurs de leptine par rapport aux rats nourris au sucrose. Comme tant d'autres effets, un rôle du fructose est également suggéré pour la réduction de la sécrétion de leptine et une atténuation de la suppression postprandiale de la ghréline. Cependant, les effets de l'administration de miel sur le poids corporel sont équivoques, certaines études faisant état d'une réduction de la prise de poids (Chepulis et Chepulis, 2007 ; Nemoseck et coll., 2011).

Le miel contient plusieurs autres constituants, en plus du glucose et du fructose et ces constituants bioactifs pourraient également contribuer à ses effets globaux sur le contrôle glycémique qui ont été rapportés dans plusieurs études expérimentales chez des animaux non diabétiques et diabétiques.

III-4-C-Résultats et discussion

a) Poids corporel

Le tableau 13 résume les résultats du poids corporel de différents groupes de rats. Il n'y a pas de différence significative de poids corporel entre les groupes avant le début de l'étude. Le groupe diabétique C' a une prise de poids significativement ($p < 0,05$) réduite par rapport au groupe non diabétique. Le groupe F' a significativement ($p < 0,05$) amélioré le gain de poids chez les rats diabétiques par rapport aux rats témoins diabétiques. Cependant, les groupes de diabétiques ayant reçu de la sitagliptine ou de la metformine en association avec du miel montrent une amélioration significative ($p < 0,05$) de la prise de poids par rapport aux rats témoins diabétiques (Tableau 14).

Tableau 13: Evolution du poids corporel des rats normaux pendant 4 semaines de traitement.

Groupe	Rats normaux				Gain de poids
	To	T ₁ (Semaine 1)	T ₂ (Semaine 2)	T ₄ (Semaine 4)	
A	242,75±6,03	272,50±7,37	280,00±8,39	250,25±5,51	9,5
B	234,50±8,48	252,50±2,52	269,25±8,48	266,00±6,36	8,0
C	231,75±13,58	249,50±18,77	268,50±8,48	272,75±6,36	10,25
D	262,50±10,61	262,25±4,24	278,50±17,68	275,00±11,31	3,25
E	244,50±4,73	237,00±6,66	270,50±5,13	263,50±7,09	4,75
F	269,00±8,50	287,50±7,07	240,50±9,19	306,75±5,65	9,25

Tableau 14: Evolution du poids corporel des rats diabétiques pendant 4 semaines de traitement.

Groupe	Rats diabétiques					Gain de poids
	To	T ₁ (Semaine 1)	T ₂ (Semaine 2)	T ₃ (Semaine 3)	T ₄ (Semaine 4)	
A'	198,00±4,24	213,50±4,04	220,50±6,36	208,00±5,57	221,00±7,50	5,75
B'	227,50±5,86	253,75±8,08	256,00±5,66	253,50±7,78	253,25±6,51	6,5
C'	247,75±4,24	272,75±2,83	260,75±4,95	273,00±12,02	261,50±2,12	3,5
D'	208,00±4,36	234,75±4,24	226,75±7,78	241,75±4,24	228,50±10,61	5,0
E'	228,50±4,24	236,25±7,07	256,00±2,83	257,25±8,14	256,75±6,08	7,0
F'	220,50±9,29	241,25±6,24	234,25±5,86	242,25±7,02	239,25±7,21	5,5

b) Glucose sérique, test glycémique

Les tableaux 15 et 16 résument les résultats du glucose sérique et du test glycémique dans différents groupes de rats à la fin de la période de traitement de quatre semaines. Les concentrations du glucose sérique des rats témoins diabétiques sont significativement plus élevées que celles des rats témoins non diabétiques. Le traitement avec du miel (B'), de la sitagliptine seule (E') et de la metformine seule (F') diminue significativement les niveaux de glucose ($2,29 \pm 0,42$; $3,92 \pm 0,64$ et $2,92 \pm 0,71$ g/L, respectivement) chez les rats diabétiques, après 3 semaines de traitement. L'association de la metformine avec du miel réduit encore les concentrations du glucose ($2,52 \pm 0,69$ g/L) chez les rats diabétiques.

Tableau 15: Variation de la glycémie des rats normaux pendant 4 semaines de traitement.

Groupe	Rats normaux				
	To	T ₁ (Semaine 1)	T ₂ (Semaine 2)	T ₃ (Semaine 3)	T ₄ (Semaine 4)
A	0,93±0,04	1,04±0,12	0,95±0,04	0,86±0,05	1,08±0,11
B	1,12±0,06	1,10±0,07	1,08±0,04	0,74±0,04	1,13±0,08
C	1,18±0,03	1,15±0,04	1,17±0,07	0,82±0,01	1,21±0,05
D	0,99±0,06	1,13±0,03	1,11±0,02	0,86±0,06	1,04±0,04
E	0,99±0,07	0,94±0,03	1,02±0,03	0,82±0,04	1,06±0,07
F	1,03±0,05	0,93±0,06	1,14±0,06	0,76±0,03	1,21±0,06

Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne±Erreur-type (SEM). 4 animaux dans chaque groupe. Valeurs significatives à $p < 0,05$.

A : Témoin (rats normaux non traités), B : Rats normaux traités avec du miel, C : Rats normaux traités avec du miel et de la metformine, D : Rats normaux traités avec du miel et de la sitagliptine, E : Rats normaux traités avec de la sitagliptine, F : Rats normaux traité par la metformine.

Tableau 16: Variation de la glycémie de rats diabétiques pendant 4 semaines de traitement.

Groupe	Rats diabétiques				
	To	T ₁ (Semaine 1)	T ₂ (Semaine 2)	T ₃ (Semaine 3)	T ₄ (Semaine 4)
A'	4,43±0,46	3,15±0,44	3,77±0,79	4,94±0,85	5,33±0,60
B'	4,64±0,74	2,42±0,57	3,38±0,87	2,29±0,42	3,45±0,25
C'	3,40±0,25	3,97±0,59	2,38±0,68	2,52±0,69	2,57±0,57
D'	4,87±0,58	3,17±0,45	4,94±0,56	4,96±0,55	3,54±0,78
E'	4,65±0,48	2,24±0,54	4,26±0,82	3,92±0,64	2,93±0,56
F'	4,68±0,81	3,43±0,68	3,96±0,78	2,92±0,71	3,34±0,44

Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne±Erreur-type (SEM). 4 animaux dans chaque groupe. Valeurs significatives à $p < 0,05$.

A' : rats diabétiques non traités, B' : rats diabétiques traités au miel, C' : rats diabétiques traités au miel et à la metformine, D' : rats diabétiques traités au miel et à la sitagliptine, E' : rats diabétiques traités à la sitagliptine, F' : rats diabétiques traités à la metformine.

La variation de la glycémie, après 2 heures de test, indique de manière significative ($p < 0,01$) que le test de la glycémie est très homogène et présente une régulation claire avec des valeurs qui reviennent à la normale pendant la durée du test, dans les groupes de rats C' et F' comparativement aux autres groupes traités (Figure 7, Tableaux 17 et 18).

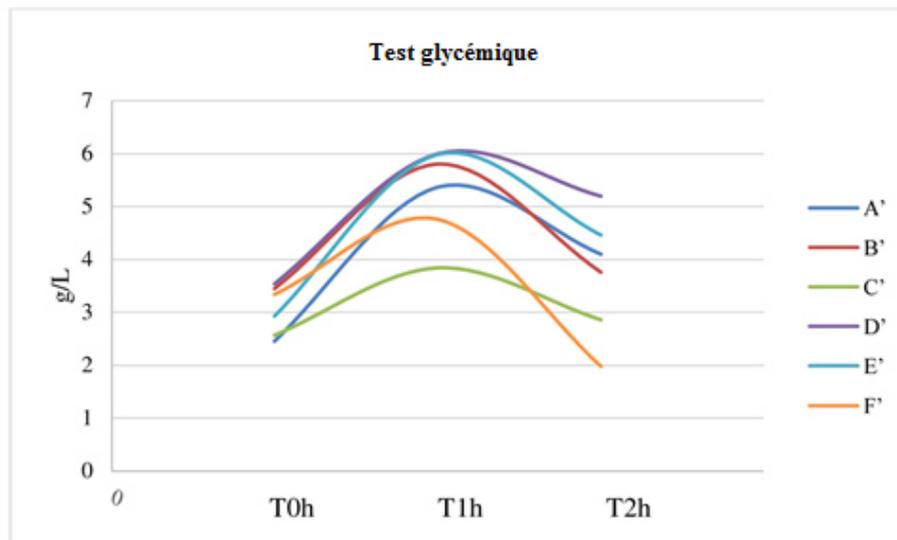


Figure 7: Test de tolérance au glucose chez des rats diabétiques.

Tableau 17: Test de tolérance au glucose de rats normaux.

Groupe	Rats normaux		
	To	Après 1 heure	Après 2 heures
A	1,09±0,05	1,30±0,07	0,90±0,03
B	1,13±0,08	1,08±0,09	0,95±0,08
C	1,21±0,05	1,28±0,05	1,03±0,07
D	1,04±0,04	1,27±0,07	1,07±0,06
E	1,06±0,07	1,18±0,07	0,96±0,03
F	1,21±0,06	1,25±0,02	1,02±0,03

Tableau 18: Test de tolérance au glucose de rats diabétiques.

Groupe	Rats diabétiques		
	To	Après 1 heure	Après 2 heures
A'	2,45±0,33	5,37±0,41	4,10±0,44
B'	3,45±0,25	5,80±0,41	3,76±0,27
C'	2,57±0,56	3,84±0,21	2,86±0,30
D'	3,54±0,18	6,00±0,00	5,20±0,45
E'	2,93±0,36	5,98±0,04	4,46±0,61
F'	3,34±0,44	4,76±1,09	1,98±0,47

La corrélation est significativement positive avec les différents paramètres, indiquant que la variation du taux de glucose dans le sang provoque une variation qui suit la même cinétique, induisant les mêmes perturbations métaboliques (Tableaux 15, 16, 19, 20 et 21-26).

c) Urée, triglycérides, cholestérol total et protéines

Les tableaux 19 et 20 montrent les taux de triglycérides dans le sérum chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine et aussi leur augmentation de manière significative par rapport aux rats non diabétiques. Cependant, le taux du cholestérol total qui est significativement réduit chez les rats diabétiques non traités (A') et les groupes de rats diabétiques traités avec du miel (B'), du miel et de la metformine (C') et à la sitagliptine seule (E') par rapport aux groupes non diabétiques et traités (- 32%, -22,8%, -38,3% et -32,9%, respectivement).

Il est à noter que les niveaux d'urée diminuent de manière significative dans le sérum des groupes traités C' et E' par rapport aux rats non diabétiques. Les groupes traités diabétiques montrent une réduction significative ($p < 0,05$) du niveau des protéines par rapport aux rats non diabétiques.

Tableau 19: Taux d'urée, de triglycérides, de cholestérol total et de protéines chez les rats normaux.

Temps	Groupe	Rats normaux			
		Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines
T ₀	A	0,923±0,037	0,162±0,021	0,742±0,068	75,072±3,847
T ₄	A	0,399±0,063	0,245±0,055	1,030±0,082	88,860±3,076
T ₀	B	0,933±0,136	0,092±0,006	0,723±0,021	74,860±2,738
T ₄	B	0,138±0,021	0,235±0,015	1,016±0,069	83,424±5,519
T ₀	C	1,323±0,031	0,232±0,069	0,697±0,027	80,997±2,821
T ₄	C	0,864±0,031	0,378±0,055	1,044±0,099	77,043±2,622
T ₀	D	1,743±0,146	0,556±0,087	0,648±0,023	79,716±1,068
T ₄	D	0,596±0,054	0,302±0,035	0,839±0,085	66,795±2,931
T ₀	E	2,128±0,083	0,209±0,045	0,586±0,057	73,840±3,635
T ₄	E	1,106±0,030	0,184±0,044	1,099±0,046	80,375±1,874
T ₀	F	0,829±0,042	0,361±0,086	0,808±0,052	65,867±3,910
T ₄	F	0,522±0,031	0,218±0,042	0,828±0,041	88,265±2,461

Tableau 20: Taux d'urée, de triglycérides, de cholestérol total et de protéines chez les rats diabétiques.

Temps	Groupe	Rats diabétiques			
		Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines
T ₀	A'	0,967±0,092	0,342±0,070	0,410±0,042	55,395±1,393
T ₄	A'	0,311±0,085	0,483±0,059	0,697±0,065	70,468±1,649
T ₀	B'	0,592±0,032	0,369±0,090	0,515±0,082	62,143±1,947
T ₄	B'	0,583±0,009	0,845±0,094	0,784±0,027	60,657±2,093
T ₀	C'	0,513±0,083	0,273±0,066	0,331±0,065	50,880±1,499
T ₄	C'	0,425±0,057	0,616±0,040	0,644±0,049	72,947±2,965
T ₀	D'	0,592±0,000	0,279±0,063	0,557±0,052	62,947±2,022
T ₄	D'	0,583±0,000	0,996±0,097	0,692±0,042	80,565±2,747
T ₀	E'	0,737±0,052	0,328±0,064	0,531±0,058	64,500±4,659
T ₄	E'	0,367±0,093	0,546±0,008	0,737±0,014	70,035±1,768
T ₀	F'	1,056±0,136	0,628±0,078	0,307±0,037	56,383±4,016
T ₄	F'	0,385±0,178	0,767±0,110	0,779±0,068	68,425±3,792

Tableau 21: Corrélation dans le groupe non traité (A') chez les rats diabétiques.

	Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines	Glycémie
Urée	1				
Triglycérides	0,99952766	1			
Cholestérol total	1	0,99952766	1		
Protéines	0,99999902	0,99956972	0,99999902	1	
Glycémie	1	1	1	1	1

Tableau 22: Corrélation dans le groupe traité au miel (B') chez les rats diabétiques.

	Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines	Glycémie
Urée	1				
Triglycérides	0,9966159	1			
Cholestérol total	0,9966159	1	1		
Protéines	0,99664985	0,99999991	0,99999991	1	
Glycémie	0,99622879	0,9999895	0,9999895	0,99998752	1

Tableau 23: Corrélation dans le groupe traité au miel et à la metformine (C') chez des rats diabétiques.

	Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines	Glycémie
Urée	1				
Triglycérides	1	1			
Cholestérol total	1	1	1		
Protéines	1	1	1	1	
Glycémie	0,99952113	0,99952113	0,99952113	0,99952113	1

Tableau 24: Corrélation dans le groupe traité au miel et à la sitagliptine (D') chez des rats diabétiques.

	Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines	Glycémie
Urée	1				
Triglycérides	1	1			
Cholestérol total	1	1	1		
Protéines	1	1	1	1	
Glycémie	1	1	1	1	1

Tableau 25: Corrélation dans le groupe traité à la sitagliptine (E') chez les rats diabétiques.

	Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines	Glycémie
Urée	1				
Triglycérides	1	1			
Cholestérol total	1	1	1		
Protéines	1	1	1	1	
Glycémie	0,99998945	0,99998945	0,99998945	0,99998945	1

Tableau 26: Corrélation dans le groupe traité à la metformine (F') chez les rats diabétiques.

	Urée	Triglycérides	Cholestérol total	Protéines	Glycémie
Urée	1				
Triglycérides	1	1			
Cholestérol total	1	1	1		
Protéines	1	1	1	1	
Glycémie	1	1	1	1	1

d) Etudes histopathologiques

L'examen des tissus hépatiques montre une congestion vasculaire, une nécrose hépatocytaire, une binucléation des hépatocytes, une dilatation de la veine centrolobulaire et des zones portes inflammatoires chez les rats traités par la STZ (Figures 8 et 9). Cependant, avec l'utilisation du miel, une légère congestion vasculaire et une nécrose des hépatocytes sont observées.

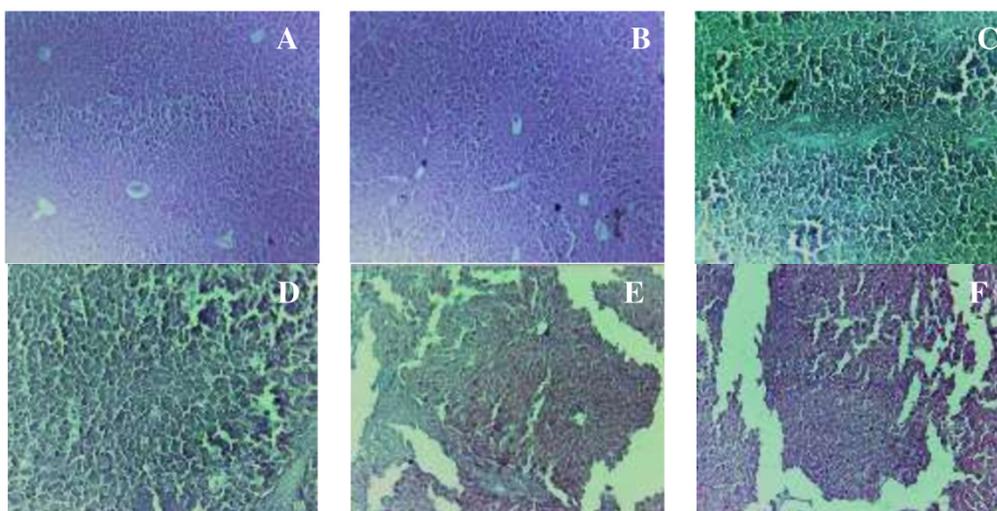


Figure 8: Spécimens de foie dans les groupes normaux.

(A : Témoin (rats normaux non traités), B : Rats normaux traités avec du miel, C : Rats normaux traités avec du miel et de la metformine, D : Rats normaux traités avec du miel et de la sitagliptine, E : Rats normaux traités avec de la sitagliptine, F : Rats normaux traité par la metformine).

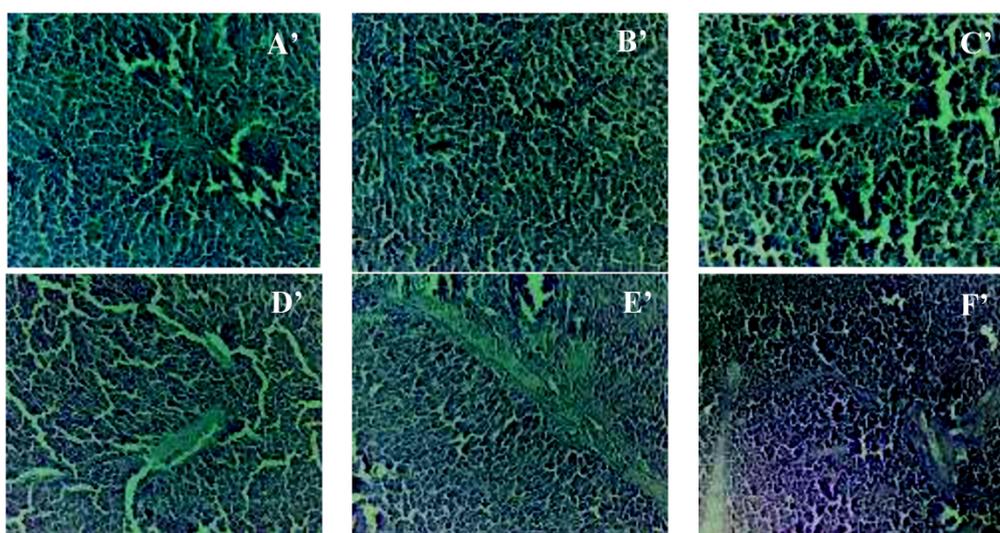


Figure 9: Spécimens de foie dans les groupes de diabétiques.

(A' : rats diabétiques non traités, B' : rats diabétiques traités au miel, C' : rats diabétiques traités au miel et à la metformine, D' : rats diabétiques traités au miel et à la sitagliptine, E' : rats diabétiques traités à la sitagliptine, F' : rats diabétiques traités à la metformine).

-Discussion des résultats de l'activité antidiabétique

Chez les rats rendus diabétiques par la STZ, une carence en insuline à la suite de la destruction irréversible des cellules bêta du pancréas entraîne une hyperglycémie (Rakieten et coll., 1963). La sitagliptine, la metformine ou le miel réduisent significativement les concentrations du glucose sanguin dans notre étude, essentiellement après 4 semaines de traitement, ce qui est similaire aux résultats des études précédentes (Kalaiarasi et coll., 2009).

Dans notre étude, la metformine montre une réduction significative de la glycémie par rapport aux mêmes autres groupes (Majithiya et Balaraman, 2006) ; l'effet hypoglycémiant du miel peut également être dépendant du glucose et donc posséder un effet euglycémique plutôt qu'hypoglycémiant chez les rats non diabétiques.

Les mécanismes d'action de la sitagliptine et de la metformine sont bien documentés (Krentz et Bailey, 2005). Au contraire, on ne sait toujours pas comment le miel agit avec son effet hypoglycémiant dans le diabète. Cependant, sur la base de la littérature actuelle, on peut suggérer que le miel pourrait éventuellement exercer son effet hypoglycémiant par le fructose qui est le constituant prédominant (Bogdanov et coll., 2008). Le fructose alimentaire est connu pour activer la glucokinase qui est une enzyme clé impliquée dans le métabolisme intracellulaire du glucose. Il catalyse la conversion du glucose en glucose-6-phosphate diminuant ainsi la glycémie (Watford, 2002). Une étude précédente rapporte également que le fructose stimule la sécrétion d'insuline à partir d'un pancréas isolé (Grodsky et coll., 1963). Toutefois, des preuves tangibles à l'appui du rôle du fructose dans la médiation de l'effet hypoglycémiant du miel sont fournies par Curry et coll. (1972). En effet, ces derniers ont découvert que dans les préparations du pancréas de rat, il n'y a pas de réponse insulinaire au fructose lorsque des concentrations très faibles ou nulles de glucose sont présentes dans le milieu. En revanche, il est observé qu'avec des concentrations de glucose plus élevées, une réponse insulinaire au fructose est déclenchée (Curry et coll., 1972).

Ces résultats semblent corroborer les nôtres où nous avons constaté que le miel présente un effet hypoglycémiant chez les rats diabétiques mais ne produise pas le même effet chez les rats non diabétiques.

De plus, le miel a un index glycémique inférieur à celui de nombreux autres glucides (Abdulrhman et coll., 2011). Concernant la composition du miel S4 utilisé dans cette étude [fructose ($43,53 \pm 0,14\%$), glucose ($22,07 \pm 0,17\%$), rapport fructose/glucose ($1,97 \pm 0,02$)], le rapport de près de 2:1 du fructose au glucose indique son caractère unique comparé avec certains types de miel qui ont un rapport de 1: 2 de fructose au glucose (Zhang et coll., 2020).

En plus du fructose et du glucose, le miel est connu pour contenir des fructo-oligosaccharides qui apportent des bienfaits prébiotiques à la microflore intestinale tels que les bifido-bactéries et les lactobacilles, qui sont des probiotiques (Sultana et coll., 2022 ; Mohan et coll., 2017). Étant donné que la microflore gastro-intestinale est désormais identifiée comme jouant un rôle clé dans la santé et la maladie, le miel peut aider à améliorer la santé intestinale des diabétiques et peut-être avoir un impact sur la gestion du glucose par des mécanismes supplémentaires qui doivent être explorés.

Le miel contient également des éléments tels que le zinc, le sélénium, le cuivre, le calcium, le potassium, le chrome, le manganèse, etc. (Bogdanov et coll., 2008). Certains de ces minéraux jouent un rôle vital dans le maintien d'une tolérance normale au glucose et de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques (Abdourahman et Edwards, 2008). La supplémentation quotidienne des rats diabétiques avec du miel pendant quatre semaines peut atteindre des concentrations suffisantes de ces minéraux pour provoquer des réponses pharmacologiques qui contribuent de manière synergique à l'effet hypoglycémiant. De plus, une meilleure sécrétion d'insuline par le pancréas (probablement due à un effet protecteur sur les cellules bêta) peut contribuer à l'effet hypoglycémiant du miel.

L'induction du diabète par la STZ entraîne une perte de poids corporel chez les rats témoins diabétiques. Nos résultats montrent que ni la sitagliptine ni la metformine n'empêchent la perte de poids. D'autre part, ces médicaments en combinaison avec du miel réduisent la perte de poids chez les rats diabétiques. Les mécanismes par lesquels le miel améliore le poids corporel ne sont pas clairs. L'insuline a un effet anabolisant sur le métabolisme des protéines en stimulant leur synthèse et en retardant leur dégradation (Levine, 1982).

Bien que le miel ait augmenté l'insuline sérique, compte tenu des niveaux d'insuline chez les rats diabétiques ayant reçu de la sitagliptine ou de la metformine en association avec du miel, l'effet supplémentaire du miel sur le poids corporel de ces rats n'a pas pu être attribué à l'insuline. Il est possible que le constituant fructose du miel (Sadowska et Rygielska, 2019) ou l'amélioration du contrôle glycémique dû au miel pourraient contribuer à la prise de poids.

Une augmentation des taux sériques d'urée, indicateur d'une fonction rénale altérée (Piccoli et coll., 2015), est observée chez les rats témoins diabétiques. Leurs niveaux sont restés élevés chez les rats diabétiques traités avec du miel, de la sitagliptine ou de la metformine. Toutefois, la sitagliptine ou la metformine en association avec le miel diminuent significativement la créatinine sérique. Cela suggère que la combinaison de médicaments hypoglycémiant avec du miel peut avoir un effet bénéfique dans la prévention des lésions rénales, peut-être grâce à un

meilleur contrôle glycémique et à une amélioration du stress oxydatif, comme indiqué précédemment (Erejuwa, 2014).

La microalbuminurie est l'une des manifestations cliniques de la néphropathie diabétique. L'albuminurie, qui peut être due à une fuite d'albumine par une membrane glomérulaire endommagée, se développe dans le diabète sucré non traité (Piccoli et coll., 2015). Des taux réduits de protéines sériques et d'albumine/globuline chez les rats diabétiques pourraient indiquer une fuite rénale. Le traitement au miel ou à la metformine augmente les protéines sériques et le rapport albumine/globuline. Ces résultats suggèrent que le miel peut aider à réparer les lésions rénales.

Dans la présente étude, la STZ provoque des lésions hépatiques aiguës, ce qui était évident par l'élévation des modifications histologiques observées dans le tissu hépatique après 4 semaines. Ces changements sont restaurés vers la normale après un traitement avec du miel, ce qui pourrait être dû à son effet hépatoprotecteur. Aussi, il est constaté que l'hyperglycémie réduit les antioxydants, augmente les niveaux de malondialdéhyde et entraîne des lésions hépatiques par oxydation (Behrouj et coll., 2018). Le miel pourrait prévenir les lésions hépatiques par son activité hypoglycémiant et antioxydante, qui nécessite des tests supplémentaires, la STZ et l'hyperglycémie, le cholestérol élevé, les triglycérides. Ces changements sont restaurés considérablement par le miel. Le miel réduit le taux de cholestérol en raison de sa teneur en antioxydants (Ramli et coll., 2018).

Le diabète est caractérisé par une carence en insuline qui provoque une lipolyse accrue dans les tissus adipeux et une entrée accrue d'acides gras libres (AGL) dans le foie (Xia et coll., 2017). On rapporte que l'augmentation de l'absorption d'AGL et du glucose indépendant de l'insuline dans le foie stimule la synthèse des triglycérides (Radler et coll., 2011). En conséquence, la dyslipidémie liée à des anomalies des lipoprotéines sériques est un facteur de risque athérogène imminent dans le diabète (Vergès, 1999).

Dans cette étude, les rats témoins diabétiques montrent des augmentations insignifiantes des niveaux de triglycérides (TG) alors qu'aucun changement significatif n'est observé dans les niveaux de cholestérol total. Nos résultats sont similaires à ceux de Zhu et coll. (2005) qui ont également trouvé des anomalies lipidiques non significatives chez les rats diabétiques. Néanmoins, d'autres chercheurs ont signalé des changements significatifs dans les anomalies lipidiques (Ishizaka et coll., 2011). La diminution des taux de TG chez les rats diabétiques ayant reçu de la sitagliptine ou de la metformine semble corroborer les découvertes antérieures selon lesquelles ces médicaments améliorent la dyslipidémie (Krentz et Bailey, 2005).

En outre, des niveaux significativement plus faibles de TG observés chez les rats diabétiques ayant reçu une combinaison de sitagliptine ou de metformine avec du miel démontrent que le miel combiné à ces agents hypoglycémians produit un effet synergique dans la réduction des TG chez les rats diabétiques.

III-4-D-Conclusion

Ces résultats indiquent que le miel associé à la sitagliptine ou à la metformine chez les rats rendus diabétiques par la STZ aide à atteindre des taux de glucose sérique bien inférieurs à ceux obtenus avec la sitagliptine ou la metformine seule. Fait intéressant, le miel en tant qu'adjuvant à la sitagliptine ou à la metformine conduit à un meilleur contrôle glycémique et à certains avantages métaboliques supplémentaires non obtenus avec la sitagliptine ou la metformine seules.

Cette étude apporte des preuves que la combinaison du miel avec des agents hypoglycémians oraux peut être une thérapie adjuvante précieuse pour atteindre et/ou maintenir le contrôle glycémique et éventuellement réduire ou retarder l'apparition de complications diabétiques et conduire à l'amélioration de la fonction hépatique après une hyperglycémie induite par la STZ. En effet, la combinaison du miel entraîne une meilleure protection, ce qui était évident par analyse statistique par rapport au groupe témoin, au groupe traité au miel et au groupe non traité. Il existe aujourd'hui un besoin de réaliser des études cliniques randomisées afin d'évaluer chez l'homme les bénéfices du miel associé à la sitagliptine et à la metformine.

Partie Expérimentale

Chapitre IV : Partie expérimentale

IV-1-Collecte des échantillons de miels

Trente-sept échantillons de miels d'origine florale variable, identifiés par S(1-37), sont collectés auprès des apiculteurs expérimentés de différentes régions géographiques situées dans l'ouest d'Algérie : Tlemcen, Ain-Témouchent, Sidi Bel Abbès, Mostaganem, Mascara, Tiaret, Naâma et Béchar (Figure 3). Le type et la région (coordonnées GPS, climat) des échantillons de miel, ainsi que les noms scientifiques et communs des plantes qui forment la flore de base des échantillons de miel, sont présentés dans le tableau 1. Tous les échantillons sont acquis entre mars 2017 et août 2018. Dès réception, les miels sont stockés dans des bouteilles en verre scellées et conservés à 4 °C jusqu'au début de l'analyse approfondie. Les miels de lavande (*Lavandula vera*), romarin (*Rosmarinus officinalis*), moutarde blanche douce (*Sinapis hirta*), thym (*Thymus vulgaris*), chardon-Marie (*Silybum marianum*), caroubier (*Ceratonia siliqua*), oranger (*Citrus sinensis* L.), euphorbe (*Euphorbia* L.), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), camphrier (*Cinnamomum camphora* L.), jujubier (*Ziziphus lotus* L.), sauge (*Salvia officinalis*), harmal (*Peganum harmala* L.) et le miel multifloral sont étudiés dans cette recherche.

IV-2-Propriétés physico-chimiques

2-a-Réactifs et solutions

Hydroxy méthylfurfural (HMF) ($\geq 99\%$), proline, acide gallique (GA) ($\geq 98,0\%$), quercétine ($\geq 95,0\%$) et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) sont achetés auprès de Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Taufkirchen, Allemagne).

Le réactif de Folin-Ciocalteu, chlorure d'aluminium (AlCl_3) et carbonate de sodium sont obtenus auprès de Fluka (Chemie AG, Buchs, Suisse). Tous les produits chimiques et les réactifs sont d'un degré de pureté analytique.

2-b-Teneur en humidité

La détermination de la teneur en eau de chaque miel est réalisée par méthode réfractométrique à l'aide d'un réfractomètre Abbe 5 (Bellingham + Stanley Ltd., Xylem Royaume-Uni). Les mesures optiques de l'indice de réfraction sont corrigées pour une température standard de 20°C en ajoutant le coefficient de correction de 0,00023/°C. Tous les résultats obtenus sont déterminés en triplicatas puis comparés au tableau de Chataway (Bogdanov, 2009) qui indique la teneur en humidité du miel en pourcentage.

2-c-pH et acidité libre

La mesure du pH de chaque échantillon de miel est réalisée à l'aide d'un pH-mètre Adwa AD8000 (Szeged, Hongrie).

L'acidité libre est déterminée par la méthode titrimétrique. Dans un bécher de 250 mL, 10g d'échantillon de miel sont complètement dissous dans 75 mL d'eau distillée et le pH est ensuite mesuré après immersion des électrodes de pH dans la solution.

L'acidité libre est ensuite mesurée par le titrage de la solution précédente avec 0,1 M NaOH jusqu'à pH 8,3, en présence de phénolphaléine jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante pendant une dizaine de secondes. Un test à blanc avec de l'eau distillée est également réalisé dans les mêmes conditions. Toutes les expériences sont réalisées en triplicatas et les résultats sont exprimés en méq/kg de miel (Bogdanov et coll., 1999 ; Bogdanov et Martin, 2002 ; Bogdanov, 2009).

2-d-Contenu du HMF

La teneur en HMF est mesurée à l'aide du spectrophotomètre SHIMADZU UVmini-1240 (Shimadzu Europa GmbH, Allemagne) selon la méthode rapportée par White (1979). L'absorbance d'une solution clarifiée à 10% (p/v) de miel dissous dans de l'eau distillée est déterminée par rapport à une solution de référence du même miel dans laquelle le chromophore λ_{\max} (284 nm) de HMF est détruit par du bisulfite de sodium à 0,1%. La teneur en HMF est exprimée en mg/kg de miel (Bogdanov, 2009).

2-e-Conductivité électrique (CE)

Les mesures de la conductivité électrique sont effectuées à 20,0 °C dans une solution à 20% (p/v) de miel (matière sèche) dans de l'eau distillée déminéralisée à l'aide d'un conductimètre WTW inoLab® Cond (WTW GmbH & Co. KG, Weilheim, Allemagne). Les résultats sont exprimés en mS/cm (Bogdanov, 2009).

2-f-Rotation spécifique

La rotation angulaire spécifique ($[\alpha]_D^{20}$) ou l'activité optique est mesurée dans une solution claire à 10% (p/v) de miel dissous dans de l'eau distillée, à 20°C au moyen d'un polarimètre OPTIKA (science Italie) (Bogdanov, 2009). La valeur est liée à la teneur en glucides.

2-g-Détermination de la proline

La proline est le principal acide aminé du miel. Son contenu est déterminé selon la méthode originale rapportée par Ough (1969). La réaction de la proline est réalisée avec 3% de ninhydrine en milieu acide formique. L'absorbance du produit résultant est mesurée à $\lambda_{\max} = 510$ nm opposé à un blanc d'eau distillée avec un spectrophotomètre OPTIZENTM POP UV/Visible

(Mecasys Co., Ltd., République de Corée). La teneur en proline est obtenue au moyen d'une courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en mg/kg de miel.

2-h-Couleur

L'évaluation instrumentale de la couleur est réalisée à l'aide d'un colorimètre EnviSense NH310. Dans le système de mesure CIE $L^* a^* b^*$ utilisé, L^* signifie la luminosité et c'est un vecteur spatial. Alors que a^* et b^* sont les coordonnées trichromatiques, où les valeurs positives de a^* correspondent au rouge, les valeurs négatives au vert, les valeurs positives b^* - jaune, négatives b^* - bleu. Les valeurs CIE $L^* C_{ab}^*$ et h_{ab}° sont également présentées, où C_{ab}^* est la chrominance et h_{ab}° - l'angle de couleur. Les valeurs C_{ab}^* et h_{ab}° sont calculées à partir des valeurs de a^* et b^* de l'échelle CIE $L^* a^* b^*$. La valeur L^* est la même sur chacune de ces échelles. Le diamètre du trou de mesure est de 8 mm. La mesure est faite en quadricata pour chaque test.

2-i-Détermination de la composition en sucres

1 g de miel est pesé dans des flacons gradués (50 mL) en duplicata. Les flacons sont ensuite complétés au volume avec de l'eau distillée, mélangés et la solution est filtrée. Le filtrat est analysé à l'aide d'un système CLHP Gilson avec des pompes Gilson 306, un échantillonneur automatique 234 Autoinjector, une colonne d'amine (Aminex HPX-87H, BioRad, 300 x 7,8 mm) et un détecteur réfractométrique (Knauer K2300). La phase mobile est de l'acide sulfurique (VI) 0,03 M et le processus de séparation est effectué à 42°C (thermostat Phenomenex Thermasphere TS130) et à un débit de 0,5 mL/min. L'analyse quantitative est effectuée sur la base de courbes d'étalonnage préalablement déterminées pour des solutions aqueuses de glucose, de fructose, de maltose et de sucrose dans la plage de 0,02 à 20 mg/mL.

2-j-les minéraux

a) Réactifs et solution

De l'eau déminéralisée de haute pureté obtenue en faisant passer de l'eau distillée dans un système de purification d'eau (déminéralisateur HLP 20, Hydrolab, Pologne) est utilisée pour préparer les solutions. Les solutions standard certifiées à un seul élément (1000 mg/L) utilisées pour préparer la courbe d'étalonnage sont de la plus haute pureté (99,999%) et sont fournies par Ultra Scientific (North Kingstown, RI, États-Unis). Les autres réactifs sont de qualité analytique sauf indication contraire. Les échantillons de miel sont digérés avec de l'acide nitrique de qualité suprapur® (HNO_3 65% p/p, Merck, Allemagne). Un test de récupération est effectué à l'aide de solutions à un seul élément et de deux matériaux de référence, à savoir les matériaux de référence standard (SRM) Feuilles de tomate et aiguilles de pin (*Pinus taeda*) (SRM 1573a et SRM 1575a, respectivement, NIST National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, États-Unis).

b) Instrumentation

L'analyse élémentaire est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse quadripolaire couplé à un plasma inductif 820-MS (ICP-MS; Varian, Mulgrave, Australie) équipé d'un échantillonneur automatique SPS3 (Varian, Australie) et d'un type de nébuliseur MicroMist (Varian). Un système de minéralisation par micro-ondes MARS Express (CEM, Matthews NC, États-Unis) de récipients de réaction en téflon est utilisé dans les procédures de digestion. Les récipients de réaction sont nettoyés en utilisant 10 mL d'acide nitrique concentré avant chaque digestion.

Les déterminations multi-élémentaires sont également déterminées par la méthode de spectroscopie d'absorption atomique (AAS) à l'aide d'un spectromètre SpectrAA 280 FS avec échantillonneur automatique SPS3 (Varian, Australie), qui est équipé d'une lampe au deutérium, d'une lampe à cathode creuse pour chaque élément et d'un brûleur air-acétylène. Des résultats appropriés en termes de précision et de sensibilité, de faible coût et de rapidité font de l'AAS une procédure appropriée pour déterminer les concentrations d'éléments alcalins et alcalino-terreux dans les échantillons de miel étudiés. Les tableaux 27 et 28 montrent les paramètres instrumentaux pour ICP-MS et AAS, respectivement.

Tableau 27: Conditions de fonctionnement ICP-MS.

Puissance de fréquence radio (W)	1370
Débit de gaz plasma (L/min)	18
Débit de gaz auxiliaire (L/min)	1,70
Chambre de nébulisation T (°C)	2
Flux de gaz nébuliseur (L/min)	1
Nombre de répétitions	3

Tableau 28: Conditions de fonctionnement de l'AAS.

Éléments	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Débit de carburant (L/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Courant de la lampe (mA)	-	4	-	10	5	5	4	5
Longueur d'onde (nm)	589,0	202,6	766,5	422,7	279,5	248,3	324,8	213,9
Largeur de la fente (nm)	0,2	1,0	0,2	0,5	0,2	0,2	0,5	1,0
Débit d'air (L/min)	10	10	10	10	10	10	10	10

c) Déterminations analytiques

Les déterminations des éléments traces et des métaux lourds sont effectuées par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) et par la spectroscopie d'absorption atomique (AAS) en utilisant les conditions de fonctionnement et les longueurs d'onde d'émission répertoriées dans les tableaux 27 et 28. Le verre et le matériau plastique sont nettoyés et conservés dans une solution d'acide nitrique à 10% (v/v) pendant au moins deux jours. Le matériau est ensuite rincé trois fois avec de l'eau déminéralisée de haute pureté avant d'être utilisé.

Environ 0,5 g de chaque échantillon de miel est digéré avec 10 mL de HNO₃ à 65% (v/v) dans des récipients en téflon. Les récipients scellés sont placés dans le minéralisateur à micro-ondes MARS Express (CEM, États-Unis). Un essai à blanc est réalisé de la même manière. La minéralisation par micro-ondes est réalisée par étapes à 400 W et 363 K, à 800 W et 393 K, à 1600 W et 483 K. La solution de digestion refroidie est ensuite diluée à 50 mL avec de l'eau déminéralisée de haute pureté. Cette solution est finalement utilisée pour la détermination de V, Cr, Co, As, Ru, Rh, Cd, W, Pt, Au et Pb des échantillons de miel, réalisée avec un ICP-MS équipé d'un nébuliseur concentrique, d'une torche à quartz avec tube injecteur en quartz et chambre de nébulisation cyclonique (Tableau 27). La concentration en ions K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe et Zn est déterminée par la méthode AAS à l'aide d'un spectromètre SpectrAA 280 FS avec échantillonneur automatique SPS3 (Tableau 28). Afin d'éviter l'ionisation de l'échantillon lors de l'analyse du potassium, une solution tampon de Schinkel (contenu du mélange 10 g/L de chlorure de césium et 100 g/L de chlorure de lanthane) est utilisée. Chaque échantillon est mesuré en triplicatas par détection AAS et ICP-MS.

d) Contrôle de qualité

La qualité analytique est contrôlée au moyen de matériaux de référence certifiés : NIST-1573a feuilles de tomates et NIST-1575a aiguilles de pin. Les matériaux de référence certifiés sont préparés selon les instructions du fabricant. Les échantillons de miel et les échantillons de contrôle qualité (échantillons en aveugle et matériaux de référence certifiés) sont analysés en triplicatas et la moyenne est donnée comme résultat final. Le tableau 4 (cf. chapitre II) présente les paramètres de validation obtenus lors de l'analyse. Pour Au, Pt, Rh, Ru et W, le paramètre de récupération est obtenu à partir de la fortification en utilisant des solutions standard certifiées à un seul élément.

e) Méthode statistique

L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) sont réalisées avec le logiciel XLStat 2014.5.03 pour Microsoft Excel (Addinsoft, Bordeaux, France) afin de classer et discriminer les échantillons de miel.

IV-3-Propriétés biochimiques

A) Activité antioxydante

a) Réactifs et étalons

Tous les produits chimiques et les réactifs sont d'un degré de pureté analytique. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), le β -carotène et le réactif de Folin-Ciocalteu sont fournis par Sigma-Aldrich® (Darmstadt, Allemagne). Étalons utilisés pour les dosages d'antioxydants : l'acide gallique, l'acide L-ascorbique, la quercétine, l'hydroxytoluène butylé (BHT) et le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) sont achetés auprès de Sigma-Aldrich® (Darmstadt, Allemagne).

b) Quantification des composés bioactifs

-Dosage des polyphénols totaux

La quantification de la Teneur en Composés Phénoliques (TCP) est réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu en milieu alcalin (Singleton et coll., 1999). 0,1 mL de solution méthanolique de miel (0,2 g/mL) est ajouté à 500 μ L du réactif de Folin-Ciocalteu après dilution dix fois dans de l'eau distillée et 400 μ L d'une solution de Na_2CO_3 à 7%. Après incubation pendant 40 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à des longueurs d'onde de 760 nm opposé à un blanc de méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZENTM POP). Des solutions méthanoliques d'acide gallique à diverses concentrations (0-1000 mg/L) sont utilisées comme étalon pour établir la courbe d'étalonnage. Les résultats sont indiqués en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) pour 100 grammes de miel (mg EAG/100g de miel).

-Dosage des flavonoïdes totaux

La Teneur Totale en Flavonoïdes (TTF) est estimée à l'aide de la méthode colorimétrique utilisant le chlorure d'aluminium (Brighente et coll., 2007). 1 mL de solution de miel dans du méthanol (1 mg/mL) est mélangé avec 1 mL d'une solution d' AlCl_3 à 2 % dans du méthanol. Après incubation pendant 40 minutes à température ambiante, l'absorbance du produit jaune résultant est mesurée à la longueur d'onde 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZENTM POP). Les concentrations en flavonoïdes sont déduites de la courbe d'étalonnage construite avec la quercétine, à différentes concentrations (20, 40, 60, 80 et 100

mg/L), comme étalon. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents quercétine (EQ) pour 100 grammes de miel (mg EQ/100g de miel).

c) Méthodes employées

- Test de piégeage du radical libre DPPH

Le potentiel de piégeage des radicaux des échantillons de miel est évalué à l'aide du test DPPH, comme décrit par Sánchez-Moreno et coll. (1998). La concentration des solutions de miel varie entre 10 et 50 mg/mL. 1 mL de chaque solution de miel est mélangé avec 1 mL de solution méthanolique de DPPH à 0,006 g/50 mL et maintenu dans l'obscurité à température ambiante sous agitation vigoureuse pendant 60 minutes. Ensuite, l'absorbance du DPPH résiduel est mesurée à la longueur d'onde 517 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZENTM POP) opposé à un blanc ne contenant que du méthanol. L'acide L-ascorbique pur à des concentrations allant de 0,002 à 0,01 mg/mL est utilisé comme contrôle positif. Le potentiel de piégeage des radicaux est estimé en pourcentage de DPPH réduit à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ DPPH réduit} = \frac{Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{\text{contrôle}}} \times 100$$

où $Abs_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle, et $Abs_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de la solution d'échantillon de miel.

Les valeurs de la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) sont calculées graphiquement en traçant la variation des pourcentages de réduction en fonction des concentrations de miel.

- Test de la réduction du fer FRAP

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) de l'échantillon de miel est quantifié en utilisant la méthode décrite par Karagözler et coll. (2008). 1 mL de miel dilué dans de l'eau distillée (10 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M à pH 6,6) et 2,5 mL de solution aqueuse à 1% de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$]. Le mélange réactionnel est ensuite incubé à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement du mélange à température ambiante, 2,5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés et l'ensemble est ensuite centrifugé à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Par la suite, un mélange de 2,5 mL du surnageant, 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution de $FeCl_3$ à 0,1% est préparé, et l'absorbance est lue à la longueur d'onde 700 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (OPTIZENTM POP) après incubation pendant 10 minutes opposé à un blanc (eau distillée). L'acide L-ascorbique est utilisé pour la courbe d'étalonnage, et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique pour 100 g de miel (mg EAA/100g).

- Test de l'activité antiradicalaire de l'ABTS

La réduction radicalaire de l'ABTS des échantillons de miel est réalisée selon la méthode décrite par Bueno-Costa et coll. (2016). 7,0 mM de solution aqueuse d'ABTS sont mélangés avec 2,45 mM de persulfate de potassium en volume égal. La solution est incubée à température ambiante dans l'obscurité pendant 16 heures puis diluée dans de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une absorbance finale égale à $0,70 \pm 0,02$ à la longueur d'onde 734 nm (spectrophotomètre UV-Visible OPTIZENTM POP). 80 μL d'échantillon de miel dilué sont mélangés avec 1 mL d'une solution d'ABTS⁺ et l'absorbance est mesurée à 734 nm. Le pourcentage de réduction du radical cation ABTS⁺ est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ ABTS réduit} = \frac{Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}}{Abs_{\text{contrôle}}} \times 100$$

où $Abs_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle, et $Abs_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de la solution d'échantillon de miel.

Les solutions standard de Trolox (0,002, 0,004, 0,006, 0,008 et 0,01 mg/mL) sont utilisées comme contrôle positif et l' CI_{50} est déterminée graphiquement, en utilisant une courbe d'étalonnage en traçant les concentrations des échantillons de miel en fonction de l'effet de réduction correspondant (% ABTS réduit).

- Test d'émulsion d'acide β -carotène-linoléique

Le test de blanchiment du β -carotène est réalisé en utilisant la procédure de la littérature (Silva et coll., 2013). 2 mg de β -carotène sont dissous dans 10 mL de chloroforme. 2 mL de cette solution sont pipetés dans un petit flacon contenant 20 mg d'acide linoléique et 200 mg d'émulsifiant Tween 40. Ensuite, le chloroforme est évaporé sous vide à 40°C, et 50 mL de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés et agités vigoureusement pour donner une émulsion fraîche. 1 mL de l'émulsion est transféré dans des tubes à essai contenant 100 μL d'échantillons de miel dilués à différentes concentrations (10, 20, 30, 40 et 50 mg/mL), et leur absorbance est mesurée à la longueur d'onde 470 nm (spectrophotomètre UV-Visible OPTIZENTM POP) immédiatement ($t = 0$ min) et après 120 minutes d'incubation au bain-marie à 50°C opposé à un blanc (émulsion sans β -carotène).

L'activité antioxydante des échantillons de miel est comparée au BHT, utilisé comme témoin positif. Le blanchiment du β -carotène est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de blanchiment } \beta - \text{ carotene} = \ln \left(\frac{A_0}{A_t} \right) \times 1/t,$$

où A_0 est l'absorbance initiale de l'émulsion au temps 0 ;

A_t est l'absorbance au temps t exprimé en minutes.

Le pourcentage moyen d'inhibition du blanchiment du β -carotène est estimé à l'aide de l'équation :

$$[(R_{\text{contrôle}}/R_{\text{échantillon}})/R_{\text{contrôle}}] \times 100$$

où $R_{\text{contrôle}}$ est le taux de blanchiment de l'émulsion de β -carotène sans antioxydant et $R_{\text{échantillon}}$ est le taux de blanchiment de l'émulsion de β -carotène avec un échantillon de miel.

L' CI_{50} est calculée à l'aide d'une courbe standard entre les concentrations de miels et le pourcentage moyen d'inhibition du blanchiment du β -carotène.

B) Activité antimicrobienne

a) Réactifs et solutions

Les milieux de gélose Mueller-Hinton (MHA) et de bouillon Mueller-Hinton (MHB) sont obtenus auprès de Conda Pronadisa (Madrid, Espagne) et la gélose Sabouraud Dextrose (SDA) est fournie par Liofilchem®, Italie. Les tampons et les solutions mères sont préparées avec de l'eau Milli-Q désionisée de haute pureté.

b) Préparation des solutions de miels

Pour les évaluations antimicrobiennes, deux dilutions sont préparées ; 5 g de chaque miel sont dissous dans 10 mL ou dans 6,25 mL d'eau distillée stérile pour obtenir des concentrations à 50% et 80% (p/v), respectivement. Pour les autres dilutions requises, les quantités de miel et d'eau sont calculées à l'aide de la formule suivante : $C_1V_1 = C_2V_2$.

c) Souches microbiennes et conditions de culture

Six souches de référence sont utilisées dans ce travail. Ces souches sont obtenues gracieusement de l'Institut Pasteur Algérien : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline (MSSA) ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 26709 et *Candida albicans* IPP444. Les cultures de routine sont réalisées en aérobiose pendant 24 heures sur gélose Muller-Hinton (MHA) pour les bactéries et sur bouillon Sabouraud Dextrose (SDA) pour les *Candida*. Des inoculums standardisés sont préparés dans une solution saline 0,85% et les densités sont ajustées à 10^8 Unités Formatrices de Colonie (UFC)/mL.

d) Essai de diffusion en milieu gélosé

Afin d'explorer l'activité antimicrobienne de chaque miel, un test de diffusion en milieu gélosé (diffusion en puits) est effectué selon la méthode décrite par Ghramh et coll. (2018) avec quelques modifications. Par conséquent, les MHA ou SDA stérilisés sont tamponnés avec des inoculums standardisés de bactéries ou de levures. Ensuite, des puits (5 mm de diamètre) sont creusés à l'aide d'une extrémité stérile de pipette Pasteur et remplis avec 100 μ L de chaque miel dilué ou eau distillée (comme contrôle négatif). Toutes les plaques sont incubées pendant 24

heures à 37°C. Après incubation, les diamètres de la zone d'inhibition (DZI) autour de chaque puits sont mesurés (mm) (Figure 10). Les échantillons de miel actifs sont classés comme suit : activité élevée, DZI > 15 mm ; activité modérée, DZI de 12 à 15 mm ; faible activité, DZI de 9 à 12 mm ; très faible activité, DZI de 5,5 à 9 mm ; tandis que miel inactif, DZI < 5,5 mm (Küçük et coll., 2007). En parallèle, la gentamicine (10 µg) et l'amphotéricine B (10 UI) sont testées contre des souches microbiennes telles que décrites par l'Institut des Normes Cliniques et de Laboratoire (CLSI, 2016).



Figure 10: Méthode de diffusion sur gélose.

(Source Bereksi Reguig D.)

e) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Sur la base des résultats du test de diffusion en milieu gélosé, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est réalisée dans des tubes à essai stériles selon la procédure décrite par Ghramh et coll. (2018) avec quelques modifications. Pour cela, sept concentrations différentes [5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% et 100% (v/v%)] de miels sont préparées dans 2 mL de bouillon Muller-Hinton (MHB) en tant que volume d'essai final. Ensuite, les concentrations de chaque miel sont inoculées avec 20 µL d'inoculum microbien (10^8 UFC/mL). Cependant, le contrôle négatif n'a reçu que 2 mL de MHB. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la CMI est déterminée comme la faible concentration de miel pour laquelle aucune croissance n'est observée visuellement dans le tube (Figure 11).

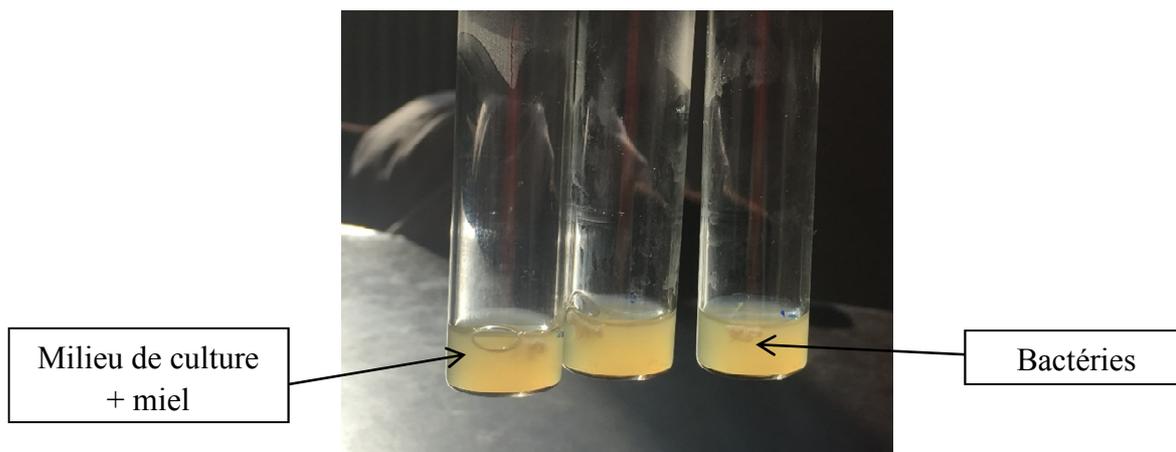


Figure 11: Détermination de la CMI milieu liquide.

(Source Bereksi Reguig D.)

La concentration minimale bactéricide (CMB) est évaluée à partir des tubes incubés ne contenant aucune croissance visible dans la CMI. 10 μL de chaque tube sont étalés sur du MHA et incubés en aérobiose pendant 24 heures à 37°C. La faible concentration sans croissance montrée sur les plaques MHA est enregistrée comme CMB.

C) Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide de SPSS (SPSS 22.0). Tous les tests sont réalisés en triplicatas, et des analyses descriptives (moyennes \pm Écart-type) sont exprimées. Des différences significatives sont calculées par ANOVA 1 pour chaque échantillon. Le test de Duncan est utilisé pour comparer les moyennes et appliqué au niveau ($p = 0,05$). Afin de regrouper les échantillons de miel avec une similarité relative des propriétés déterminées, des méthodes de classification ascendante hiérarchique sont réalisées. De plus, une analyse de corrélation de Pearson est utilisée pour déterminer la relation entre les méthodes antioxydantes et les paramètres physicochimiques.

D) Activité antidiabétique

a) Animal

Un total de 48 rats mâles consanguins de souche Wistar pesant 220 ± 20 g sont obtenus auprès de l'Unité de Production d'Animaux du Laboratoire de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), Dely-Brahim, Alger, Algérie. Les rats sont acclimatés pendant une semaine dans des conditions de laboratoire standard au Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen (Algérie), avant utilisation. Les animaux sont répartis en douze groupes (N = 4 dans chaque groupe) et logés dans des cages en polyéthylène avec libre accès à l'aliment standard, acheté chez l'Agence nationale de l'alimentation du bétail (Algérie), et à l'eau du

robinet à volonté. La température ambiante est fixée à $25\pm 1^\circ\text{C}$ et les animaux sont soumis à un cycle lumière/obscurité 12/12 heures. L'entretien et les soins des animaux de laboratoire sont conformes aux lignes directrices nationales sur les soins aux animaux et aux principes internationalement reconnus pour l'utilisation et les soins des animaux de laboratoire.

b) Induction du diabète

Vingt-quatre rats Wistar sont soumis au jeun pendant 18 heures. Ensuite, le diabète est induit par administration intrapéritonéale (ip) de streptozotocine fraîchement préparée (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, États-Unis) dissoute dans un tampon citrate 0,1 M (pH 4,5) (Erejuwa et coll., 2011 ; Chikhi et coll., 2014). Trois jours après l'injection de STZ (50 mg/kg de poids corporel) (Karan et coll., 2013), le développement du diabète est confirmé en surveillant la concentration de glucose dans des échantillons de sang à jeun prélevés dans la veine cave caudale à l'aide du glucomètre Diagno-CheckTM Smart (Néomedic, Constantine, Algérie). Les rats dont la glycémie est supérieure à 220 mg/dL sont considérés comme diabétiques et sont utilisés dans l'expérience (Mishra et coll., 2013). Les concentrations de glucose sanguin des rats témoins sont restées normales < 100 mg/dL.

c) Miel

Le miel multifloral est récolté en juillet 2017 directement chez les apiculteurs à Sidi Djillali ($34^\circ 28' 00''$ N $1^\circ 35' 00''$ O, Altitude : 1425 m) situé dans la province de Tlemcen (Algérie). Le miel collecté est stocké dans l'obscurité à $+ 4^\circ\text{C}$ jusqu'à son utilisation.

Les propriétés physicochimiques du miel sont mesurées selon les méthodes harmonisées de la Commission internationale du miel (Bogdanov et coll., 1999). La couleur est ambrée pour l'échantillon de miel multifloral (S4) (cf. Tableau 1) étudié avec les coordonnées CIELab [L^* ($40,50\pm 1,12$), a^* ($6,79\pm 0,42$), b^* ($5,93\pm 0,31$), C_{ab}^* ($9,01\pm 0,52$) et h_{ab}° ($41,15\pm 0,27$)] (cf. Tableau 8). Les valeurs de ses différents paramètres physicochimiques sont : l'humidité ($17,43\pm 0,15\%$), pH ($4,85\pm 0,18$), l'acidité libre ($28,33\pm 1,52$ méq/Kg), la conductivité électrique ($0,27\pm 0,01$ mS/cm), l'HMF ($25,70\pm 1,06$ mg/Kg), la proline ($587,93\pm 0,73$ mg/Kg), le pouvoir rotatoire ($(-)$ $9,92\pm 0,06^\circ$) (cf. Tableau 2), le fructose ($43,53\pm 0,14\%$), le glucose ($22,07\pm 0,17\%$), la somme (maltose + sucrose) ($7,75\pm 0,22\%$), ratio fructose/glucose (F/G) ($1,97\pm 0,02$), ratio glucose/eau (G/Eau) ($1,27\pm 0,01$), les sucres totaux ($73,35\pm 0,26\%$) (cf. Tableau 7), les TCP ($82,49\pm 2,06$ mg/g) et les TTF ($26,49\pm 3,04$ mg/g) (cf. Tableau 9). Ces paramètres sont dans les limites des normes.

d) Préparation de la metformine, de la sitagliptine et du miel naturel

La metformine (Novoformine® 500 mg, ALDAPH SPA, Tizi-Ouzou, Algérie) et la sitagliptine (Dalvex® 100 mg, PHYSIOPHARM®, Constantine, Algérie) sont dissoutes dans de l'eau distillée et administrées à la dose de 80 mg/kg p.c. et 20 mg /kg p.c., respectivement (Cheng et coll., 2006; Forest et coll., 2014). Le miel est dilué en ajoutant de l'eau distillée peu de temps avant d'être administré à la dose de 50 mg/kg p.c./jour. Chaque animal reçoit une solution de miel à un volume de 10 mL/kg p.c. une fois par jour.

e) Conception expérimentale

Les rats sont divisés en 12 groupes expérimentaux égaux (N = 4 dans chaque groupe) :

Groupe A : Rats normaux non traités ;

Groupe B : Rats normaux traités au miel ;

Groupe C : Rats normaux traités avec du miel et de la metformine ;

Groupe D : Rats normaux traités au miel et à la sitagliptine ;

Groupe E : Rats normaux traités à la sitagliptine ;

Groupe F : Rats normaux traités à la metformine ;

Groupe A' (témoin normal) : Rats diabétiques non traités ;

Groupe B' : Rats diabétiques traités au miel ;

Groupe C' : Rats diabétiques traités avec du miel et de la metformine ;

Groupe D' : Rats diabétiques traités avec du miel et de la sitagliptine ;

Groupe E' : Rats diabétiques traités avec la sitagliptine ;

Groupe F' : Rats diabétiques traités à la metformine.

Les animaux sont traités par voie orale une fois par jour pendant 4 semaines.

Protocole expérimental :

À la fin de la période expérimentale, les rats sont placés dans une cage métabolique pendant 24 heures pour recueillir des échantillons d'urine afin de détecter le niveau de protéines totales (une chambre d'alimentation située à l'extérieur de la cage contient un tiroir d'alimentation qui coulisse pour faciliter le remplissage). Ce montage empêche l'urine d'être contaminée par les aliments.

f) Analyses biochimiques

Le glucose sérique est déterminé par la méthode de la glucose oxydase comme décrit par Barham et Trinder (1972). Le cholestérol total (CT) et les triglycérides (TG) sont estimés par les méthodes de Siedel et coll. (1983) et Foster et Dunn (1973), respectivement. L'urée sérique est estimée à l'aide de kits de diagnostic basés sur les méthodes de Thomas (1998). Les taux de protéines totales sont déterminés à l'aide du test de Lowry (1951).

g-Préparation de coupes histopathologiques de tissus hépatiques

Les animaux sont instantanément disséqués (Figure 12) pour obtenir le foie de chaque animal et rincés avec une solution saline isotonique (0,9 % de NaCl) pour éliminer l'excès de sang, nettoyés, fixés au formol à 10% pendant 1 jour, déshydratés, nettoyés, puis inclus dans de la paraffine. Les blocs de tissus hépatiques obtenus sont sectionnés au microtome à une épaisseur de 5 μm . Après cela, toutes les sections sont placées sur des lames de verre parfaitement propres. Régulièrement, les coupes sont déparaffinées, réhydratées et finalement colorées avec des colorants hématoxyline et éosine. Les sections préparées sont étudiées et photographiées avec un système de microscope à caméra (Leica AUTOSTAINER XL) fourni avec un logiciel d'imagerie (Cell Sense, version 1.4.1). Les tissus hépatiques du groupe diabétique sont étudiés par rapport au groupe témoin normal et les autres groupes pour trouver et évaluer les altérations histologiques.



Figure 12 : Dissection des rats.

h-Analyses statistiques

L'analyse statistique est effectuée à l'aide de SPSS 12.0.1. Les données sont exprimées en moyenne \pm Erreur-type (SEM). Les groupes sont comparés par le test H de Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney pour identifier la signification de la différence entre les deux groupes, coefficient de corrélation de Pearson. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Conclusion Générale & Perspectives

Conclusion générale

Le miel considéré comme une matière noble, nécessite une vigilance sur son authenticité et son originalité afin de préserver la production nationale en évitant toutes sortes de fraudes. Sur la base de multiples recherches effectuées sur la base de données PubMed en utilisant différents mots clés, il convient de noter que le nombre d'études sur les propriétés physicochimiques du miel algérien, en particulier sur la région de l'ouest, est très rare.

Dans ce contexte, notre étude a porté sur 37 échantillons de miel, tous collectés dans différents endroits de l'ouest algérien, et pour lesquels un certain nombre d'analyses physicochimiques a été effectué, notamment l'humidité, le pH et l'acidité libre, le HMF, la conductivité électrique, les sucres, la proline, le pouvoir rotatoire, la couleur et les teneurs en oligo-éléments et en métaux lourds. En outre, les teneurs en composés polyphénoliques et en flavonoïdes totaux ainsi que les propriétés biologiques de ces miels, particulièrement les activités antioxydante, antimicrobienne et antidiabétique, ont été évaluées.

Les résultats obtenus pour le taux d'humidité des miels analysés sont très satisfaisants. En effet, ils varient entre $14,67 \pm 0,11$ et $20,87 \pm 0,61\%$ et sont de ce fait conformes à la valeur fixée par la commission internationale des miels ($\geq 20\%$). Ils sont donc moins susceptibles de fermenter.

De plus la mesure de la conductivité électrique varie de $0,16 \pm 0,00$ à $1,18 \pm 0,02$ mS/cm, ce qui rend possible la différenciation entre les miels de nectar et les miels de miellat. Les valeurs obtenues montrent que les miels multif floraux S13, S19 et S20, avec des conductivités électriques $> 0,8$ (mS/cm), étaient des miels de miellat, tandis que tous les autres échantillons seraient dans la classe des miels de nectar.

En revanche le pouvoir rotatoire de tous les échantillons de miel est négatif, indiquant qu'ils sont lévogyres, ce qui montre qu'il s'agit de miels de nectar. Cette constatation est en contradiction avec le résultat de la conductivité électrique pour les trois miels multif floraux. Cela pourrait s'expliquer par l'origine géochimique différente de ces miels.

Par ailleurs, les valeurs de pH enregistrés sont comprises entre $3,47 \pm 0,15$ et $5,60 \pm 0,04$. Ces résultats suggèrent qu'il s'agit des miels de nectar et des miels de miellats ou un mélange des deux.

D'autre part l'acidité libre notée pour ces miels oscille de $8,00 \pm 1,00$ à $40,33 \pm 2,52$ méq/Kg, s'accordant ainsi avec la limite fixée par les normes du *Codex Alimentarius* (50 méq/Kg).

.....

Cependant les résultats de HMF obtenus notent quelques écarts, notamment pour le miel S16 où le taux de HMF atteignait jusqu'à $49,43 \pm 0,72$ mg/Kg de même pour les miels S5 ($47,43 \pm 2,22$ mg/Kg), S35 ($45,36 \pm 1,43$ mg/Kg), S37 ($40,64 \pm 0,63$ mg/Kg) et S12 ($40,62 \pm 4,41$ mg/Kg). Cette observation dénote une perte de qualité à cause d'une mauvaise conservation chez l'apiculteur, un surchauffage ou à la vieillesse du miel. Ce qui n'est pas le cas pour les autres miels qui présentaient des taux en HMF conformes à la limite fixée par le *Codex Alimentarius* (40mg/Kg).

En outre, le contenu en proline varie entre $265,95 \pm 1,28$ (S5) et $1200,66 \pm 1,92$ mg/kg (S29). Toutes les valeurs sont supérieures à la limite fixée par le comité international du miel ce qui affirme l'état de maturité et l'absence de falsification des sucres des miels étudiés.

L'analyse de la couleur donne les valeurs de L^* , a^* , b^* , C_{ab}^* et h_{ab}° des échantillons de miel comme suit : $34,18 \pm 0,20$ - $60,02 \pm 2,47$; $(-0,57) \pm 0,07$ - $10,24 \pm 0,05$; $(-0,57) \pm 0,04$ - $13,90 \pm 0,38$; $0,81 \pm 0,06$ - $14,21 \pm 2,75$ et $35,45 \pm 1,29$ - $225,09 \pm 3,71$, respectivement. D'après les résultats de l'analyse de la couleur, les miels étudiés sont de couleur ambre foncé, à l'exception des miels S7, S8, S13, S17, S18 et S35 qui ont affiché une valeur $L^* > 50$. En général, les miels de couleur foncée sont plus riches en pigments, en composés phénoliques, en pollen et en minéraux.

Concernant les sucres, il est à noter que tous les miels montrent un taux de fructose élevé par rapport à celui du glucose, sauf pour les miels S5, S22 et S37. Ces résultats révèlent que la possibilité de l'ajout du sucre dans l'alimentation de l'abeille est négligeable ainsi toute éventualité de fraude est éliminée.

L'étude chimique fournit une image détaillée de la teneur en oligo-éléments et en métaux lourds des miels naturels de l'ouest de l'Algérie, à travers l'analyse de 19 éléments dans 37 types de miels monofloraux (à savoir la lavande, le romarin, la moutarde blanche douce, le thym, le chardon-Marie, le caroubier, l'oranger, l'euphorbe, l'eucalyptus, le camphre, le jujubier, la sauge et le harmal), et miels multifloraux.

Les oligo-éléments et les métaux lourds sont analysés et mesurés par les méthodes ICP-MS et AAS. En résumé, K est l'élément le plus abondant. Le potassium, le Ca, le Mg et le Na représentent 97,92 % du total des minéraux présents dans les miels étudiés ; cette teneur justifie la couleur ambre foncé des miels, confirmée par l'usage du système d'espace de couleur le CIELab.

Le miel d'eucalyptus contient les niveaux les plus élevés de K et de Na. Le miel de sauge était riche en Ca tandis que le miel de chardon-Marie contenait le taux le plus élevé de Mg. De plus, le miel de lavande renferme des valeurs élevées de Fe alors que le caroubier est le plus riche en Zn. Le miel de moutarde blanche douce contenait le niveau le plus élevé de Mn, tandis que les miels de jujubier et de caroubier contenaient du Cu à des concentrations élevées.

Des métaux lourds et métalloïdes potentiellement toxiques tels que Pb, V, Cr, W, As, Co et Cd ont été détectés à des concentrations < 1 mg/kg. De plus, Ru, Rh, Pt et Au sont totalement absents dans tous les miels. L'utilisation des méthodes statistiques multivariées CAH et ACP montre que les teneurs en minéraux peuvent représenter une force discriminante majeure basée sur l'origine botanique des échantillons de miel.

Au vu de tous ces résultats, les miels de l'ouest algérien sont des miels de bonne qualité et conformes aux normes exigées par la commission du *Codex Alimentarius*. Aussi, ils ne sont pas contaminés et constituent de ce fait un bon indicateur de l'absence de la pollution de l'environnement par les métaux. De plus, les teneurs en minéraux sont dans des niveaux de sécurité pour la consommation humaine. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que les miels de l'ouest d'Algérie sont riches en minéraux essentiels bénéfiques pour la santé humaine. Les niveaux des éléments traces et de métaux lourds sont inférieurs à la DHTP établie par le JECFA.

Le miel est un nutriment naturel complexe aux propriétés thérapeutiques bien établies et reconnues en médecine traditionnelle. Afin de valoriser les miels d'Algérie, un autre volet de cette étude est abordé. Il s'agit notamment de la comparaison *in vitro* des composés bioactifs, des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des échantillons de miel et de l'identification du meilleur échantillon à des fins thérapeutiques potentielles.

L'estimation des composés bioactifs a été réalisée par la détermination des TCP et des TTF. Une grande variabilité parmi les échantillons montre concernant les TCP ($24,17 \pm 1,38$ - $122,15 \pm 3,55$ mg EAG/100g de miel) et les TTF ($0,07 \pm 0,01$ - $33,49 \pm 4,90$ mg EQ/100g de miel).

De plus, l'activité antioxydante, évaluée par quatre dosages spectrophotométriques, affiche des résultats fluctuants entre les échantillons. Des corrélations positives élevées sont observées entre β -carotène/DPPH (0,766) et β -carotène/ABTS (0,600). Alors que des corrélations inverses sont montrées entre les composés bioactifs et l'activité antioxydante, à l'exception de la méthode FRAP.

L'activité antimicrobienne, déterminée par des essais de diffusion de puits, montre une manière antibactérienne dose-dépendante avec une inhibition intéressante envers les souches de référence *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à la méthicilline. Cependant, aucune activité n'est montrée envers toutes les souches de *Candida albicans*. Les valeurs des CMI et des CMB sont identiques dans la plupart des échantillons (plage : 60 à 80 % p/v) et présentent principalement un effet bactéricide. La teneur en composés bioactifs joue un rôle important dans la propriété antibactérienne. En outre, le meilleur échantillon de miel à des fins thérapeutiques potentielles correspond à la moutarde blanche douce (S6) et pourrait être utilisé comme alternative dans une application thérapeutique.

Le diabète sucré est associé à une détérioration du contrôle glycémique et à des déséquilibres métaboliques progressifs. Le but de ce dernier volet de cette étude est d'examiner l'effet du miel combiné avec la sitagliptine ou la metformine sur le contrôle glycémique chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine. Les rats diabétiques sont randomisés en six groupes et reçoivent de l'eau, du miel, de la sitagliptine, de la metformine et du miel avec de la metformine ou de la sitagliptine. Les animaux sont traités par voie orale une fois par jour pendant quatre semaines. Les rats témoins normaux montrent une normoglycémie ($0,93 \pm 0,04$ g/L - $1,03 \pm 0,05$ g/L, respectivement pour chaque traitement) et une hyperglycémie avec les groupes de diabétiques ($4,43 \pm 0,46$ g/L - $4,68 \pm 0,81$ g/L, respectivement avec chaque traitement). La glycémie diminue significativement en B', C' et F' après 3 semaines de traitement et en C' et E' après 4 semaines de traitement ($p < 0,05$).

Cependant, la prise de poids, dans les différents groupes montre que les groupes C', E' et F' (de 6,5, 7 et 5,5g/semaines, respectivement), donne un meilleur gain par rapport aux autres groupes de rats diabétiques ; dans les lots de rats non diabétiques, on note une diminution significative dans les groupes D et E par rapport aux autres groupes. La sitagliptine ou la metformine combinées au miel réduisent également de manière significative les niveaux élevés d'urée dans les groupes C' et E' chez le rat diabétique par rapport au rat normoglycémique ; les triglycérides augmentent significativement chez les rats diabétiques par rapport aux rats normoglycémiques, les niveaux de cholestérol étant significativement réduits en C' et E' par rapport aux mêmes groupes normaux.

Ces résultats indiquent que la combinaison de la metformine avec du miel améliore le contrôle glycémique et offre des avantages métaboliques supplémentaires, non obtenus avec la metformine seule.

Perspectives

Cette étude nous a apporté beaucoup de connaissances sur les miels de l'ouest algérien, non seulement leurs paramètres physico-chimiques, mais aussi leurs propriétés biologiques. En plus du miel, la ruche et ses abeilles fournissent d'autres produits tout aussi précieux tels que : la gelée royale, le pollen, la propolis, etc. qui ont des pouvoirs thérapeutiques remarquables. Ils feront l'objet d'étude approfondie dans un futur proche.

En plus de l'étude des sous-produits de la ruche suscités, l'étude actuelle pourra être complétée par ce qui suit :

- ✓ Soumettre un nombre plus élevé de miels algériens aux mêmes investigations pour plus de représentativité afin d'établir une carte mellifère nationale.
- ✓ Réaliser le spectre pollinique de chaque miel (% des pollens des différentes espèces). Cette étude méliissopalynologique des miels garantit leur(s) source(s) florale(s), leur origine géographique et intervient éventuellement dans le repérage de la fraude !
- ✓ Labélisation des miels des différents terroirs algériens et la certification de leur qualité, ce qui leur permettront de se positionner sur le marché international.
- ✓ Tester des méthodes plus performantes pour la détection des fraudes.
- ✓ Identification et quantification des polyphénols des miels. Ces micronutriments sont des marqueurs floraux qui permettent de relier les miels à leurs sources.
- ✓ Notre connaissance de la composition en protéines du miel, qui est d'une grande importance médicale et pharmaceutique, est incomplète. Une étude protéomique approfondie des miels permettra l'identification d'un certain nombre de protéines qui sont importantes pour comprendre les propriétés du miel et méritent des recherches pharmaceutiques supplémentaires.

Communications & Publication

Une partie de ce travail a été présentée sous forme de communications dans différents congrès et a fait l'objet d'une publication internationale.

Publication

Dalila BEREKSI-REGUIG, Hocine ALLALI, Salim BOUCHENTOUF, Agnieszka ADAMCZUK, Grażyna KOWALSKA, Radosław KOWALSKI

Analysis of trace-elements and toxic heavy metals in honeys from Tlemcen province, North-Western Algeria, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, **2020**; 85(4):367-374.

ISSN: 1331-7768 (Print)/e-ISSN: 1331-7776 (Online)

Available online at: https://www.researchgate.net/publication/345851383_Analysis_of_trace-elements_and_toxic_heavy_metals_in_honeys_from_Tlemcen_Province_north-western_Algeria

Communication

Dalila BREKSI REGUIG, Hocine ALLALI, Hiba LAKERMI, Waffa BOUALI, Houria MEDJDOUB, Salim BOUCHENTOUF, Sid Ahmed BENAOULA

“Physicochemical properties of honey from the western regions of Algeria”. The First International Conference on Apiculture, Hive Products and Sustainable Development (ICAHPSD), 25-27 November **2018**, Mostaganem, Algeria.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D., Miguel, M. G. (2014). Physicochemical characterization and antioxidant activity of 17 commercial Moroccan honeys. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(4), 449-457.
- Abd-El Aal, A. M., El-Hadidy, M. R., El-Mashad, N. B., El-Sebaie, A. H. (2007). Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 20(2), 83.
- Abdourahman, A., Edwards, J. G. (2008). Chromium supplementation improves glucose tolerance in diabetic Goto-Kakizaki rats. *IUBMB Life*, 60(8), 541-548.
- Abdulkhaliq, A., & Swaileh, K. M. (2017). Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 447-454.
- Abdulrhman, M., El-Hefnawy, M., Hussein, R., El-Goud, A. A. (2011). The glycemic and peak incremental indices of honey, sucrose and glucose in patients with type 1 diabetes mellitus: effects on C-peptide level-a pilot study. *Acta Diabetologica*, 48(2), 89-94
- Abeshu, M. A., Geleta, B. (2016). Medicinal uses of honey. *Biology and Medicine*, 8(2), 1.
- Achour, H., Khalil, M. (2014). Composition physico-chimique des miels algériens : Détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques. *Afrique Science*, 10, 127-136.
- Achouri, I., Aboussaleh, Y., Sbaibi, R., Chemissi, H., Bengueddour, R. (2015). Comparison of the physicochemical quality of honey *Ziziphus* sp (Sider) and *Acacia* sp (Samar) consumed in the United Arab Emirates. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 10(1), 184.
- Adjlane, N., Doumandji, S. E., Haddad, N. (2012). Beekeeping in Algeria: the factors threatening the survival of the honeybee *Apis mellifera intermissa*. *Cahiers Agricultures*, 21(4), 235-241.
- Afrouzan, H., Tahghighi, A., Zakeri, S., Es-Haghi, A. (2018). Chemical composition and antimicrobial activities of Iranian propolis. *Iranian Biomedical Journal*, 22(1), 50.
- Ahmad, S., Campos, M. G., Fratini, F., Altaye, S. Z., Li, J. (2020). New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 382.
- Al-Farsi, M., Al-Amri, A., Al-Hadhrami, A., Al-Belushi, S. (2018). Color, flavonoids, phenolics and antioxidants of Omani honey. *Heliyon*, 4(10), e00874.
- Aljohar, H. I., Maher, H. M., Albaqami, J., Al-Mehaizie, M., Rawan Orfali, Razan Orfali, Alrubia, S. (2018). Physical and chemical screening of honey samples available in the Saudi market: An important aspect in the authentication process and quality assessment. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 932-942.

- Almasi, R., Sekarappa, B. (2019). Analyse du miel unifloral et multifloral pour les propriétés physico-chimiques dans le Karnataka méridional, en Inde. *International Journal of Recent Scientific Research*, 10 (05), 32469-32473.
- Almeida-Muradian, L. B. D. (2013). *Tetragonisca angustula* pot-honey compared to *Apis mellifera* honey from Brazil. In *Pot-honey* (pp. 375-382). Springer, New York, NY.
- Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3079-3086.
- Al-Waili, N. (2003). Intrapulmonary administration of natural honey solution, hyperosmolar dextrose or hypoosmolar distill water to normal individuals and to patients with type-2 diabetes mellitus or hypertension: their effects on blood glucose level, plasma insulin and C-peptide, blood pressure and peaked expiratory flow rate. *European Journal of Medical Research*, 8(7), 295-303.
- Al-Waili, N. S., Salom, K., Butler, G., Al Ghamdi, A. A. (2011). Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *Journal of Medicinal Food*, 14(10), 1079-1096.
- UK Prospective Diabetes Study. (2001). American Diabetes Association clinical practice recommendations 2001. *Diabetes Care*, 24(1), 1-133.
- Amir, Y., Yesli, A., Bengana, M., Sadoudi, R., Amrouche, T. (2010). Physico-chemical and microbiological assessment of honey from Algeria. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(9), 1485-1494.
- Anand, S., Deighton, M., Livanos, G., Morrison, P. D., Pang, E. C., Mantri, N. (2019). Antimicrobial activity of Agastache honey and characterization of its bioactive compounds in comparison with important commercial honeys. *Frontiers in Microbiology*, 10, 263.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, 63(4), 549-562.
- Anilakumar K. R., Krishna K. R. S., Chandramohan G., Khanum F., Bawa A. S. (2007). Bees wax polyphenols as suppressor of CC1-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(4), 361-7. PMID: 18476390.
- Aparna, A. R., Rajalakshmi, D. (1999). Honey-its characteristics, sensory aspects, and Applications. *Food Reviews International*, 15(4), 455-471.
- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(13-14), 1825-1835. PMID: 11215509.
- Asaduzzaman, M., Sohanur Rahman, M., Munira S. et al. (2015). Effects of honey supplementation on hepatic and cardiovascular disease (CVD) marker in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 6(9), 592.
- Augustin, L. S. A., Kendall, C. W. C., Jenkins, D. J. A., Willett, W. C., Astrup, A., Barclay, A. W., ... Poli, A. (2015). Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 25(9), 795-815.

Ávila, S., Hornung, P. S., Teixeira, G. L., Malunga, L. N., Apea-Bah, F. B., Beux, M. R., Ribani, R. H. (2019). Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. *Food Research International*, 123, 1-10.

Awofolu, O. R. (2004). Determination of vanadium in foods by atomic absorption spectrometry. *AJST*, 5(1).

B

Ball, D. W. (2007). The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education* 84(10), 1643.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.

Bandeira, A. M. P., Gomes, V. V., Vasconcelos, A. A., Taube, P. S., Barros, E. C. D., Costa, S. C., Rocha, J. B. T. (2018). Antioxidant activity and physicochemical characteristics of honeys from the eastern Amazon region, Brazil. *Acta Amazonica*, 48(2), 158-167.

Bantle, J. P. (2009). Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *The Journal of Nutrition*, 139(6), 1263S–1268S.

Bargańska, Ż., Ślebioda, M., Namieśnik, J. (2015). Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(3), 235-248.

Barham, D., Trinder, P. (1972). An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, 97(1151), 142-145.

Barr, E. L., Zimmet, P. Z., Welborn, T. A., Jolley, D., Magliano, D. J., Dunstan, D. W., Shaw, J. E. (2007). Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation*, 116(2), 151-157.

Bartha, S., Taut, I., Goji, G., Vlad, I. A., & Dinulică, F. (2020). Heavy metal content in polyfloralhoney and potential health risk. A case study of Copșa Mică, Romania. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5), 1507.

Baudin, B. (2021). Oligoéléments cofacteurs enzymatiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 533, 18–24.

Bayram, N. E., Kara, H. H., Can, A. M., Bozkurt, F., Akman, P. K., Vardar, S. U., Dertli, E. (2020). Characterization of physicochemical and antioxidant properties of Bayburt honey from the North-east part of Turkey. *Journal of Apicultural Research*, 1–11.

Behrouj, H., Ziamajidi, N., Abbasalipourkabir, R., Goodarzi, M. T., & Saidijam, M. (2018). Hypoglycemic and antioxidant effects of oral administration of garlic extract in the livers of type 1 diabetic rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30(2), 245-250.

Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa, G., Adgaba, N., Melaku, S. (2013). Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*, 141(4), 3386-3392.

- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). Sugars, sugar alcohols and honey, in Food chemistry. (Springer, Berlin, 2009)
- Bella, G. D., Licata, P., Potorti, A. G., Crupi, R., Nava, V., Qada, B., Turco, V. L. (2020). Mineral content and physico-chemical parameters of honey from North regions of Algeria. *Natural Product Research*, 1-8.
- Benaziza-Bouchema, D., Schweitzer, P. Caractérisation des principaux miels des régions du Nord de l'Algérie. *Cahier d'Agriculture*, 2010, 19(6), 432-8.
- Bendjedid, H., Achou, M. (2014). Etude de la diversité morphométrique de deux populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) du sud Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 28, 84-95.
- Bereksi-Reguig, D., Allali, H., Bouchentouf, S., Adamczuk, A., Kowalska, G., Kowalski, R. (2020). Analysis of trace-elements and toxic heavy metals in honeys from Tlemcen Province, north-western Algeria. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 85, 367-374.
- Beretta, J., Giangiacomo, G., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- Berghaus, L. J., Giguère, S., Guldbech, K., et al. (2015). Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (2015), pp. 314-318.
- Berkani, M.L. (2007). Etude des paramètres de développement de l'Apiculture Algérienne. Thèse de doctorat, INAEI-Harrach Alger. https://hpthese.ina.dz:8070/sdx/ina/ina/2007/berkani_ml
- Bhandari, M. (2012). International Centre for Integrated Mountain Development, in: G. Ritze (Ed.), *The Wiley-Blackwell Encyclopedia of Globalization*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK , 2012: p. wbeog308.
- Biri, M. (2010). Manuel (Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture), 7^{ème} Edition de Vecchi S.A. Paris. p. 90-91.
- Blair, S. E., Carter, D. A. (2005). The potential for honey in the management of wounds and infection. *Australian Infection Control*, 10(1), 24-31.
- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., Vit, P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee world*, 80(2), 61-69.
- Bogdanov, S., Martin, P. (2002). Honey authenticity. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93, 232-254.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. (2004). Physicochemical methods for the characterization of unifloral honey: A review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- Bogdanov, S., Haldimann, M., Luginbühl, W., Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 269-275.

- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bogdanov, S. (2009). Physical properties of honey. In: Book of Honey, Chapter 4. Bee Product Science.
- Bogdanov, S. (2010). Nutritional and functional properties of honey. *Voprosy Pitaniia*, 79(6), 4-13.
- Bogdanov, S. (2011). Elaboration and harvest of honey, in The book of honey. Bee product science, pp. 8-14.
- Bonté, F., Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(531), 18-21.
- Borsato, D. M., Pridente, A. S., Doll-Boscardin, P. M. et al. (2014). Topical antiinflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in southern Brazil. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 817-825.
- Bouacha, M., Ayed, H., Grara, N. (2018). Honey bee as alternative medicine to treat eleven multidrug-resistant bacteria causing urinary tract infection during pregnancy. *Scientia Pharmaceutica*, 86(2), 14.
- Bouddine, T., Laaroussi, H., Bakour, M., Guirrou, I., Khallouki, F., Mazouz, H., Hajjaj, H., Hajji, L. (2022). Organic honey from the middle atlas of Morocco: Physicochemical parameters, antioxidant properties, pollen spectra, and sugar profiles. *Foods*, 11, 3362.
- Bouhlali, E. D. T., Bammou, M., Sellam, K., Ramchoun, M., Benlyas, M., Alem, C., Filali-Zegzouti, Y. (2016). Evaluation of antioxidant, antibacterial and antifungal activities of eleven monofloral honey samples collected from Morocco. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), 299-306.
- Bouhlali, E. D. T., Bammou, M., Sellam, K., El Midaoui, A., Bourkhis, B., Ennassir, J., Filali-Zegzouti, Y. (2019). Physicochemical properties of eleven monofloral honey samples produced in Morocco. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 26(1), 476-487.
- Boussaid, A., Chouaibi, M., Attouchi, S., Hamdi, S., Ferrari, G. (2018). Classification of Southern Tunisian honeys based on their physicochemical and textural properties. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2590-2609.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species, *Pharmaceutical Biology*, 45(2), 156-161.
- Buba, F., Gidadon A., Shugaba, A. (2013). Analysis of biochemical composition of honey samples from North-East Nigeria. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 2(3), 139.
- Bueno-Costa, F. M., Zambiasi, R. C., Bohmer, B. W., Chaves, F. C., da Silva, W. P., Zanusso, J. T., Dutra, I. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 333-340.
- Burden, C.M., Morgan, M. O., Hladun, K. R., Amdam, G. V., Trumble, J. J., Smith, B. H. (2019). Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior. *Scientific Reports*, 9(1), 4253.

C

- Cabrera, M., Perez, M., Gallez, L., Andrada, A., Balbarrey, G. (2017). Color, antioxidant capacity, phenolic and flavonoid content of honey from the Humid Chaco region, Argentina. *International Journal of Experimental Botany*, 86, 124e130.
- CACQE, <http://www.cacqe.org/>, Le Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage Algeria.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., Kolayli, S. (2015). An investigation of turkish honeys: Their physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 180, 133-141.
- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez, A., Simal-Gandara, J. (2020). Bee venom: an updating review of its bioactive molecules and its health applications. *Nutrients*, 12(11), 3360.
- Carter, C. J., Blizard, R. A. (2016). Autism genes are selectively targeted by environmental pollutants including pesticides, heavy metals, bisphenol A, phthalates and many others in food, cosmetics or household products. *Neurochemistry International*, 101, 83-109.
- Carvalho, M.J., Pereir, V., Pereira, A.C., Pinto, J.L., Marques, J.C. (2015). Evaluation of Wine colour under accelerated and Oak-Cask ageing using CIELab and chemometric approaches. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 2309-2318.
- Castiglioni, S., Stefano, M., Pisani, M., Carloni, P. (2018). Geographical characterization of multifloral honeys from the Marche region (Italy) according to their antioxidant activity and colour using a chemometric approach. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(3), 571-581.
- Cefalu, W.T., Hu, F.B. (2004). Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*, 27(11), 2741-2751.
- Chakir, A., Romane, A., Barbagianni, N., Bartoli, D., Ferrazzi, P. (2011). Major and trace elements in different types of Moroccan honeys. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(4), 223-231. ISSN 1991-8178.
- Cheng, J.-T., Huang, C.-C., Liu, I.-M., Tzeng, T.-F., Chang, C. J. (2006). Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 55(3), 819-825.
- Chepulis, L. M., Chepulis, L.M. (2007). The effect of honey compared to sucrose, mixed sugars, and a sugar-free diet on weight gain in young rats. *Journal of Food Science*, 72, S224-229.
- Chepulis, L. (2015). Honey—food or medicine? The how, where, and why of bioactivity testing. *Bee World*, 92(4), 112-115.
- Cherniack, E. P., Govorushko, S. (2018). To bee or not to bee: The potential efficacy and safety of bee venom acupuncture in humans. *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2018.09.013
- Chikhi, I., Allali, H., Dib, M. E. A., Medjdoub, H., Tabti, B. (2014). Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(3), 181-184.

-
- CLSI, (2004). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- CLSI (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- CLSI (2016). Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. Wayne, PA: CLSI; 2016 CLSI supplement M100S.
- Codex, A. *Codex Alimentarius* Food and Agricultural Organizations of the United Nations, USA. 2009, pp.1-100.
- Codex Committee on Food Hygiene, Report of the thirty-third session of the CODEX Committee on Food Hygiene, Rome, (2000).
- Codex Alimentarius, (2001). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Commission du Codex Alimentarius. ALINORM 01/25, 1-31.
- Como, F., Carnesecchi, E., Volani, S., Dorme, J. L., Richardson, J., Bassan, A., Pavan, M., Benfenati, E. (2017) Predicting acute contact toxicity of pesticides in honeybees (*Apis mellifera*) through a K-nearest neighbor model. *Chemosphere*. 166, 438-444.
- Combarros-Fuertes, P., Estevinho, L. M., Dias, L. G., Castro, J. M., Tomas-Barberan, F. A., Tornadijo, M. E., Fresno-Baro, J. M. (2019). Bioactive components and antioxidant and antibacterial activities of different varieties of honey: A screening prior to clinical application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(2), 688-698.
- Conti, M. E. (2000). Lazio region (central Italy) honeys: a survey of mineral content and typical quality parameters. *Food Control*, 11(6), 459-463.
- Conti, M. E., Canepari, S., Finoia, M. G., Mele, G., Astolfi, M. L. (2018). Characterization of Italian multifloral honeys on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 74, 102-113.
- Coppey, L. J., Gellert, J. S., Davidson, E. P., Yorek, M. A. (2003). Preventing superoxide formation in epineurial arterioles of the sciatic nerve from diabetic rats restores endothelium-dependent vasodilation. *Free Radical Research*, 37(1), 33-40.
- Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., Burlando, B. (2017). Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 412.
- Cortés, M. E., Vigil, P., Montenegro, G. (2011). The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation. *Ciencia e Investigación Agraria*, 38(2), 303-317.
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87.
- Crane E. (1980). A Book of Honey. International Bee Research Association. Oxford University Press.

Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S., Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032-1043.

Curry, D. L., Curry, K. P., Gomez, M. (1972). Fructose potentiation of insulin secretion. *Endocrinology*, 91(6), 1493-1498.

Czipa, N., Phillips, C. J., Kovács, B. (2019). Composition of acacia honeys following processing, storage and adulteration. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1245-1255.

D

da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.

de Alda-Garcilope, C., Gallego-Picó, A., Bravo-Yagüe, J. C., Garcinuño-Martínez, R. M., Fernández-Hernando, P. (2012). Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin “Miel de Granada” according to their mineral content. *Food Chemistry*, 135(3), 1785-1788.

Demir Kanbur, E., Yuksek, T., Atamov, V., Ozcelik, A. E. (2021). A comparison of the physicochemical properties of chestnut and highland honey: The case of Senoz Valley in the Rize province of Turkey. *Food Chemistry*, 345, 128864.

Devillers, J., Doré, J. C., Marengo, M., Poirier-Duchêne, F., Galand, N., Viel, C. (2002). Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5998-6007.

Devillers, J.M., Morlot, M., Pham-Delègue, M.H., Doré, J.C. (2004). Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food chemistry*, 86 (2), 305-312.

Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., Restani, P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 273.

Dinkov, D. (2003). A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgaria. *Apidologie*, 34, 319-320.

Drescher, N., Klein, A.-M., Schmitt, T., Leonhardt, S. D. (2019). A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). PLOS ONE, 14(2), e0210594.

Dutau, G. (2009). Allergie au miel et aux produits de la ruche. *Revue Française d'Allergologie*, 49 : S16-S22.

Džugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P., Grabek-Lejko, D. (2018). Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules*, 23, 2069.

Džugan, M., Grabek-Lejko, D., Swacha, S., Tomczyk, M., Bednarska, S., Kapusta, I. (2020). Physicochemical quality parameters, antibacterial properties and cellular antioxidant activity of Polish buckwheat honey. *Food Bioscience*, 34, 1-10.

E

- Eggersdorfer, M., Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 652, 18–26.
- Elbanna, K., Attalla, K., Elbadry, M., Abdeltawab, A., Gamal-Eldin, H., Fawzy Ramadan, M. (2014). Impact of floral sources and processing on the antimicrobial activities of different unifloral honeys. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(3), 194-200.
- El-Haskoury, R., Kriaa, W., Lyoussi, B., Makni, M. (2018). *Ceratonia siliqua* honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 67-73.
- El-Haskoury, N., Çelik, Ö. F., Kelebekli, L. (2021). Physicochemical properties, total phenolic content, and antioxidant activity of chestnut, rhododendron, acacia and multifloral honey. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3501-3508.
- El Sohaimy, S.A., Masry, S. H.D., Shehata, M., (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. *Annals of Agricultural Sciences*, 60, 279-287.
- Engwa, G. A., Ferdinand, P. U., Nwalo, F. N., Unachukwu, M. N. (2019). Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans. In: Karcioğlu, O., Arslan, B., editors. *Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?* London: IntechOpen; 2019, 10, 70-90.
- Erejuwa, O. O., Gurtu, S., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N., Salleh, M. S. (2010a). Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 80(1), 74–82.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, M. S., Gurtu, S. (2010b). Antioxidant protection of Malaysian Tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Annales d'Endocrinologie*, 71(4), 291-296.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, M. S. M., Gurtu, S. (2011). Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Sciences*, 7(2), 244.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. (2012). Fructose might contribute to the hypoglycemic effect of honey. *Molecules*, 17(12), 1900–1915.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. S., Salleh, M. S., Gurtu, S. (2012). Hepatoprotective effect of tualang honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 4, 37-41.
- Erejuwa, O. O. (2014). Effect of honey in diabetes mellitus: matters arising. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13(1), 1-4.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., Seijo, C. M. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2-3), 851-6.

- Escuredo, O., Rodriguez-Flores, M. S., Rojo-Martinez, S., Seijo C. M. (2019). Contribution to the chromatic characterization of unifloral honeys from Galicia (NW Spain). *Foods*, 8(233), 1-16.
- Eteraf-Oskouei, T., Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of naturel honey in human diseases - A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(6), 731-742.
- European Commission (2001). "Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey", *Official Journal of the European Communities* L10, 47-52, 2002.

F

- FAO/WHO 2010. Expert committee on Food Additives. Summary and conclusions, 73rd meeting, 8-17 June, Geneva, Switzerland.
- Fechner, D. C., Moresi A. L., Riuz Díaz, J. D., Pellerano, R. G., Vazquez, F. A. (2016). Multivariate classification of honeys from Carrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties. *Food Bioscience*, 15, 49-54.
- Fermo, P., Beretta, G., Maffei-Facino, R., Gelmini, F., Piazzalunga, A. (2013). Ionic profile of honey as a potential indicator of botanical origin and global environmental pollution. *Environmental Pollution*, 178, 173-181.
- Fernandez-Torres, R., Perez-Bernal, J. L., Bello-Lopez, M. A., Callejon-Mochon, M., Jomenez-Sanchez, J. C., Guiraum-Perez, A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65(3), 686-691.
- Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M., Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114(4), 1438-1443.
- Florian, S., Bauer-Marinovic, M., Taugner, F., Dobbernack, G., Monien, B.H., Meinel, W., Glatt, H. (2012). Study of 5-hydroxymethylfurfural and its metabolite 5-sulfoxymethylfurfural on induction of colonic aberrant crypt foci in wild-type mice and transgenic mice expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(4), 593-600.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. Statistics division.
- Forest, T., Holder, D., Smith, A., Cunningham, C., Yao, X., Dey, M., Frederick, C., Prahalada, S. (2014). Characterization of the exocrine pancreas in the male Zucker diabetic fatty rat model of type 2 diabetes mellitus following 3 months of treatment with sitagliptin. *Endocrinology*, 155(3), 783-792.
- Forte, G., Fadda, C., Bocca, B., Erre, G. L., Passiu, G., Madeddu, R. (2019). Association between exposure to heavy metals and systemic sclerosis: the levels of Al, Cd, Hg, and Pb in blood and urine of patients. *Biological Trace Element Research*, 190(1), 1-10.
- Foster, L. B., Dunn, R. T. (1973). Stable reagents for determination of serum triglycerides by a colorimetric Hantzsch condensation method. *Clinical Chemistry*, 19(3), 338-340.
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10(2), 514-528.

-
- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., Felicioli, A. (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 839-843.
- Frías, I., Rubio, C., González-Iglesias, T., Gutiérrez, Á. J., González-Weller, D., Hardisson, A. (2008). Metals in fresh honeys from Tenerife Island, Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(1), 30-33.

G

- Galhardo, D., Garcia, R. C., Schneider, C. R., Braga, G. C., Chambo, E. D., França, D. L. B., Stroher, S. M. (2020). Physicochemical, bioactive properties and antioxidant of *Apis mellifera* L. honey from western Paraná, Southern Brazil. *Food Science and Technology*, 1-7.
- Gall, J. E., Boyd, R. S., Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(4), 201.
- Ghramh, H. A., Khan, K. A., Alshehri, A. M. A. (2018). Antibacterial potential of some Saudi honeys from Asir region against selected pathogenic bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 1278-1284.
- Ghorab, A., Rodríguez-Flores, M. S., Nakib, R., Escuredo, O., Haderbache, L., Bekdouche, F., Seijo, M. C. (2021). Sensorial, melissopalynological and physico-chemical characteristics of honey from Babors Kabylia's Region (Algeria). *Foods*, 10(2), 225.
- Giacoppo, S., Galuppo, M., Calabro, R. S., D'Aleo, G., Marra, A., Sessa, E., Bua, D. G., Potorti, A. G., Dugo, G., Bramanti, P., Mazzon, E. (2014). Heavy metals and neurodegenerative diseases: an observational study. *Biological Trace Element Research*, 161(2), 151-160.
- Gilles, A. (2010). La biologie de l'abeille. *Ecole d'apiculture Sud-Luxembourg*, 4-8.
- Gleiter, R.A., Horn, H., Isengard, H.-D. (2006). Influence of type and state of crystallization on the water activity of honey. *Food Chemistry*, 96, 441-445.
- Gonçalves, J., Ribeiro, I., Marçalo, J., Rijo, P., Faustino, C., Pinheiro, L. (2018). Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of selected Portuguese commercial monofloral honeys. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(10), 645-654.
- Gonçalves, J., Ribeiro, I., Marçalo, J., Rijo, P., Faustino, C., Pinheiro, L. (2018). Physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of selected portuguese commercial monofloral honeys. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(10), 645-654.
- González Paramás, A.M., GómezBárez, J.A., Garcia-Villanova, R.J., Rivas Palá, T., Ardanuy Albajar, R., Sánchez, J. (2000). Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 157-165.
- Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., Sužnjević, D. T. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30, 13-18.
- Grayson, M. (2015). Bees. *Nature*, 521(7552):S47.

-
- Gregory, P. C., McFadyen, M., Rayner, D. V. (1989). Relation between gastric emptying and short-term regulation of food intake in the pig. *Physiology & Behaviour*, 45(4), 677-683.
- Grodsky, G. M., Batts, A. A., Bennett, L. L., Vcella, C., McWilliams, N. B., Smith, D. F. (1963). Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 205(4), 638-644.
- Grosvenor, M. B., Smolin, L. A. (2009). Visualizing nutrition: Everyday choices. 4th Edition, Hoboken, N.J.: Wiley, pp. 1-640.
- Guerzou, M., Aouissi, H. A., Guerzou, A., Burlakovs, J., Doumandji, S., Krauklis, A. E. (2021). From the Beehives: Identification and comparison of physicochemical properties of Algerian honey. *Resources*, 10(10), 94.
- Gül, A., Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(6), 1056-1065.
- Gupta, P., Khare, V., D. Kumar, D. et al. (2015). Comparative evaluation of disc diffusion and E-test with broth micro-dilution in susceptibility testing of amphotericin B, voriconazole and caspofungin against clinical *Aspergillus* isolates. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 2013-2016.

H

- Habib, H. M., Al Meqbali, F. T., Kamal, H., Souka, U. D., Ibrahim, W. H. (2014). Physico chemical and biochemical properties of honey from arid regions. *Food Chemistry*, 153, 35-43.
- Haderbache, L., Bousdira, M., Mohammedi, A. (2013). *Ziziphus lotus* and *Euphorbia bupleuroides* Algerian honeys. *Global Journal of Health Science*, 24, 1536-1543.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62(10).
- Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-46.
- Hermosín, I., Chichón, R.M., Cabezudo, M.d. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83, 263-268.
- Hernández, O. M., Fraga, J. M. G., Jimenez, A. I., Jimenez, F., Arias, J. J. (2005). Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*, 93 (3), 449-458.
- Hernanz, D., Palomar, M. A., Moujanni, A., Essamadi, A., Heredia, F. J., Terrab, A. (2022). Phenolic compounds and color of labeled resin spurge honey and their correlations with pollen content. *LWT – Food Science and Technology*, 169, 113987.
- Homrani, M., Escuredo, O., Rodríguez-Flores, M. S., Dalache, F., Bouzouina, M., Homrani, A., Seijo, M. C. (2020). Botanical origin, pollen profile, and physicochemical properties of Algerian honey from different bioclimatic areas. *Foods*, 9, 938.

- Horváth, G., Jám bor, N., Végh, A. et al. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 178-182.
- Hosseini, A., Abdollahi, M. (2013). Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013:168039.
- Hung, K. L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870), 20172140.
- Hussain, M. B., Kamel, Y. M., Ullah Z., Jiman-Fatani, A. A. M., Ahmad, A. S. (2019). In vitro evaluation of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* susceptibility to Saudi honeys. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 19(1), 185.
- Huynh, M., Luiken, J.J., Coumans, W. et al. (2008). Dietary fructose during the suckling period increases body weight and fatty acid uptake into skeletal muscle in adult rats. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 1755–1762.

I

- Ibrahim, K. Md., Mohamed, M., Jamalullail, S. M. S., Alam, N., Sulaiman, S. A. (2011). Evaluation of radical scavenging activity and colour intensity of nine Malaysian honeys of different origin. *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 3, 04-11.
- Ibrahimi, H., Hajdari, A. (2020). Phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Kosovo. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 452-457.
- Imtara, H., Elamine, Y., Lyoussi, B. (2018). Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Science & Nutrition*, 6, 2056-2065.
- Ishizaka, N., Hongo, M., Sakamoto, A., Saito, K., Furuta, K., Koike, K. (2011). Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 12(4), 462-468.
- Islam, M. K., Sostaric, T., Lim, L. Y., Hammer, K., Locher, C. (2020). A validated method for the quantitative determination of sugars in honey using high-performance thin-layer chromatography. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 33(5), 489-499.
- Issaad, F. Z., Bouhedjar, K., Ikhlef, A., Lachlah, H., Smain, D. H., Boutaghane, K., Bensouici, C. (2021). Multivariate analysis of physico-chemical, bioactive, microbial and spectral data characterisation of Algerian honey. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3634-3648.

J

- Jara-Palacios, M. J., Ávila, F. J., Escudero-Gilete, M. L., Gómez Pajuelo, A., Heredia, F. J., Hernanz, D., Terrab, A. (2019). Physicochemical properties, colour, chemical composition, and antioxidant activity of Spanish Quercus honeydew honeys. *European Food Research and Technology*, 245(9), 2017-2026

-
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations. 1983. TRS 696-JECFA 27/29, FAS 18-JECFA 27/203. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=2859>. Accessed on 8 April 2020.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations. 1982a. TRS 683-JECFA 26/32. FAS 17-JECFA 26/320. https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_2411.htm. Accessed on 8 April 2020.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations. 1982b. TRS 683-JECFA 26/31, FAS 17-JECFA 26/265. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=2824>. Accessed on 8 April 2020.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations. 1999. TRS 896-JECFA 53/81, FAS 44-JECFA 53/273. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3511>. Accessed on 8 April 2020.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations. 1988. TRS 776-JECFA 33/27, FAS 24-JECFA 33/155. https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_159.htm. Accessed on 8 April 2020.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations. 2005. TRS 930-JECFA 64/26, 64th_2006_Cadmium_ML.pdf. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1376>. Accessed on 8 April 2020.
- Jorgensen, J. H., Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1749-1755.

K

- Kadri, S. M., Zaluski, R., Orsi, R.O. (2017). Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes. *Food Chemistry*, 218, 237-241.
- Kalaiarasi, P., Kaviarasan, K., & Pugalendi, K. V. (2009). Hypolipidemic activity of 18 β -glycyrrhetic acid on streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 612(1-3), 93-97.
- Kapaj, S., Peterson, H., Liber, K., Bhattacharya, P. (2006). Human health effects from chronic arsenic poisoning—a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(10), 2399-2428.
- Karabagias, I., Karabournioti, S. (2018). Discrimination of clover and citrus honeys from Egypt according to floral type using easily assessable physicochemical parameters and discriminant analysis: An external validation of the chemometric approach. *Foods*, 7, 70.
- Karabagias, I. K., Louppis, A. P., Kontakos, S., Drouza, C., Papastephanou, C. (2018). Characterization and botanical differentiation of monofloral and multifloral honeys produced in Cyprus, Greece, and Egypt using physicochemical parameter analysis and mineral content in conjunction with supervised statistical techniques. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Volume 2018, Article ID 7698251, 10 pages.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. C., Uygun, D. A., (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorysioechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.

- Karan, S. K., Mondal, A., Mishra, S. K., Pal, D., Rout, K. K. (2013). Antidiabetic effect of *Streblus asper* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 51(3), 369-375.
- Kaškonienė, V., Venskutonis, P.R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620–634.
- Kędzia, B. O. G. D. A. N. (2008). Pochodzenie propolisu w świetle teorii i badań naukowych. *Herba Polonica*, 54(4), 179-186.
- Kellet, G. L., Brot-Laroche, E., Mace, O. J. (2008). Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annual Reviews of Nutrition*, 28(1), 35-54.
- Khalafi, R., Goli, S. A. H., Behjatian, M. (2016). Characterization and classification of several monofloral Iranian honeys based on physicochemical properties and antioxidant activity. *International Journal of Food Properties*, 19(5), 1065-1079.
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., Sulaiman, S. A., Hua Gan, S. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules* 17, 11199-11215.
- Khalil, M. D. I., Tanvir, E. M., Afroz, R., Sulaiman, S. A., Gan, S. H. (2015). Cardioprotective effects of tualang honey: amelioration of cholesterol and cardiac enzymes levels. *BioMed Research International*, vol. 2015, 1-8, Article ID 286051.
- Khan, F. R., Abadin, Z. U., Rauf, N. (2007). Honey: nutritional and medicinal value. *International Journal of Clinical Practice*, 61(10), 1705-1707.
- Khuder, A., Ahmad, M., Hasan, R., Saour, G. (2010). Improvement of X-ray fluorescence sensitivity by dry ashing method for elemental analysis of bee honey. *Microchemical Journal*, 95(2), 152-157.
- Kılıç Altun, S., Dinç, H., Paksoy, N., Temamoğulları, F. K., Savrunlu, M. (2017). Analyses of mineral content and heavy metal of honey samples from south and east region of Turkey by using ICP-MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, Volume 2017, Article ID 6391454.
- Kishore, R. K., Halim, A. S., Syazana, M. S., K.N. Sirajudeen, K. N. (2011). Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutrition Research*, 31(4), 322-325.
- Klip, A., Vranic, M. (2006). Muscle, liver, and pancreas: Three Musketeers fighting to control glycemia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291, E1141-3.
- Kokil, G. R., Rewatkar, P. V., Verma, A., Thareja, S., Naik, S. R. (2010). Pharmacology and chemistry of diabetes mellitus and antidiabetic drugs: a critical review. *Current Medicinal Chemistry*, 17(35), 4405-4423.
- Kot, B., Sytykiewicz, H., Sprawka, I., Witeska, M. (2020). Effect of manuka honey on biofilm-associated genes expression during methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.

- Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., Musik, I. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-29.
- Krentz, A. J., Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents. *Drugs*, 65(3), 385-411.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526-534.
- Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R., Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(3), 556.
- Kwon, S., Kim, Y. J., Kim, M. K. (2008). Effect of fructose or sucrose feeding with different levels on oral glucose tolerance test in normal and type 2 diabetic rats. *Nutrition Research and Practice*, 2(4), 252-258.

L

- Laallam, H., Boughediri, L., Bissati, S., Menasria, T., Mouzaoui, M. S., Hadjadj, S., Hammoudi, R., Chenchouni, H. (2015). Modeling the synergistic antibacterial effects of honey characteristics of different botanical origins from the Sahara Desert of Algeria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1239.
- Laallam, H. (2018). Etude méliissopalynologique, physicochimique et antibactérienne de quelques échantillons de miels du Sud algérien, Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Université de Ouargla, 111 pages.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46 (2007), 244-282.
- Lahouel, M., Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M. (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, 712-720.
- Lanjwani, M. F., Channa, F. A. (2019). Minerals content in different types of local and branded honey in Sindh, Pakistan. *Heliyon*, 5(7), e02042.
- Laos, K., Kirs, Z., Pall, R., Martvak, K. (2011). The crystallization behavior of Estonian honeys. *Agronomy Research*, 9, 427-432.
- Laredj, H., Waffa, R. (2017). Microbiological and Physicochemical Characterization of Honeys from the Tiaret Region of Algeria. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, vol. 9, no. 3, p. 85-91.
- Lê, K. A., Faeh, D., Stettler, R., Ith, M., Kreis, R., Vermathen, P., Boesch, C., Ravussin, E., Tappy, L. (2006). A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(6), 1374-1379.

- Lee, J. A., Son, M. J., Choi, J., Yun, K. J., Jun, J. H., Lee, M. S. (2014). Bee venom acupuncture for rheumatoid arthritis: a systematic review protocol. *BMJ Open*, 4(4), e004602.
- Levine, R. (1982). Insulin: the effects and mode of action of the hormone. *Vitamins & Hormones*, 39, 145-173.
- Lewoyehu, M., Amare, M. (2019). Comparative assessment on selected physicochemical parameters and antioxidant and antimicrobial activities of honey samples from selected districts of the Amhara and Tigray regions, Ethiopia. *International Journal of Food Science*, Article ID 4101695, 10.
- Liu, J. R., Ye, Y. L., Lin, T. Y., Wang, Y. W., Peng, C. C. (2013). Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food Chemistry*, 139(1-4), 938-943.
- Louveaux, J. (1985). Les abeilles et leurs élevages. 2ème éd. Opida, p. 261.
- Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

M

- Machado, A. M., Tomas', A., Russo-Almeida, P., Duarte, A., Antunes, M., Vilas-Boas, M., Miguel, M.G., Figueiredo, A. C. (2022). Quality assessment of Portuguese monofloral honeys. Physicochemical parameters as tools in botanical source differentiation. *Food Research International*, 157, 111362.
- Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37.
- Maddocks, S. E., Jenkins, R. E. (2013). Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8(11), 1419-1429.
- Majewska, E., Drużyńska, B., Wołosiak, R. (2019). Determination of the botanical origin of honeybee honeys based on the analysis of their selected physicochemical parameters coupled with chemometric assays. *Food Science and Biotechnology*, 28, 1307.
- Majithiya, J. B., Balaraman, R. (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 78(22), 2615-2624.
- Makhloufi, C., Kerkvliet, J., Schweitzer, P. (2015). Characterisation of some monofloral Algerian honeys by pollen analysis. *Grana*, 54(2), 156-166.
- Makhloufi, C., Ait Abderrahim, L., Taibi, K. (2021). Characterization of some Algerian honeys belonging to different botanical origins based on their physicochemical properties. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45(1), 189-199.
- Mama, M., Teshome, T., Detamo, J. (2019). Antibacterial Activity of Honey against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Laboratory-Based Experimental Study. *International Journal of Microbiology*, 2019.

- Manosso, L. M., Camargo, A., Dafre, A. L., Rodrigues, A. L. S. (2022). Vitamin E for the management of major depressive disorder: possible role of the anti-inflammatory and antioxidant systems. *Nutritional Neuroscience*, 25(6), 1310-1324.
- Manzanares, A. B., García, Z. H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R., Romero, C. D. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 572-578.
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1-16.
- Maric, T., Nasir, M. Z. M., Rosli, N. F., Budanović, M., Webster, R. D., Cho, N. J., Pumera, M. (2020). Microrobots derived from variety plant pollen grains for efficient environmental cleanup and as an anti-cancer drug carrier. *Advanced Functional Materials*, 30(19), 2000112.
- Martín, R. A. P., Hortigüela, L. V., Lozano, P. L., Cortina, M. D. R., Carretero, C. D. L. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Spanish honeys. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 727-737.
- Mayer, A.S., Donovan, J.L., Pearson, D.A., Waterhouse, A. L., Frankel, E.N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1783–1787.
- Mehrabani, M., Kazemi, A., Ayatollahi Mousavi, S.A., et al. (2013). Evaluation of antifungal activities of *Myrtus communis* L. by bioautography method. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6, 1-7.
- Meirelles, C. J., Oliveira, L. A., Jordao, A. A., Navarro, A. M. (2011). Metabolic effects of the ingestion of different fructose sources in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 119(4), 218-220.
- Mejías, E., Garrido, T. (2017). Analytical Procedures for Determining Heavy Metal. *Honey Analysis*, 311.
- Mekious, S., Houman, Z., Bruneau, É., Masseaux, C., Guillet, A., Hance, T. (2015). Caractérisation des miels produits dans la région steppique de Djelfa en Algérie. In *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, Vol. 19, n° 3, p. 219-229.
- Meyer, A. S., Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., Frankel, E. N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1783-1787.
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2), 91-91.
- Mishra, S. B., Verma, A., Vijayakumar, M. (2013). Preclinical valuation of anti-hyperglycemic and antioxidant action of Nirmali (*Strychnos potatorum*) seeds in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic Wistar rats: A histopathological investigation. *Biomarkers and Genomic medicine*, 5(4), 157-163.
- Mohan, A., Quek, S. Y., Gutierrez-Maddox, N., Gao, Y., Shu, Q. (2017). Effect of honey in improving the gut microbial balance. *Food Quality and Safety*, 1(2), 107-115.
- Mohd Mutalip, S., Ab-Rahim, S., Rajikin, M. (2018). Vitamin E as an Antioxidant in Female Reproductive Health. *Antioxidants*, 7(2), 22.

- Morroni, G., Alvarez-Suarez, J. M., Brenciani, A., Simoni, S., Fioriti, S., Pugnali, A., Giovanetti, E. (2018). Comparison of the antimicrobial activities of four honeys from three countries (New Zealand, Cuba, and Kenya). *Frontiers in Microbiology*, 9, 1378.
- Mouhoubi-Tafnine, Z., Ouchemoukh, S., Tamendjari, A. (2016). Antioxydant activity of some Algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*, 88, 85-90.
- Moujanni, A., Partida, L., Essamadi, A. K., Hernanz, D., Heredia, F. J., Terrab, A. (2018). Physicochemical characterization of unique unifloral honey: *Euphorbia resinifera*. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 27-35.
- Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.
- Murtaza, G., Murtaza, B., Niazi, N. K., Sabir, M. (2014). Soil contaminants: Sources, effects, and approaches for remediation, in P. Ahmad, M.R. Wani, M.M. Azooz & L.S.P. Tran (eds), *Improvement of crops in the era of climatic changes*, Springer, Dordrecht, Netherlands, vol. 2, pp. 171-196.

N

- Nascimento, A. M. C. B., Luz Jr, G. E. (2018). Bee pollen properties: uses and potential pharmacological applications-a review. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 7(5), 513-15.
- Nasrolahi, O., Heidari, R., Rahmani, F., Farokhi, F. (2012). Effect of natural honey from Ilam and metformin for improving glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2(4), 212.
- Nemoseck, T. M., Carmody, E. G., Furchner-Evanson, A., Gleason, M., Li, A., Potter, H., Rezende, L.M., Lane, K. J., Kern, M. (2011). Honey promotes lower weight gain, adiposity and triglycerides than sucrose in rats. *Nutrition Research*, 31(1), 55-60.
- Nijs, A., Cartuyvels, R., Mewis, A., et al. (2003). Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3627-3630.
- Nishio, E. K., Ribeiro, J. M., Oliveira, A. G. et al. (2016). Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepelletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports*, 6(1), article 21641.
- Nolan, V. C., Harrison, J., Cox, J. A. (2019). Dissecting the antimicrobial composition of honey. *Antibiotics*, 8(4), 251.

O

- Oddo, L. P., Piro, R., Bruneau, É., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., Ruoff, K. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38-S81.

-
- Omotayo, E. O., Gurtu, S., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., KNS, S., Salleh, M. S. M. (2010). Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 80(1), 74-82.
- Oroian, M., Prisacaru, A., Hretcanu, E. C., Stroe, S. G., Leahu, A., Buculei, A. (2016). Heavy metals profile in honey as a potential indicator of botanical and geographical origin. *International Journal of Food Properties*, 19(8), 1825-1836.
- Oroian, M., Leahu, A., Damian, C., Buculei, A. (2017). Honey classification using colour measurement. *Food and Environment Safety*, 11, 29-32.
- Oryan, A., Alemzadeh, E., Moshiri, A. (2016). Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. *Journal of Tissue Viability*, 25(2), 98-118.
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M. A., Sancho, M. T. (2016). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 78, 29-33.
- Ouchemoukh, S., Louaileche, H., Schweitzer, P. (2007). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*, 18(1), 52-58.
- Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Gómez-Romero, M., Aboud, F., Giuseppe, A., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2017). Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 460-469.
- Ouchemoukh, N., Maouche, N., Otmani, A., Terrab, A., Madani, K., Ouchemoukh, S. (2021). Evaluation of Algerian's honey in terms of quality and authenticity based on the melissopalynology and physicochemical analysis and their antioxidant powers. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 14(6), 1-19.
- Ough, C.S. (1969). Rapid Determination of Proline in Grapes and Wines. *Journal of Food Science*, 34(3), 228-230.
- Owayss, A. A., Elbanna, K., Iqbal, J., Abulreesh, H. H., Organji, S. R., Raweh, H. S., Alqarni, A. S. (2020). In vitro antimicrobial activities of Saudi honeys originating from *Ziziphus spina-christi* L. and *Acacia gerrardii* Benth. trees. *Food Science & Nutrition*, 8(1), 390-401.
- Özbalci, B., Boyaci, I. H., Topcu, A., Kadilar, C., Tamer, U. (2013). Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1444-1452.

P

- Packer, J. M., Irish, J., Herbert, B. R., Hill, C., Padula, M., Blair, S. E., Harry, E. J. (2012). Specific non-peroxide antibacterial effect of manuka honey on the *Staphylococcus aureus* proteome. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(1), 43-50.

- Parhizkar, E., Rashedinia, M., Karimi, M., Alipour, S. (2018). Design and development of vitamin C-encapsulated proliposome with improved in-vitro and ex-vivo antioxidant efficacy. *Journal of Microencapsulation*, 35(3), 301-311.
- Pavel, C. I., Mărghitaș, L. A., Bobiș, O., Dezmirean, D. S., Șapcaliu, A., Radoi, I., Mădaș, M. N. (2011). Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), 108-118.
- Pehlivan, T., Gül, A. (2015). Determination of heavy metals contents of some monofloral honey produced in Turkey. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(8), 042-045.
- Pérez-Arquillue, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T., Herrera, A. (1995). Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chemistry*, 54, 167-172.
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Sofo, A., Gambacorta, E. (2012). Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(9), 1909-1917.
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I., Gambacorta, E. (2013). Antioxidant properties, polyphenol content and colorimetric characteristics of different floral origin honeys from different areas of Southern Italy. *Journal of Life Sciences*, 7(4), 428-436.
- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Piccoli, G. B., Grassi, G., Cabiddu, G., Nazha, M., Roggero, S., Capizzi, I., Veltri, A. (2015). Diabetic kidney disease: a syndrome rather than a single disease. *The Review of Diabetic Studies: RDS*, 12(1-2), 87.
- Pipicelli, G., Tatti, P. (2009). Therapeutic properties of honey. *Health*, 1(2), 281-283.
- Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*, 107(4), 1553-1560.
- Pohl, P., Stecka, H., Greda, K., Jamroz, P. (2012). Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. *Food Chemistry*, 134(1), 392-396.
- Ponikvar, M., Šnajder, J., Sedej, B. (2005). Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂. *Apidologie*, 36(3), 403-409.
- Porcza, L. M., Simms, C., Chopra, M. (2016). Honey and cancer: current status and future directions. *Diseases*, 4(4), 1-26, 2016.
- Prieto, P. G., Cancelas, J., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Valverde, I. (2004). Plasma D-glucose, D-fructose and insulin responses after oral administration of D-glucose, D-fructose and sucrose to normal rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(5), 414-419.
- Primorac, L., Flanjak, I., Kenjerić, D., Bubalo, D., Topolnjak, Z. (2011). Specific rotation and carbohydrate profile of Croatian unifloral honeys. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(5), 515-519.
- Provenzano, M. R., El Bilali, H., Simeone, V., Baser, N., Mondelli, D., Cesari, G. (2010). Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry*, 122(4), 1338-1343.

- Przybyłek, I., Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11), 2047.
- Puścion-Jakubik, A., Borawska, M. H., Socha, K. (2020). Modern methods for assessing the quality of bee honey and botanical origin identification. *Foods*, 9(8), 1028.

R

- Radler, U., Stangl, H., Lechner, S., Lienbacher, G., Krepp, R., Zeller, E., Lohninger, A. (2011). A Combination of (ω -3) polyunsaturated fatty acids, polyphenols and L-carnitine reduces the plasma lipid levels and increases the expression of genes involved in fatty acid oxidation in human peripheral blood mononuclear cells and HepG2 cells. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(2), 133-140.
- Rakha, M. K., Nabil, Z. I., Hussein, A. A. (2008). Cardioactive and vasoactive effects of natural wild honey against cardiac malperformance induced by hyperadrenergic activity. *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 91-98.
- Rakieten, N., Rakieten, M. L., Nadkarni, M. V. (1963) (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy Reports*, 29, 91-98.
- Ramli, N. Z., Chin, K. Y., Zarkasi, K. A., Ahmad, F. (2018). A review on the protective effects of honey against metabolic syndrome. *Nutrients*, 10(8), 1009.
- Rana, S., Mishra, M., Yadav, D., Subramani, S. K., Katare, C., Prasad, G. B. K. S. (2018). Medicinal uses of honey: a review on its benefits to human health. *Progress in Nutrition*, 20(1), 5-14.
- Rao Kondapally Seshasai, S., Kaptoge, S., Thompson, A., Di Angelantonio, E., Gao, P., Sarwar, N. et al. (2011). Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *New England Journal of Medicine*, 364(13), 1281.
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 157-184.
- Robertson, R. P., Harmon, J. S. (2006). Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), 177-184.
- Rodríguez, J., Mandalunis, P. M. (2018). A review of metal exposure and its effects on bone health. *Journal of Toxicology*, 2018: 1-11.
- Rodríguez-Flores, M. S., Escuredo, O., Seijo, M. C. (2016). Characterization and antioxidant capacity of sweet chestnut honey produced in North-West Spain. *Journal of Apicultural Science*, 60(1), 19.
- Rodríguez-Flores, M. S., Escuredo, O., Seijo-Rodríguez, A., Seijo, M. C. (2019). Characterization of the honey produced in heather communities (NW Spain). *Journal of Apicultural Research*, 58(1), 84-91.

S

- Sadowska, J., Rygielska, M. (2019). The effect of high fructose corn syrup on the plasma insulin and leptin concentration, body weight gain and fat accumulation in rat. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(7), 879-884.

-
- Sagdic, O., Silici, S., Ekici, L. (2013). Evaluation of the phenolic content, antiradical, antioxidant, and antimicrobial activity of different floral sources of honey. *International Journal of Food Properties*, 16(3), 658-666.
- Salama, A. S., Etoriki, A. M., Awad, M. H. (2019). Determination of physicochemical properties and toxic heavy metals levels in honey samples from West of Libya. *Journal of Advanced Chemical Sciences*, 618-620.
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., Samini, F. (2017). Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy Research*, 9(2), 121.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- Sanchez, V., Baeza, R., Ciappini, C., Zamora, M. C., Chirife, J. (2010). Comparison between Karl Fischer and refractometric method for determination of water content in honey. *Food Control*, 21, 339-341.
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M. (2017). Chemical composition of honey. In *Bee products-chemical and biological properties* (pp. 43-82). Springer, Cham.
- Sanz, M. L., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2005). A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*, 91(2), 313-317.
- Saunier, J.-B., Losfeld, G., Freydier, R., Grison, C. (2013). Trace elements biomonitoring in a historical mining district (les Malines, France). *Chemosphere*, 93(9), 2016–2023.
- SCF 2003. Opinion of the scientific committee on food on the tolerable upper intake level of trivalent chromium. European Commission.
- Schievano, E., Finotello, C., Uddin, J., Mammi, S., Piana, L. (2016). Objective definition of monofloral and polyfloral honeys based on NMR metabolomic profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(18), 3645-3652.
- Schneider, N. (2006). Abeilles et guêpes anthropophiles du Luxembourg (Insecta, Hymenoptera, Aculeata). *Bulletin de la Société des Naturalistes Luxembourgeois*, 107, 131-145.
- Se, K. W., Ibrahim, R. K. R., Wahab, R. A., Ghoshal, S. K. (2018). Accurate evaluation of sugar contents in stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey using a swift scheme. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 46-54.
- Selvaraju, K., Vikram, P., Soon, J. M., Krishnan, K. T., Mohammed, A. (2019). Melissopalynological, physicochemical and antioxidant properties of honey from West Coast of Malaysia. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2508-2521.
- Serrano, S., Rodríguez, I., Moreno, R., Rincón, F. (2019). Detection of key factors affecting specific optical rotation determination in honey. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 574-580.
- Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M., Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1-18.

- Shaw (UKPDS) Group. (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The lancet*, 352(9131), 837-853.
- Shaw, J. E., Sicree, R. A., Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(1), 4-14.
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 1-5.
- Sıcak, Y., Şahin-Yağlıoğlu, A., Öztürk, M. (2021). Bioactivities and phenolic constituents relationship of Muğla thyme and pine honey of Turkey with the chemometric approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3694-3707.
- Siddiqui, A. J., Musharraf, S. G., Choudhary, M. I., Rahman, A. (2017). Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*, 217, 687-698.
- Siedel, J., Hägele, E. O., Ziegenhorn, J., Wahlefeld, A. W. (1983). Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clinical Chemistry*, 29(6), 1075-1080.
- Silici, S., Uluozlu, O. D., Tuzen, M., Soylak, M. (2016). Honeybees and honey as monitors for heavy metal contamination near thermal power plants in Mugla, Turkey. *Toxicology and Industrial Health*, 32(3), 507-516.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93(1), 73-77.
- Silva, L. R., Sousa, A., Taveira, M. (2017). Characterization of Portuguese honey from Castelo Branco region according to their pollen spectrum, physicochemical characteristics and mineral contents. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2551-2561.
- Silva, T. M. S., dos Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., da Silva, E. M. S., da Silva, G. S., de Novais, J. S., Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 10-18.
- Sindi, A., Chawn, M. V. B., Hernandez, M. E., Green, K., Islam, M. K., Locher, C., Hammer, K. (2019). Anti-biofilm effects and characterisation of the hydrogen peroxide activity of a range of Western Australian honeys compared to Manuka and multifloral honeys. *Scientific Reports*, 9(1), 1-17.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press.
- Sodré, G. S., Marchini, L. C., Moreti, A. C. C. C., Otsuk, I. P., Carvalho, C. A. L. (2011). Physico-chemical characteristics of honey produced by *Apis mellifera* in the Picos region, state of Piauí, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(8), 1837–1843.
- Solayman, M., Islam, M. A., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M. I., Alam, N., Gan, S. H. (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 219-233.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L. et al. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *Journal of Clinical Investigation*, 119, 1322-1334.
- Staniškienė, B., Matusevičius, P., Būdrekiene, R. (2006). Honey as an Indicator of Environmental Pollution. *Environmental Research, Engineering & Management*, 36(2).
- Stephen, A. (2014). Pollen: A microscopic wonder of plant kingdom. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1(9), 45-62.
- Stockley, C., Teissedre, P. L., Boban, M., Di Lorenzo, C., Restani, P. (2012). Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: A review. *Food & Function*, 3(10), 995-1007.
- Strigul, N., Koutsospyros, A., Arienti, P., Christodoulatos, C., Dermatas, D., Braida, W. (2005). Effects of tungsten on environmental systems. *Chemosphere*, 61(2), 248-258.
- Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Mantia, M., Pederiva, S., Brusa, F., Abete, M. C. (2020). Trace elements and rare earth elements in honeys from the Balkans, Kazakhstan, Italy, South America, and Tanzania. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(11), 12646-12657.
- Sultana, S., Foster, K., Lim, L. Y., Hammer, K., Locher, C. (2022). A Review of the phytochemistry and bioactivity of clover honeys (*Trifolium* spp.). *Foods*, 11(13), 1901.
- Svečnjak, L., Chesson, L. A., Gallina, A., Maia, M., Martinello, M., Mutinelli, F., Waters, T. A. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-108.
- Szabó, R.T., Mézes, M., Szalai, T., Zajác, E., Kovács-Weber, M. (2016). Colour identification of honey and methodical development of its instrumental measuring. *Columella – Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3, 29-36.

T

- Tamali, H. S., Özkirim, A. (2019). Beekeeping activities in Turkey and Algeria. *Mellifera*, 19(1), 30-40.
- Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69(3), 217-225.
- Tautz, J. (2009). L'étonnante abeille. De Boeck Supérieur.

-
- Terrab, A., González, A. G., Díez, M. J., Heredia, F. J. (2003). Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 218(1), 88-95.
- Terrab, A., Recamales, A. F., Hernanz, D., Heredia, F. J. (2004a). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88(4), 537-542.
- Terrab, A., González-Miret, L., Heredia, F.J. (2004b). Colour characterisation of thyme and avocado honeys by diffuse reflectance spectrophotometry and spectroradiometry. *European Food Research and Technology*, 218, 488-492.
- Thakur, M., Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82-106.
- Thomas, L. (1998). Clinical Laboratory Diagnostics-Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, Germany, 1ed. 208-214.
- Thrasylvoulou, A., Tananaki, C., Goras, G., Karazafiris, E., Dimou, M., Liolios, V., Gounari, S. (2018). Legislation of honey criteria and standards. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 88-96.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., Kayacier, A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, 124-131.
- Trifunski, S., Munteanu, M. F., Agotici, V., Pintea, S., Gligor, R. (2015). Determination of flavonoid and polyphenol compounds in *Viscum album* and *Allium sativum* extracts. *International Current Pharmaceutical Journal*, 4(5), 382-385.
- Tuberoso, C.I.G., Jerkovic, I., Sarais, G., Congiu, F., Marijanovic, Z., Kus, P.M. (2014). Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE L*a*b* chromaticity coordinates. *Food Chemistry*, 145, 284-291.
- Tuksitha, L., Chen, Y. L. S., Chen, Y. L., Wong, K. Y., Peng, C. C. (2018). Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(2), 563-570.

U

- Ushijima, K., Riby, J. E., Fujisawa, T., Kretchmer, N. (1995). Absorption of fructose by isolated small intestine of rats is via a specific saturable carrier in the absence of glucose and by the disaccharide-related transport system in the presence of glucose. *The Journal of Nutrition*, 125(8), 2156-2164.

V

- Vareda, J. P., Valente, A. J., Durães, L. (2019). Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: A review. *Journal of Environmental Management*, 246, 101-118.
- Velásquez, P., Montenegro, G., Leyton, F., Ascar, L., Ramirez, O., Giordano, A. (2020). Bioactive compound and antibacterial properties of monofloral Ulmo honey. *CyTA-Journal of Food*, 18(1), 11-19.
- Vergès, B.L. (1999). Dyslipidemia in diabetes mellitus. Review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. *Diabetes & Metabolism*, 25, 32-40.
- Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18-S25.

W

- Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013.
- Watford, M. (2002). Small amounts of dietary fructose dramatically increase hepatic glucose uptake through a novel mechanism of glucokinase activation. *Nutrition Reviews*, 60(8), 253.
- Wehbe, R., Frangieh, J., Rima, M., El Obeid, D., Sabatier, J. M., Fajloun, Z. (2019). Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*, 24(16), 2997.
- Wei, Y., Bizeau, M.E., Pagliassotti, M. J. (2004). An acute increase in fructose concentration increases hepatic glucose-6-phosphatase mRNA via mechanisms that are independent of glycogen synthase kinase-3 in rats. *Journal of Nutrition*, 134, 545-51.
- Wetwitayaklung, P., Wangwattana, B., Narakornwit, W. (2018). Determination of trace-elements and toxic heavy minerals in Thai longan, litchi and Siam weed honeys using ICP-MS. *International Food Research Journal*, 25(4).
- White, J. W. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 62, 509-514.
- WHO 2001. Environmental Health Criteria 224 - Arsenic and Arsenic Compounds. <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc018.htm>. Accessed on 8 April 2020.
- WHO 1992. Environmental Health Criteria 135 - Cadmium - Environmental Aspects. <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>. Accessed on 8 April 2020.
- Wilczyńska, A. (2014). Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey. *Food Science and Technology*, 57, 767-774.
- Winkler, O. (1955). Beitrag zum nachweis und zur bestimmung von oxymethylfurfutol in honig und kunsthonig. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 102, 161-167.

.....
Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8244-8259.

X

Xia, L. L., Zhu, Q. J., Wu, Y. G. (2017). Hepatoprotective effect of peony total glucosides and the underlying mechanisms in diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 2178-2187.

Y

Yagihashi, S., Mizukami, H., Sugimoto, K. (2011). Mechanism of diabetic neuropathy: where are we now and where to go? *Journal of Diabetes Investigation*, 2(1), 18-32.

Yale, J. F., Valiquett, T. R., Ghazzi, M. N., Owens-Grillo, J. K., Whitcomb, R. W., Foyt, H. L., Troglitazone Triple-Therapy Study Group*. (2001). The effect of a thiazolidinedione drug, troglitazone, on glycemia in patients with type 2 diabetes mellitus poorly controlled with sulfonylurea and metformin: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 134(9_Part_1), 737-745.

Z

Zappala, M., Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*, 16(3), 273-277.

Zarei, M., Fazlara, A., Tulabifard, N. (2019). Effect of thermal treatment on physicochemical and antioxidant properties of honey. *Heliyon*, 5(6), e01894.

Zbadi, R., Mohti, H., Moussaoui, F. (2018). Stress oxydatif: évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine Thérapeutique*, 24(2), 134-141.

Zerrouk, S., Seijo, M. C., Escuredo, O., Rodríguez-Flores, M. S. (2018). Characterization of *Ziziphus lotus* (jujube) honey produced in Algeria. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 166-174.

Zerrouk, S., Bahloul, R. (2020). Palynological and physicochemical properties of multifloral honey produced in some regions of Algeria. *Journal of Apicultural Research*, 1-10.

Zhang, S., Kumari, S., Gu, Y., Li, X., Meng, G., Zhang, Q., Niu, K. (2020). Honey consumption is inversely associated with prediabetes among Chinese adults: results from the Tianjin Chronic Low-Grade Systemic Inflammation and Health (TCLSIH) Cohort Study. *British Journal of Nutrition*, 124(1), 112-119.

Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X. R., Lin, L. T., Xiao, L. Y., Liu, C. Z. (2018). Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. *Toxicon*, 148, 64-73.

Zhou, J., Suo, Z., Pinpin, Z., Cheng, Ni., Gao, H., Jing, Z., Wei, C. (2013) Jujube Honey from China: Physico-chemical Characteristics and Mineral contents. *Journal of Food Science*, 78(3), 1750-3841.

- *Références Bibliographiques* –

Zhu, B., Shen, H., Zhou, J., Lin, F., Hu, Y. (2005). Effects of simvastatin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: a role for glomeruli protection. *Nephron Experimental Nephrology*, 101(1), e1-e8.

Research Article

Trace Elements and Heavy Metal Contents in West Algerian Natural Honey

Dalila Bereksi-Reguig,¹ Salim Bouchentouf ,^{2,3} Hocine Allali,¹ Agnieszka Adamczuk ,⁴ Grazyna Kowalska ,⁵ and Radosław Kowalski ,⁶

¹Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, P.O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria

²Doctor Tahar Moulay University of Saida Algeria, BP 138 Cité EN-NASR, Saida 20000, Algeria

³Laboratory of Natural and Bioactive Substances (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaid University, P.O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria

⁴Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, Lublin 20-290, Poland

⁵Department of Tourism and Recreation, University of Life Sciences in Lublin, 15 Akademicka Street, Lublin 20-950, Poland

⁶Department of Analysis and Food Quality Assessment, University of Life Sciences in Lublin, 8 Skromna Str., Lublin 20-704, Poland

Correspondence should be addressed to Radosław Kowalski; radoslaw.kowalski@up.lublin.pl

Received 16 November 2022; Revised 5 December 2022; Accepted 15 December 2022; Published 30 December 2022

Academic Editor: Alessandro Buccolieri

Copyright © 2022 Dalila Bereksi-Reguig et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Analysis of trace elements and heavy metals in honey is essential for honey quality and safety and also monitoring environmental pollution. This study aimed to evaluate the composition of thirty-seven honey samples of different botanical origins (14 multifloral and 23 unifloral) obtained from beekeepers located in the west region of Algeria. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and atomic absorption spectroscopy (AAS) methods were used to determine the levels of 19 elements in honey (K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn, V, Cr, Co, As, Ru, Rh, Cd, W, Pt, Au, and Pb). Ru, Rh, Pt and, Au were not detected in any of the tested honey samples. The most abundant minerals were K, Ca, Na, and Mg ranging within 153.00–989.00 mg/kg, 33.10–502.00 mg/kg, 13.30–281.00 mg/kg, and 20.80–162.00 mg/kg, respectively. Fe, Mn, Zn, and Cu were the most abundant heavy metals while Pb, V, Cr, W, Co, and Cd were the lowest ones (<1 mg/kg) in the honey samples surveyed. Several honey types, lavender, rosemary, mild white mustard, thyme, milk thistle, carob tree, orange tree, *Euphorbia*, *Eucalyptus*, camphor, jujube tree, sage, and harmal, were studied, and the statistical analysis was carried out using principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) techniques to evaluate the data. The results showed that the analyses of mineral content were sufficient to determine the floral origin and their variability may be related to geochemical and geographical differences. On other hand, all elements detected were at levels below safe thresholds.

1. Introduction

Bees are one of the most useful insects for humans: they pollinate our crops and produce honey [1, 2]. Nowadays, they play a new role in indicating pollution and the quality of the environment, through produced honey [3, 4]. The bee forages for several kilometers in search of nectar; on its way, its body accumulates particles of metals and pollutants present in the environment which it transports to the hive [5].

Contaminants can be anthropogenic or natural and may pollute the soil with different fractions in many ways [6]. Pollutants have been shown to be absorbed by plants growing in contaminated soil and have higher levels in their tissue compared to other plants grown in control soils [7, 8]. There is a close relationship between beehive products, notably honey, and plants, which means that honey inherits various characteristics and biological properties of plants with respect to their respective botanical sources and

growing surface [9]. Due to this relationship, undesirable compounds or residues can be found in honey if plants or soil have been exposed to these substances [10]. Among the most hazardous contaminants for human health and the environment which can be found in honey, we can cite heavy metals [11, 12]. They are found naturally in the Earth's crust, but their presence in the environment has increased due to high anthropogenic activity [13]. For several decades, it has been shown that exposure to metals implies serious damage [14]. Their bioaccumulation and amplification in living systems lead to undeniable effects and diseases [15, 16]. Qualitative and quantitative analyses of heavy metals in honey, in addition to the classical approach, would allow a reliable and reproducible system to establish the botanical origin [17] and geographic traceability [18]. The environmental aspect of a region has also been assessed using minerals and heavy metals present in honey [19]. Several studies have been conducted to establish the relationship between pollution in a region and the presence of contaminants in honey [20–22]. The main elements found in different kinds of honey throughout the world, considered as a profiling parameter, can be divided into two groups according to the literature: major elements or gold macroelements (Na, K, Ca, Mg, P, S, and Cl) and trace elements including heavy metals (Al, Cu, Pb, Zn, Mn, Cd, Tl, Co, Ni, Rb, Ba, Be, Bi, U, V, Fe, Pt, Pd, Te, Hf, Mo, Sn, Sb, La, I, Sm, Tb, Dy, Sd, Th, Pr, Nd, Tm, Yb, Lu, Gd, Ho, Er, Ce, Cr, As, B, Br, Cd, Hg, Se, and Sr) [20, 22–28]. The latter can affect the nervous system, kidney, liver, and respiratory functions. Some metals, such as cadmium, arsenic, nickel, and chromium, are carcinogenic [29]. Exposure to heavy metals is implicated in more severe pathologies like multiple sclerosis and neurodegenerative diseases (Alzheimer's and Parkinson's disease) [29–31]; they could even play a role in triggering psychological and neurological disorders such as autism [32]. It is also important to mention that the presence of certain minerals in honey is essential for the evaluation of its nutritional and curative quality [33]. Besides minerals and trace elements, honey is composed of various carbohydrates, polysaccharides, oligosaccharides, flavonoids, vitamins, minerals, waxes, aroma compounds, pollen grains, pigments, and enzymes which also contribute to its profiling and authentication [34]. In Algeria, honey is considered as a precious product because of its high nutritional value as well as its therapeutic virtues widely popular traditionally [35, 36]. The relatively mild climate in Algeria and abundant varied flora allow the production of a variety of honey [37]. According to the Algerian Center for Quality Control and Packaging (CACQE), national honey production was estimated in 2011 at 33,000 quintals and in the same year 150,000 tonnes of honey, mainly from China, India, and Saudi Arabia, were imported (CACQE, <https://www.cacqe.org/>). The growing interest in honey, which is considered as a noble substance, requires vigilance to its authenticity and originality to preserve national production, avoiding every sort of fraud. Based on multiple searches done on the PubMed database using different keywords, it is noteworthy that the number of studies on the physicochemical properties of Algerian honey, particularly in the west region, is

very scarce. The present study aims to identify major and trace elements contained in different samples of honey collected in west Algeria. Besides physicochemical methods, we used principal component analysis (PCA) and hierarchical clusters analysis (HCA) techniques to differentiate Algerian honey, from different botanical origins, according to their mineral content and the choice of elements with a higher discriminating power.

2. Materials and Methods

2.1. Honey Samples. A set of thirty-seven *Apis mellifera intermissa* honey samples (500 g each), namely, S1–S37, was collected in 2017 and 2018 from eight geographical provinces (Tlemcen, Ain Temouchent, Sidi Bel Abbes, Mostaganem, Mascara, Tيارت, Naâma, and Bechar) in west Algeria (Figure 1). Table 1 shows the botanical and geographical origins of the honey samples studied. Samples were taken directly from beekeepers with a guaranteed origin, stored in airtight plastic containers, and then kept in a refrigerator at 4 °C until ICP-MS and AAS analysis processes.

2.2. Reagents and Solution. High-purity deionized water acquired by passing distilled water through a water purification system (demineralizer HLP 20, Hydrolab, Poland) was used to prepare the solutions. Certified single-element standard solutions (1000 mg/L) used to prepare the calibration curve were of the highest purity grade (99.999%) and were supplied by Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA). Other reagents were of analytical grade unless otherwise stated. Honey samples were digested with Suprapur® grade nitric acid (HNO₃ 65% m/m, Merck, Germany). A recovery test was performed using a single-element solution and two reference materials, namely, Standard Reference Materials (SRMs) Tomato Leaves and Pine Needles (*Pinus taeda*) (SRM 1573a and SRM 1575a, resp., National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, USA).

2.3. Instrumentation. Elemental analysis was carried out by using 820-MS inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometer (ICP-MS; Varian, Mulgrave, Australia) equipped with an SPS3 autosampler (Varian, Australia) and a MicroMist nebulizer type (Varian). A MARS Express microwave mineralizer system (CEM, Matthews NC, USA) of Teflon reaction vessels was used in the digestion procedures. The reaction vessels were cleaned using 10 mL of concentrated nitric acid before each digestion. The multi-elemental determination was also determined by the atomic absorption spectroscopy (AAS) method using a spectrometer SpectrAA 280 FS with autosampler SPS3 (Varian, Australia), which was equipped with a deuterium lamp, hollow cathode lamp for each element, and an air-acetylene burner.

Appropriate results in terms of accuracy and sensitivity, low cost, and quickness make AAS a suitable procedure for determining the concentrations of alkaline and earth alkaline elements in the honey samples investigated. Tables 2 and 3 show the instrumental parameters for ICP-MS.

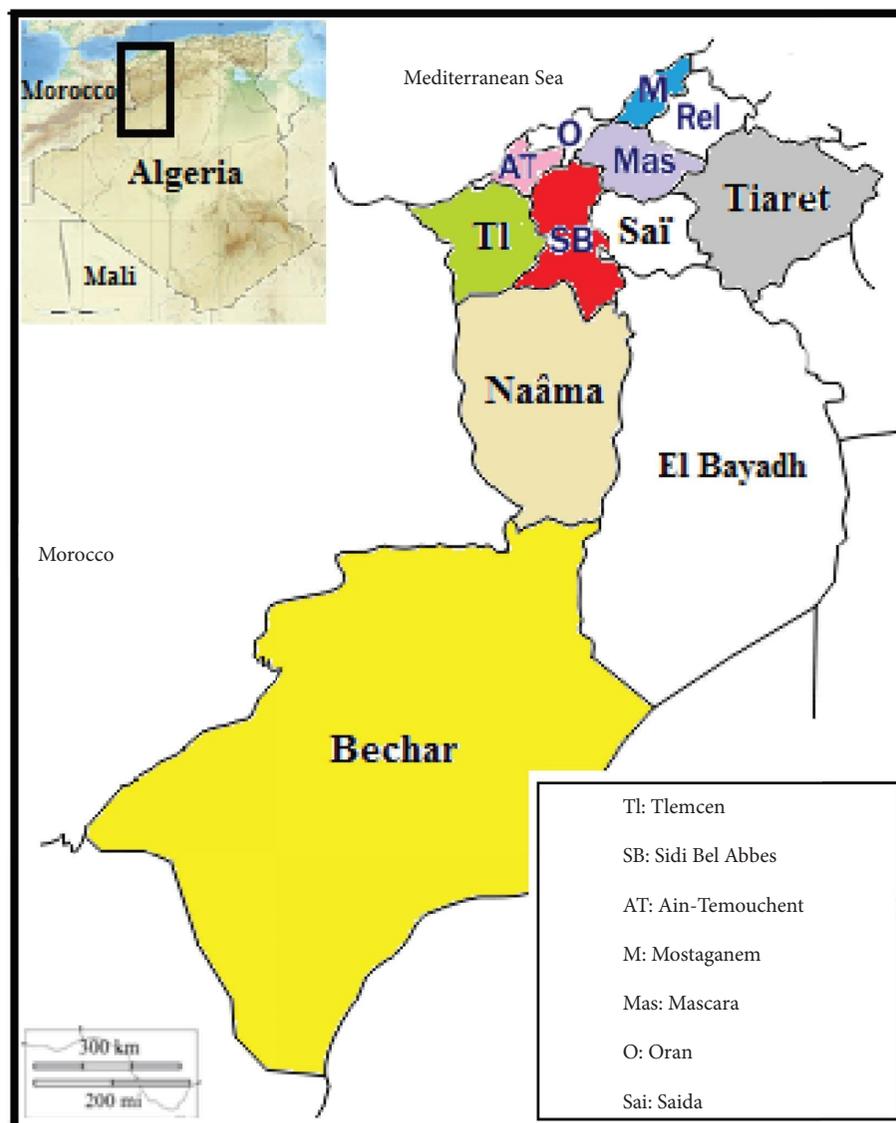


FIGURE 1: Locations of the sampling points in west Algeria.

2.4. Analytical Determination. Trace element and heavy metal determination was performed by the inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS) and atomic absorption spectroscopy (AAS) using the operating conditions and emission wavelength lines listed in Tables 2 and 3. Glass and plastic material was cleaned and kept in 10% (v/v) nitric acid solution for at least two days. The material was then rinsed three times with high-purity deionized water before being used. Approximately 0.5 g of each honey sample was digested with 10 mL of 65% HNO₃ (v/v) in Teflon vessels. The sealed vessels were put into the microwave mineralizer MARS Express (CEM, USA). A blank digest was carried out in the same way. The microwave mineralization was performed stepwise at 400 W and 363 K, at 800 W and 393 K, and at 1600 W and 483 K. The cooled digestion solution was then diluted to 50 mL using high-purity deionized water. This solution was finally used for the

determination of V, Cr, Co, As, Ru, Rh, Cd, W, Pt, Au, and Pb of the honey samples, performed with an inductively coupled plasma-mass spectrometer equipped with a concentric nebulizer, a quartz torch with quartz injector tube, and cyclonic spray chamber (Table 2). The concentration of K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, and Zn ions was determined by the AAS method using a spectrometer SpectrAA 280 FS with autosampler SPS3 (Table 3). To avoid sample ionization during potassium analysis, Schinkel buffer solution (mixture contents: 10 g/L cesium chloride and 100 g/L lanthanum chloride) was used. Each sample was measured in triplicate by AAS and ICP-MS detection.

2.5. Quality Control. The analytical quality was controlled by means of certified reference materials: NIST-1573a Tomato Leaves and NIST-1575a Pine Needles. The certified reference

TABLE 1: Geographical origins of honey samples from western regions of Algeria.

Region	Sample	Floral type	Scientific name	Family	Location	Season/year of harvest
Tlemcen						
	S1	Lavender	<i>Lavandula vera</i> D.C.	<i>Lamiaceae</i>	Sidi Djillali	Summer 2018
	S2	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Sidi Djillali	Spring 2018
	S3	Multifloral	Multifloral	—	Sidi Djillali	Spring 2018
	S4	Multifloral	Multifloral	—	Sidi Djillali	Summer 2017
	S5	Multifloral	Multifloral	—	El Aricha	Summer 2017
	S6	Mild white mustard	<i>Sinapis alba</i> L.	<i>Brassicaceae</i>	Ain Fezza	Summer 2017
	S7	Thyme	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Beni Snous	Spring 2018
	S8	Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	<i>Asteraceae</i>	Beni Snous	Summer 2018
	S9	Multifloral	Multifloral	—	Oued Chouly	Autumn 2017
	S10	Carob tree	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	<i>Fabaceae</i>	Oued Chouly	Autumn 2017
	S11	Thyme	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Beni Mester	Spring 2017
	S12	Carob tree	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	<i>Fabaceae</i>	Beni Ghazli	Spring 2017
	S13	Multifloral	Multifloral	—	Oued es Safsâf	Summer 2018
	S14	Multifloral	Multifloral	—	Sebaa Chioukh	Spring 2017
	S15	Multifloral	Multifloral	—	Hennaya	Summer 2017
	S16	Orange tree	<i>Citrus sinensis</i> L.	<i>Rutaceae</i>	Remchi	Spring 2017
	S17	Multifloral	Multifloral	—	Honaïne	Spring 2018
	S18	Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	<i>Asteraceae</i>	Honaïne	Summer 2018
Ain Temouchent						
	S19	Multifloral	Multifloral	—	Oulhaça El Gherarba	Spring 2018
	S20	Multifloral	Multifloral	—	Beni Ghanem	Summer 2018
	S21	Multifloral	Multifloral	—	Bouzedjar	Spring 2018
Sidi Bel Abbes						
	S22	<i>Euphorbia</i>	<i>Euphorbia</i> L.	<i>Euphorbiaceae</i>	Ras El Ma	Spring 2017
	S23	Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	<i>Asteraceae</i>	Telagh	Spring 2017
	S24	Multifloral	Multifloral	—	Lamtâr	Spring 2017
	S25	<i>Eucalyptus</i>	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	<i>Myrtaceae</i>	Sidi Brahim	Spring 2017
Mostaganem						
	S26	Camphor	<i>Cinnamomum camphora</i> L.	<i>Lauraceae</i>	Sidi Ali	Autumn 2017
	S27	<i>Eucalyptus</i>	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	<i>Myrtaceae</i>	Mostaganem	Summer 2017
	S28	Orange tree	<i>Citrus sinensis</i> L.	<i>Rutaceae</i>	Bouguirat	Spring 2017
Mascara						
	S29	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Djebel Stamboul	Spring 2017
Tiaret						
	S30	Multifloral	Multifloral	—	Tiaret	Spring 2018
Naâma						
	S31	Multifloral	Multifloral	—	Aïn Sefra	Spring 2017
	S32	Jujube tree	<i>Ziziphus lotus</i> L.	<i>Rhamnaceae</i>	Aïn Sefra	Spring 2017
	S33	Jujube tree	<i>Ziziphus lotus</i> L.	<i>Rhamnaceae</i>	Aïn Ben Khelil	Spring 2017
	S34	Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Naâma	Spring 2017
	S35	Harmal	<i>Peganum harmala</i> L.	<i>Zygophyllaceae</i>	Mecheria	Spring 2017
Bechar						
	S36	Multifloral	Multifloral	—	Djebel Antar	Winter 2017
	S37	Mild white mustard	<i>Sinapis alba</i> L.	<i>Brassicaceae</i>	Oued Zouzfana	Spring 2017

TABLE 2: Operating ICP-MS conditions.

Radio frequency power (W)	1370
Plasma gas flow rate (L/min)	18
Auxiliary gas flow rate (L/min)	1.70
Spray chamber T (°C)	2
Nebulizer gas flow (L/min)	1
Number of replicates	3

TABLE 3: Operating AAS conditions.

Elements	Na	Mg	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
Fuel flow (L/min)	2	2	2	2	2	2	2	2
Lamp current (mA)	—	4	—	10	5	5	4	5
Wavelength (nm)	589.0	202.6	766.5	422.7	279.5	248.3	324.8	213.9
Slit width (nm)	0.2	1.0	0.2	0.5	0.2	0.2	0.5	1.0
Air flow (L/min)	10	10	10	10	10	10	10	10

materials were prepared according to the instructions of the manufacturer. Honey samples and quality control samples (blind samples and certified reference materials) were determined in triplicate, and the average was given as the final result. Table 4 presents the validation parameters obtained during analysis. For Au, Pt, Rh, Ru, and W, the recovery parameter was obtained from fortification by using certified single-element standard solutions.

2.6. Statistical Method. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were performed with the XLSTAT 2014.5.03 software for Microsoft Excel (Addinsoft, Bordeaux, France) to classify and discriminate the honey samples.

3. Results and Discussion

3.1. Results of Minerals in Honey Samples. The concentrations of trace element and heavy metals found in the honey samples collected from thirty-seven locations situated in west Algeria are given in Tables 5 and 6. Validation parameters of the analytical procedure such as: limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy, and uncertainty budget are listed in Table 4. A detailed validation of the analytical procedure was performed including the performance parameters limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ); precision, accuracy, and an uncertainty budget (Table 4).

Precision and percentage recovery of the analytical procedure were determined by using randomly selected honey samples individually spiked with known spiked concentrations of the trace elements and heavy metals studied (K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn, V, Cr, Co, As, Ru, Rh, Cd, W, Pt, Au, and Pb) and used as positive controls. The mean percentage recoveries of the determined trace elements and heavy metals ranged between 74.51% (Co) and 117.32% (Fe) (Table 4), which point out good accuracy, precision, and validity of the method employed. The results of mineral content in honey were found relatively low and varied over a range within 0.04–0.16% of the total composition, which is in agreement with the composition of nectar honey [22, 38]. A total of 19 trace elements and heavy metals were determined. It should be noted that the concentrations of 19 elements were variable depending on the floral origin of honey [19]. Among them, the most abundant elements were K, Ca, Na, and Mg with average levels (mean \pm SD) of 532.46 \pm 212.69 mg/kg, 113.92 \pm 95.38 mg/kg, 83.40 \pm 64.85 mg/kg, and 100.83 \pm 33.88 mg/kg, respectively. The west Algerian honey samples in the present

investigation showed a wide range of K contents (153.00–989.00 mg/kg) accounting for 80.08% of the total minerals present in honey from Bouzedjar (S21). Following our data, similar amounts of K in honey samples were previously reported from the Azilal and Beni Mellal provinces in Moroccan (256–1023 mg/kg) [39] and Tunisian (172.48–976.75 mg/kg) honey [40]. Overall, the concentrations of K in west Algerian honey were higher than those reported from Turkey (1.18–268 mg/kg) [20], the West Bank in Palestine (42.80–585.00 mg/kg) [41, 42], and Jableh and Tartous provinces in the western part of Syria (38.2–174 mg/kg) [43], but the levels were lower than those reported for Portugal (117.55–2590.60 mg/kg) [44, 45], Italy (237–6520 mg/kg) [23, 25], Libya (1120.1–1980.6 mg/kg) [46], and Spain (1615–3770 mg/kg) [47–52]. *Eucalyptus* honey showed the second highest concentration (987.00 mg/kg, S27) of K among the honey samples investigated while carob tree honey contained the lowest amount (153.00 mg/kg, S12). High concentrations of K were also present in the mild white mustard (946.00 mg/kg, S6), lavender (808.00 mg/kg, S1), and milk thistle (802.00 mg/kg, S23) honey when compared to the other honey samples studied. The concentration of K in the present study is also much higher than the three *Citrus* spp. (*Citrus*) honey samples from Syria (38.2–174 mg/kg) [43]. This discrepancy may be due to the geographical variation in the sources of honey [52]. A high mean value (113.92 \pm 95.38 mg/kg) of Ca was observed among the investigated west Algerian honey samples with the concentrations ranging within (33.10–502.00 mg/kg) which were higher than those of honey samples reported for Morocco (19.71–200.1 mg/kg) [39], Tunisia (113.85–221.07 mg/kg) [40], Portugal (6.24–134.35 mg/kg) [44, 45], Spain (11.69–218.5 mg/kg) [47–49, 52], France (8.90–130.90 mg/kg) [53, 54], Italy (<43–283 mg/kg) [23, 25], Turkey (<0.001–4.5 mg/kg) [20], Palestine (44.50–150.70 mg/kg) [41, 42], Syria (43.3–118 mg/kg) [43], Greece (15.22–65.93 mg/kg), Cyprus (23.66–143.47 mg/kg), and Egypt (44.79–112.10 mg/kg) [26] (Tables 7 and 8). Besides, honey samples collected from different locations in the west of Libya show the highest concentrations with a range within (923.92–1117.5 mg/kg) [46] of all the Mediterranean regions considered. It would be interesting, due to the presence of the high amount of this mineral, to propose it in a strategy for the prevention of osteoporosis. Sage honey showed the highest concentration (502.00 mg/kg, S34) of Ca, followed by multifloral honey (377.00 mg/kg, S14), *Eucalyptus* honey (287.00 mg/kg, S25), and milk thistle honey (215.00 mg/kg, S23). Interestingly, there are some similarities between the Ca contents of some types of west Algerian honey and those coming from

TABLE 4: Validation parameters of the analytical procedure for determination of minerals.

Element	Certified reference material analysis		Validation parameters			
	The result declared by the manufacturer	The result obtained in own research	LOD	LOQ	Recovery (%)	Uncertainty (%)
As ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	112.6 ^a 39 ^b	112.21 42.10	0.5	1.0	100.35 92.64	16 21
Au ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	—	—	2.3	4.6	109.12	26
Ca (mg/kg)	50450 ^a 2500 ^b	53700.23 2356.45	12.1	24.2	93.95 106.09	17 19
Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1517 ^a 233 ^b	1498.03 276.20	0.1	0.2	101.27 84.36	13 16
Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	577.3 ^a 61 ^b	774.82 62.76	0.1	0.2	74.51 97.20	18 20
Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1988 ^a 61 ^b	2123.20 62.76	8.0	16.0	93.63 97.20	11 14
Cu (mg/kg)	4.7 ^a 2.8 ^b	4.92 3.1	0.7	1.4	95.68 90.32	19 25
Fe (mg/kg)	367.5 ^a 46 ^b	391.09 39.21	3.7	7.2	93.97 117.32	10 15
K (mg/kg)	26760 ^a 4170 ^b	30207.00 4376.00	23.2	46.4	88.59 95.29	15 14
Mg (mg/kg)	12000 ^a 2610 ^c	12096.00 2734.00	9.3	18.6	99.21 95.46	17 12
Mn (mg/kg)	246.3 ^a 488 ^b	242.02 460.50	0.5	1.0	101.77 105.97	19 11
Na (mg/kg)	136.1 ^a 63 ^b	157.15 67.89	6.0	12.0	86.61 92.80	14 20
Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	167 ^b	163.58	0.2	0.4	102.09	23
Pt ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	—	—	3.0	6.0	107.12	24
Ru ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	—	—	2.5	5.0	85.34	33
Rh ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	—	—	2.2	4.4	105.23	28
V ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	835 ^a	867.58	0.4	0.8	96.24	25
W ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	—	—	4.1	8.2	88.12	35
Zn (mg/kg)	30.94 ^a 38 ^b	36.49 38.50	0.1	0.2	84.79 98.70	21 16

^a NIST-1573a Tomato Leaves Standard Reference Materials; ^b NIST-1575a Pine Needles (Pinus taeda) Standard Reference Materials; ^c Certified single-element standard solutions.

neighboring countries. For instance, the Ca concentration of *Eucalyptus* honey is similar to that of carob honey from Rabat province in Morocco (286.01 ± 5.79 mg/kg) [55], while milk thistle honey has a similar Ca concentration when compared to the Tunisian mint honey (221.07 ± 5.16 mg/kg) [40]. The concentrations of Na in the west Algerian honey samples were higher than those reported for honey from Portugal (0.36–95.13 mg/kg) [45], Spain (11–84 mg/kg) [51], Italy (4.8–176 mg/kg) [23, 25], and Turkey (0.48–13.1 mg/kg) [20]. *Euphorbia* and *Eucalyptus* honey contained the highest concentrations of Na (281.00 mg/kg, S22; 275.00 mg/kg, S25, resp.) among the honey types while thyme, lavender, and milk thistle honey had the lowest amounts (13.30 mg/kg, S7; 21.60 mg/kg, S1; 22.10 mg/kg, S8, resp.). Other types of west Algerian honey such as orange tree, jujube tree, and mild white mustard honey samples are also rich in Na (179.00 mg/kg, S28; 165.00 mg/kg, S32; 146.00 mg/kg, S6, resp.) when compared to the other honey samples investigated. On the other hand, it should be noted that the higher concentrations of K and Na were exhibited by mild white mustard honey collected from Ain Fezza (S6) located in Tlemcen province

(Table 1). The high content of both K and Na in mild white mustard honey makes it less dangerous when consumed by hypertensive patients. Magnesium was the fourth most abundant element in the present study, with contents ranging from 20.80 to 162.00 mg/kg. These concentrations were similar to those of Italian honey (22–159 mg/kg) as reported by Pisani et al. [23] and were higher than those coming from most countries of the Mediterranean region (Table 7) except honey from Portugal (2.77–234.63 mg/kg) [45] and Spain (30.00–402.00 mg/kg) [51]. Milk thistle honey contained the highest concentration (162.00 mg/kg, S8) of Mg among the honey samples investigated, while multifloral honey samples S24 and S36 (20.80 mg/kg and 42.50 mg/kg, resp.) contained the lowest. High concentrations of Mg were also exhibited by thyme (159.00 mg/kg, S7), mild white mustard (149.00 mg/kg, S6), and lavender (142 mg/kg, S1) honey types, which are similar to the honey from Spain (159 mg/kg) [23] and France (145 mg/kg) [54]. In the case of Fe, its concentrations in the west Algerian honey ranged from 8.48 to 59.60 mg/kg. Honey samples from the Mediterranean countries reported lower Fe contents

TABLE 5: Distribution data for Cr, Co, V, W, Ru, Rh, Pt, Au, As, Cd, and Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in west Algerian honey.

Sample	Cr ^{b,c}	Co ^{b,c}	V ^{b,c}	W ^{b,c}	Ru ^{b,c}	Rh ^{b,c}	Pt ^{b,c}	Au ^{b,c}	As ^b	Cd ^{b,c}	Pb ^{b,c}
S1	70.11	9.01	8.62	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	1.27	21.44
S2	55.56	8.73	9.00	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.93	0.83	16.62
S3	38.73	10.33	4.83	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	7.70	1.09	9.73
S4	37.20	12.14	10.04	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	21.56	0.36	0.54
S5	34.07	20.80	6.88	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	3.38	0.90	20.25
S6	56.21	4.57	7.30	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.70	0.79	21.05
S7	27.63	5.96	1.57	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	1.75	8.14	9.87
S8	45.89	4.73	4.94	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	18.20	0.24	— ^d
S9	41.02	17.32	6.00	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.05	0.54	11.94
S10	87.37	12.67	7.29	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	5.36	0.55	14.83
S11	43.74	6.61	79.73	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	3.95	1.50	23.20
S12	53.39	1.45	4.48	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	5.54	0.77	10.78
S13	59.05	3.36	5.12	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.80	0.97	9.21
S14	74.83	4.20	13.98	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	6.43	1.04	13.75
S15	29.60	3.56	6.52	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	5.27	1.26	17.93
S16	38.58	1.02	1.44	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	1.61	1.05	12.84
S17	39.84	0.36	2.10	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	1.68	— ^d	132.73
S18	41.39	3.29	3.42	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	6.28	1.14	15.28
S19	55.46	5.77	13.84	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	6.31	0.84	14.39
S20	34.15	2.82	3.23	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	5.93	0.83	10.18
S21	42.62	4.60	10.26	10.65	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	6.68	3.38	89.44
S22	39.17	8.42	4.58	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	6.23	1.43	14.23
S23	46.89	5.25	9.09	17.18	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	7.73	0.41	40.55
S24	30.18	3.25	6.40	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	6.28	0.98	14.95
S25	29.13	4.18	4.55	11.10	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	8.19	0.86	24.57
S26	58.86	7.82	106.51	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	3.95	0.69	9.74
S27	27.36	3.07	4.75	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.92	0.90	26.52
S28	37.06	7.04	7.68	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	7.38	0.56	11.15
S29	27.81	1.89	0.81	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	2.70	1.05	11.91
S30	37.61	16.64	7.65	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	2.81	2.94	91.36
S31	62.04	17.78	27.11	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	10.41	1.14	24.70
S32	53.73	16.95	15.35	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	5.64	0.89	21.32
S33	50.33	12.11	11.62	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	2.90	0.99	20.95
S34	44.25	12.94	10.24	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.35	1.00	74.99
S35	72.11	21.19	16.47	24.30	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	8.30	0.84	16.41
S36	55.96	1.01	44.33	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.95	1.02	8.21
S37	47.23	6.74	12.37	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	3.96	1.19	27.30
Statistics											
Mean	46.65	7.83	13.52	15.81	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	5.86	1.23	24.73
Max.	87.37	21.19	106.51	24.30	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	21.56	8.14	132.73
Min.	27.36	0.36	0.81	10.65	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	1.61	0.24	0.54
SD	14.43	5.82	21.05	4.93	— ^d	— ^d	— ^d	— ^d	4.03	1.32	27.59

^{b,c}trace elements/heavy metals; ^dconcentrations were lower than LOQ; SD: standard deviation.

(Table 7). It is to highlight that the highest Fe levels were found in lavender honey (59.60 mg/kg, S1), while multiflora (8.48 mg/kg, S24), *Eucalyptus* (11.30 mg/kg, S25), and milk thistle (11.70 mg/kg, S8) honey had the lowest contents. Our values were well below the provisional tolerable weekly intake (PTWI) by body weight (5.6 mg/kg b.w.) recommended by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [56]. The concentration of Mn in the investigated west Algerian honey was between 1.36 and 13.90 mg/kg. Among the honey samples investigated, mild white mustard honey is the richest in Mn (13.90 mg/kg, S6). High concentrations of Mn were also shown by the milk thistle and lavender honey (13.40 mg/kg, S18; 13.30 mg/kg, S1, resp.) as well as thyme (12.70 mg/kg, S7) honey. The levels of Mn in honey samples surveyed in this study were

higher than those reported for most honey samples coming from the Mediterranean region (Table 7). In the present study, the Zn concentrations ranged from 0.22 to 13.90 mg/kg (mean \pm SD 3.61 \pm 2.35 mg/kg). The highest Zn level was 13.90 mg/kg in carob tree honey (S10), while the lowest one was 0.22 mg/kg in multiflora honey (S5). The levels of Zn in the west Algerian honey are lower than those from Palestine (0.13–25.20 mg/kg and 1.00–19.90 mg/kg) [41, 42], respectively, but are higher than those from Morocco (\leq 0.1–0.69 mg/kg) [39], Tunisia (0.42–2.06 mg/kg) [40], Portugal (0.03–3.29 mg/kg) [45], Spain (2.34–3.47 mg/kg) [50], France (nd–1.4 mg/kg) [54], Italy (0.72–3.66 mg/kg) [23], Turkey (<1–237 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [20], Greece (0.97–9.30 mg/kg), Cyprus (0.86–6.94 mg/kg), Egypt (0.55–1.68 mg/kg) [26], and Syria (0.206–2.76 mg/kg) [43]. In the case of the

TABLE 6: Distribution data for K, Na, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe, and Zn (mg/kg) in west Algerian honey.

Sample	K ^a	Na ^a	Ca ^a	Mg ^a	Cu ^{b,c}	Mn ^{b,c}	Fe ^{b,c}	Zn ^{b,c}	Total minerals
S1	808.00	21.60	56.20	142.00	3.66	13.30	59.60	2.62	1107.58
S2	460.00	49.20	58.50	126.00	5.70	10.80	24.50	2.39	737.53
S3	418.00	37.00	64.90	142.00	4.46	11.10	24.40	4.41	706.68
S4	451.00	30.70	73.60	92.70	9.62	7.67	26.10	3.38	695.19
S5	327.00	34.10	50.60	77.60	— ^d	5.52	19.60	0.22	514.92
S6	946.00	146.00	104.00	149.00	5.92	13.90	23.20	3.39	1392.47
S7	241.00	13.30	33.10	159.00	5.08	12.70	22.60	5.29	492.53
S8	790.00	22.10	97.80	162.00	4.81	10.50	11.70	4.42	1104.26
S9	441.00	97.80	85.80	88.80	— ^d	7.85	34.60	9.33	765.57
S10	667.00	64.40	205.00	120.00	7.86	10.80	57.30	13.90	1147.04
S11	589.00	104.00	102.00	79.00	3.44	7.61	33.70	4.98	924.28
S12	153.00	15.30	33.50	116.00	2.80	11.50	24.30	3.08	359.77
S13	572.00	102.00	104.00	127.00	1.66	13.70	16.30	4.99	942.24
S14	989.00	77.10	377.00	137.00	— ^d	11.50	17.60	3.45	1613.00
S15	722.00	32.30	99.90	69.10	5.29	1.36	26.80	0.62	957.88
S16	254.00	62.30	81.10	89.20	1.95	9.26	26.00	4.37	528.41
S17	375.00	129.00	33.30	134.00	7.16	12.10	14.90	4.59	710.58
S18	526.00	68.20	53.80	133.00	— ^d	13.40	21.60	5.20	821.65
S19	400.00	110.00	119.00	118.00	2.13	8.12	22.60	2.33	782.65
S20	247.00	26.50	70.00	112.00	— ^d	10.20	25.10	2.29	493.45
S21	776.00	23.60	80.80	51.60	6.08	3.83	24.00	2.59	969.00
S22	675.00	281.00	100.00	99.50	6.61	7.38	18.10	3.30	1191.51
S23	802.00	71.70	215.00	55.30	4.67	1.47	26.20	3.63	1180.73
S24	425.00	156.00	101.00	20.80	— ^d	1.93	8.48	1.87	715.40
S25	777.00	275.00	287.00	77.80	— ^d	1.69	11.30	2.82	1433.12
S26	470.00	92.50	132.00	57.00	4.17	9.25	21.10	3.41	789.77
S27	987.00	23.60	165.00	124.00	7.25	6.55	21.80	4.75	1340.80
S28	338.00	179.00	91.00	66.80	— ^d	6.50	19.10	2.46	703.31
S29	384.00	102.00	77.70	85.40	5.46	8.63	26.30	3.17	692.92
S30	471.00	44.30	70.70	78.40	4.88	3.45	24.10	1.44	699.04
S31	504.00	64.60	90.80	80.20	3.75	6.10	35.80	2.75	788.61
S32	442.00	165.00	117.00	92.80	3.59	4.70	38.30	3.62	867.55
S33	510.00	51.20	70.70	123.00	8.97	6.15	29.50	1.78	801.68
S34	441.00	114.00	502.00	111.00	— ^d	3.90	25.60	3.68	1201.59
S35	460.00	66.10	71.90	98.60	2.52	7.28	29.60	2.69	739.34
S36	411.00	35.90	49.00	42.50	— ^d	6.46	28.00	2.58	576.28
S37	452.00	97.40	90.50	92.60	2.78	5.87	15.40	1.93	758.88
Statistics									
Mean	532.46	83.40	113.92	100.83	4.90	7.95	25.28	3.61	871.55
Max.	989.00	281.00	502.00	162.00	9.62	13.90	59.60	13.90	1613.00
Min.	153.00	13.30	33.10	20.80	1.66	1.36	8.48	0.22	359.77
SD	212.69	64.85	95.38	33.88	1.65	3.66	10.39	2.35	290.66

^aMajor elements; ^btrace elements; ^{b,c}trace elements/heavy metals; ^dconcentrations were lower than LOQ; SD: standard deviation.

concentrations of Zn, up 91% of our honey samples are in the maximum tolerable weekly intake range (2.1–7 mg/kg b.w.) [56]. The concentrations of Cu in the west Algerian honey ranged from 1.66 to 9.62 mg/kg (mean \pm SD 4.90 \pm 1.64 mg/kg). The highest concentrations of Cu were in multifloral, jujube tree, and carob tree honey (9.62 mg/kg, S4; 8.97 mg/kg, S33; and 7.86 mg/kg, S10, resp.), but Cu was not detected in more than a quarter of the investigated honey. Unfortunately, the levels in approximately 54% of the investigated honey samples are above the PTWI (3.5 mg/kg b.w.) for Cu established by Joint FAO/WHO [56]. Generally, Cu is transferred and accumulated in food under the influence of the environment and also due to human contributions (fertilizers and pesticides) [57]. Copper levels in

west Algerian honey are slightly higher than those from Morocco (\leq 0.1 mg/kg) [39], Tunisia (0.12–0.34 mg/kg) [40], Portugal (0.00–5.35 mg/kg) [45], France (0.06–1.71 mg/kg) [53], and other Mediterranean countries (Table 7). In summary, *Eucalyptus* honey contained the highest K and Na values. Sage honey is rich in Ca while milk thistle honey is rich in Mg. Lavender honey contained high Fe levels while the carob tree is the richest in Zn. Our study shows also that the mild white mustard honey contained highest level of Mn, whereas jujube tree and carob tree honey comprised Cu in high concentrations. Generally, the west Algerian honey samples are rich in minerals. The latter contains a significant proportion of microelements and therefore are valuable food products. These latter are a significant fraction of

TABLE 7: A comparison among reports regarding mineral content in honey samples from Mediterranean regions.

Element	Present study	Morocco [38] N=29	Morocco [55] N=8	Tunisia [39] N=6	Portugal [43] N=38	Portugal [44] N=16	Spain [46] N=40	Spain [47] N=8	Spain [48] N=60	Spain [49] N=140	Spain [50] N=41
Cr	27.36–87.37 µg/kg	—	—	0.02–0.32	—	—	—	—	0.049–4.480	—	—
Co	0.36–21.19 µg/kg	—	nd	—	—	—	—	—	0.015–0.720	—	—
V	0.81–106.51 µg/kg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
W	10.65–24.30 µg/kg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ru	‘LOQ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rh	‘LOQ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pt	‘LOQ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Au	‘LOQ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
As	1.61–21.56 µg/kg	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cd	0.24–8.14 µg/kg	—	nd	—	—	—	—	—	nd–0.355	4.21–4.56 µg/kg	—
Pb	0.54–132.73 µg/kg	≤0.1	nd	0.01–0.05	—	—	—	—	—	46.32–31.50 µg/kg	—
K	153.00–989.00	256–1023	644.02–1883.15	172.48–976.75	117.55–2590.60	42.98–1352.90	434.1–1935	545.45–5570.73	514–6785	—	1615–3770
Na	13.30–281.00	18.81–118.74	367.52–855.24	251.34–521.22	90.22–727.79	0.36–95.13	11.69–218.5	9.18–151.65	38–476	—	11–84
Ca	33.10–502.00	19.71–200.1	129.35–688.43	113.85–221.07	6.24–134.35	2.77–234.63	42.59–341.0	15.14–181.69	107–420	—	68–476
Mg	20.80–162.00	19.85–45.84	18.42–131.21	—	10.62–70.41	1.79–230.81	13.26–74.38	42.11–1078.95	19–173	—	30–402
Cu	1.66–9.62	≤0.1	0.11–1.82	0.12–0.34	—	0.00–5.35	0.531–2.117	nd	0.547–2.300	0.74–1.88	1–7
Mn	1.36–13.90	0.28–1.74	—	—	—	0.00–22.62	0.133–9.471	—	3.4–45	—	—
Fe	8.48–59.60	1.46–13.95	0.71–4.68	0.83–3.54	—	0.18–2.68	—	nd–7.07	0.71–60	2.26–4.70	0–7
Zn	0.22–13.90	≤0.1–0.69	1.41–4.26	0.42–2.06	—	0.03–3.29	1.332–7.825	0.30–7.06	0.93–5.9	2.34–3.47	0–7

From each report, the min-max range is mentioned. All values are in mg/kg, unless stated otherwise. nd: not detected; ‘LOQ: concentrations were lower than LOQ; N: the number of honey samples.

TABLE 8: A comparison among reports regarding mineral content in honey samples from Mediterranean regions.

Element	Spain [51] N = 25	France [53] N = 86	France [54] N = 40	Italy [24] N = 40	Italy [22] N = 51	Turkey [19] N = 71	Greece [25] N = 12	Cyprus [25] N = 14	Egypt [25] N = 8	Palestine [40] N = 21	Palestine [41] N = 10	Syria [42] N = 6	Libya [45] N = 8
Cr	—	0.08–0.36	—	10–328	—	<1 µg/kg	<0.12	<0.12	<0.12	0.00–0.51	—	<0.018–0.054	—
Co	—	0.10–0.23	—	1.0–17	2.9–30.2	—	<0.03	<0.03	<0.03	—	—	—	—
V	—	—	—	<3–24	—	—	<0.11	<0.11	<0.11	—	—	—	—
W	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ru	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rh	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Au	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
As	—	—	nd–8.0	<25	2.8–11.1	—	<0.08	<0.08	<0.08	—	—	—	0.006–0.018
Cd	—	0.08–0.25	1–22	1.3–4.2	1.0–15.3	<1 µg/kg	<0.05	<0.05	<0.05	—	—	—	0.125–0.150
Pb	—	0.28–1.08	3–101	9–209	28–304	<1 µg/kg	<0.08	<0.08	<0.08	—	0.51–0.94	<0.082	2.42–10.98
K	261–1380	—	—	237–6520	178–4140	1.18–268	—	—	—	42.80–585.00	203.92–495.48	38.2–174	1120.1–1980.6
Na	256–501	—	—	4.8–176	60–147	0.48–13.1	—	—	—	41.80–306.30	35.19–196.51	—	506.8–804.6
Ca	110–248	8.90–130.90	36–219	<43–283	159–373	<0.001–4.5	15.22–65.93	23.66–143.47	44.79–112.10	44.50–150.70	64.49–138.41	43.3–118	923.92–1117.5
Mg	37–139	3.62–68.78	33–145	6.2–148	22–159	—	20.13–109.53	9.24–80.48	12.17–22.04	12.30–46.70	20.48–54.15	—	—
Cu	—	0.06–1.71	—	0.06–5.4	0.20–2.79	<1–929 µg/kg	<0.35	<0.35	<0.35	0.00–1.52	0.61–1.22	0.616–2.21	—
Mn	—	0.11–42.81	1.4–12.8	0.09–2.8	0.13–16.9	<1–274 µg/kg	0.26–5.54	0.07–4.11	0.17–0.55	0.11–0.99	—	0.153–1.69	—
Fe	—	0.56–86.76	—	<1–4.4	1.0–6.3	<1–7254.62 µg/kg	0.75–4.16	0.96–3.97	2.18–8.45	2.00–10.80	2.25–8.75	1.46–16.9	—
Zn	—	0.17–6.42	nd–1.4	<0.5–8.9	0.72–3.66	<1–237 µg/kg	0.97–9.30	0.86–6.94	0.55–1.68	1.00–19.90	0.13–25.20	0.206–2.76	—

From each report, the min-max range is mentioned. All values are in mg/kg, unless stated otherwise. nd: not detected; † LOQ: concentrations were lower than LOQ; N: the number of honey samples.

micronutrients making honey valuable food products. Some of these elements are vital, and others are merely desirable or beneficial. Indeed, they have significant roles in the activation of certain enzymes; these include Mg, Fe, Mn, Zn, and Cu, which play an important role in the metabolic transformations in the human body, while K, Ca, and Na are essential in building strong bones and teeth, muscle contractions, nerve signals, regulating heartbeat, and fluid balance within cells [58]. Their deficiencies play critical roles in many disorders such as hypertension and osteoporosis [59]. Some honey samples studied are important sources of micronutrients useful to the proper functioning of the human body, and therefore their consumption is highly recommended, especially in case of deficiency. To verify the quality of the west Algerian honey, in addition to Mn, Fe, Zn, and Cu, it is very important to assess and monitor the concentrations of other heavy metals and metalloids, which are potentially toxic. They include arsenic, lead, chromium, cadmium, vanadium, tungsten, cobalt, ruthenium, rhodium, platinum, and gold. In the present study, the relative concentrations of these elements in the honey samples decreased in the following order: Pb > V > Cr > W > As > Co > Cd > Ru, Rh, Pt, and Au. All of them were detected at levels <1 mg/kg. The resulting data, summarized in Table 5, were consistent with the ranges indicated for honey from other studies [20, 26, 50, 53, 60]. Lead is considered a strict contaminant and is toxic to living organisms, even at very low concentrations. Its content in honey is examined in several studies. The range values of Pb content in honey samples from the west Algerian region were 0.54–132.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pb was found at high concentrations in the multifloral honey samples (132.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S17; 91.36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S30; and 89.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S21) and was absent in milk thistle (S8). Furthermore, the observed concentrations of Pb were higher than those measured in Morocco (≤ 0.1 mg/kg) [38], Tunisia (0.01–0.05 mg/kg) [40], Greece (< 0.08 mg/kg), Cyprus (< 0.08 mg/kg), Egypt (< 0.08 mg/kg) [26], Spain (46.32–31.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [50], and Syria (< 0.082 mg/kg) [43]. However, the concentrations of Pb in the examined honeys were lower than in the following honeys: Palestinian (0.51–0.94 mg/kg) [42], French (3–101 mg/kg) [54], and Italian (28–304 mg/kg) [23], and (9–209 mg/kg) [25]. However, concentrations found were lower than those found in Palestinian (0.51–0.94 mg/kg) [42], French (3–101 mg/kg) [54], and Italian (28–304 mg/kg, [23]; 9–209 mg/kg, [25] honey. In this study, the mean level of Pb in honey samples is 24.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, which is still within the PTWI of Pb for adults (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) [56]. The extremely high Pb levels found in Italian honey depicted contamination caused by external sources or by incorrect procedures during honey processing as reported by Pisani et al. [23]. Vanadium is a natural component of the Earth's crust, which is widespread in nature. One of the main sources of environmental pollution by V comes from the combustion of fossil fuels [61]. The mean value of V content in honey samples from the thirty-seven locations in west Algeria was 13.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Among the honey samples surveyed, camphor and thyme honey samples are the richest in V (106.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S26; 79.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S11, resp.), whereas rosemary honey (0.81 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S29) was the poorest one. In this study, the levels

TABLE 9: Variance estimates (eigenvalues) and cumulative percentage of total variance (%) obtained by PCA considering 37 honey samples and trace elements and heavy metals.

Principal components	Honey samples	
	Eigenvalues	Cumulative %
1	1.937	30.38
2	1.607	54.33
3	1.562	54.79
4	1.209	60.89

of V were lower than those reported by Conti et al. [25] (Table 7). There is currently no JECFA assigned reference health standard for vanadium. Chromium is abundant in the environment in a trivalent or hexavalent state. It is found in the trivalent state, at low concentrations, in a wide range of foods [62]. Its content in foods can be greatly affected by anthropic and geochemical factors. The mean and the range values of the Cr content of honey samples investigated were 46.65 and 27.36–87.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Levels observed were lower than those reported in Tunisia (0.02–0.32 mg/kg) [40], France (0.08–0.36 mg/kg) [53], Palestine (0.00–0.51 mg/kg) [41], and Spain (0.049–4.480 mg/kg) [60]. On the other hand, very low Cr levels were found in *Eucalyptus*, thyme, and rosemary (27.36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S27; 27.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S7; and 27.81 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S29, resp.) honey samples, whereas carob tree contained the highest concentration (87.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S10). Chromium has low toxicity in foods in part due to its low bioavailability. Currently, there is no formal recommended dietary allowance for Cr [63]. Tungsten is found naturally on Earth almost exclusively in the combined state with other elements in ores as wolframite and scheelite. Because it is a rare metal and its compounds are generally inert, the effects of W on the environment are limited [64]. Few honey samples from the west Algerian region contained quantifiable concentrations of W. The highest W concentration was found in harmful honey (24.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S35). Besides, W concentrations of approximately 90% of honey samples were below LOQ. W was not investigated in others studies around the Mediterranean region. Therefore, it is not possible to comment on any differences in the level of W in honey. Arsenic is a ubiquitous element with metalloid properties. It occurs naturally in organic and inorganic forms. This is the most toxic element and is considered carcinogenic to humans [65]. The major use of As compounds is in agriculture and forestry as pesticides and herbicides [66]. The levels of As ranged from 1.61 to 21.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with a mean concentration of 5.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Table 5). The highest levels of As were found in the multifloral and milk thistle honey (21.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S4 and 18.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S8, resp.) while its concentration was lower than LOQ in lavender honey (S1). Also, low concentrations were found in orange tree and thyme honey (1.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S16 and 1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, S7, resp.). Our values for As were similar to the Libyan values (0.006–0.018 mg/kg) [46] and were below those from Morocco (0.00–0.045 mg/kg) [67], Greece, Cyprus, and Egypt (< 0.08 mg/kg) [26]. Very high As contents have been reported in some honey samples from France (nd–8.0 mg/kg) [54] and Italy (< 25 mg/kg; 2.8–11.1 mg/kg, resp.) [23, 25], which may be from

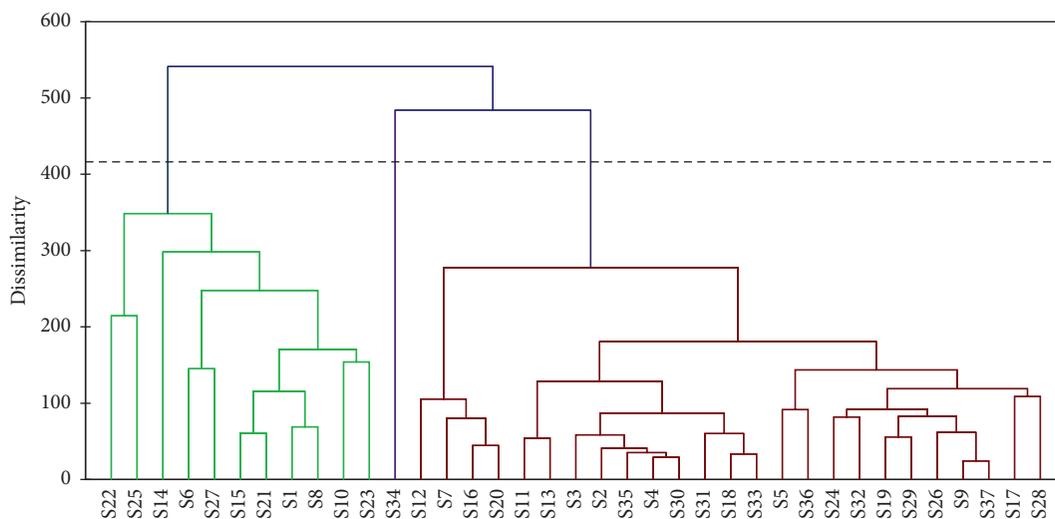


FIGURE 2: Dendrogram of analyzed honey samples.

environmental contamination. Up 94% of our values were below the PTWI of inorganic As ($15 \mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) established by JECFA [56]. Low concentrations of Co ($0.36\text{--}21.19 \mu\text{g}/\text{kg}$) were observed in the investigated west Algerian honey samples, which were lower than those previously reported for Moroccan ($0.00\text{--}1.435 \text{ mg}/\text{kg}$) [67], French ($0.10\text{--}0.23 \text{ mg}/\text{kg}$) [53], Spanish ($0.015\text{--}0.720 \text{ mg}/\text{kg}$) [60], and Italian ($1.0\text{--}17 \text{ mg}/\text{kg}$ and $2.9\text{--}30.2 \text{ mg}/\text{kg}$, resp.) [23, 25] honey. Besides, the levels of Co were similar to those published for honey coming from Greece, Cyprus, and Egypt ($<0.03 \text{ mg}/\text{kg}$) reported by Karabagias et al. [26]. Highest concentrations of Co were found in harmful honey ($21.19 \mu\text{g}/\text{kg}$, S35), whereas the lowest concentrations were in multifloral and orange tree honey ($0.36 \mu\text{g}/\text{kg}$, S17; $1.02 \mu\text{g}/\text{kg}$, S16, resp.). Overall, our data indicate that there are low levels of Co contamination in the west Algerian honey samples. There is currently no upper level of intake established by WHO and JECFA for cobalt. Cadmium is a metallic element that occurs naturally at low concentrations in the environment. It has been added to the environment through anthropogenic activities such as Cd metal production in industrial processes or by the use of phosphate fertilizers in agricultural soils [68]. The level of Cd in the west Algerian honey samples ranged from 0.24 to $8.14 \mu\text{g}/\text{kg}$, which was lower than that reported for the honey from most of the Mediterranean countries. The levels of Cd of half of them are, however, higher than those from Turkey ($<1 \mu\text{g}/\text{kg}$) as reported by Altun et al. [20] (Table 8). Moreover, Cd was present at a high concentration in thyme honey ($8.14 \mu\text{g}/\text{kg}$, S7) and below the limit of quantification in multifloral honey (S17). In 2005, the Joint FAO/WHO established a PTWI for Cd of $7 \mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. [66]. It is worth noting that the average Cd content ($1.23 \mu\text{g}/\text{kg}$) for the examined honeys was lower than the PTWI value. [66]. Ruthenium, rhodium, and platinum are part of the platinum-group metals belonging to the group VIII transition metals. They are generally grouped with gold and silver as precious metal commodities. Each of the metals occurs naturally in its native form, and in economically exploitable deposits, the elements occur

overwhelmingly as mineral species. The uses of these metals are distributed among the chemical, electrical, jewellery, and glass industries. In order to find out if these metals have found their way into the west Algerian honey, their levels were monitored in all the samples considered. In this study, the results show that Ru, Rh, Pt, and Au were lower than the limit of quantification in any of the tested honey samples. In summary, the levels of heavy metals and metalloids were, generally, low and comparable with the levels in honey from uncontaminated regions [20, 39, 40], indicating that the west Algerian honey is of good quality.

3.2. Multivariate Statistical Methods. The principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) of the 37 honey samples were performed by XLSTAT 2014.5.03 software for the trace elements and heavy metals shown in Tables 5 and 6 except Ru, Rh, Pt, and Au, which were not detected excluded. The variance estimate results (eigenvalues) obtained are presented in Table 9. PCA is a very powerful pattern recognition technique that describes the variance of a large dataset of intercorrelated variables with a lesser set of independent variables [27]. Analyzing the data in Table 9, it can be observed that PCA account contains together for 60.89% of the total variance of the dataset. The first component eigenvalues 1.937 and cumulative percentage is 30.38%, second component eigenvalues 1.607, cumulative 54.33%, third component eigenvalues 1.562, cumulative 54.79% and fourth component eigenvalues 1.209, cumulative 60.89% of the total variance. From Table 9 it can be observed that PCA account contains together for 60.89% of the total variance of the dataset. The first component eigenvalues 1.937 and cumulative % is 30.38, second component eigenvalues 1.607, cumulative 54.33%, third component eigenvalues 1.562, cumulative 54.79% and fourth component eigenvalues 1.209, cumulative 60.89% of the total variance. HCA was accomplished to classify the data according to the botanical origin and mineral content and to point out the similarity among different groups. The

level of similarity in which explanations are joined together may be used to create a dendrogram. In the present work, the optimal linkage distance level was 410, represented by the dashed line in Figure 2. It represents a relative measure of similarity among analyzed honey samples. From Figure 2, it can be seen that three groups were formed, which can be identified as follows: eleven samples were clustered in group I (S1, S6, S8, S10, S14, S15, S21, S22, S23, S25, and S27); one sample in group II (S34); and twenty-five samples in group III (S2, S3, S4, S5, S7, S9, S11, S12, S13, S16, S17, S18, S19, S20, S24, S26, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S35, S36, and S37). It can be observed that group I contains lavender, mild white mustard, milk thistle, carob tree, *Euphorbia*, and *Eucalyptus* honey types with high mineral contents, which showed similarities to each other. Group II contains sage honey type. Furthermore, group III comprises rosemary, thyme, orange tree, camphor, harmal, jujube tree, and many multifloral honey types with low levels of minerals, which correlated to each other. These results show that west Algerian honey samples vary according to their geographic origins and also to their mono or multifloral characteristics (Table 1). In addition, it is to underline that clear separation among the samples was obtained from several different geographic locations in western Algeria. From the PCA, it can be verified that the characteristics that influenced honey sample clustering the most were major elements K, Na, Ca, Mg, and Fe, whereas minor ones such as Cr, Co, V, W, As, Cd, and Pb were considered less important. In summary, the visualization of the data by HCA and PCA offers enough information to develop a classification method to determine the botanical origin of honey samples considering the mineral element composition.

4. Conclusion

The present chemical study provided a detailed picture of the trace element and heavy metal contents of natural honey from west Algeria, through the analysis of 19 elements in 37 types of unifloral honey (i.e., lavender, rosemary, mild white mustard, thyme, milk thistle, carob tree, orange tree, *Euphorbia*, *Eucalyptus*, camphor, jujube tree, sage, and harmal) and multifloral honey. Trace elements and heavy metals were determined and measured by ICP-MS and AAS methods. In summary, K was the most abundant element. K, Ca, Mg, and Na accounted for 97.92% of the total minerals present in honey investigated; this content places them among very dark and amber honey, which corresponds to their intrinsic golden/dark amber color. *Eucalyptus* honey contained the highest levels of K and Na. Sage honey is rich in Ca while milk thistle honey is rich in Mg. Additionally, lavender honey contained high Fe values while the carob tree is the richest in Zn. Mild white mustard honey contained highest level of Mn, whereas jujube tree and carob tree honey comprised Cu in high concentrations. Potentially toxic heavy metals and metalloids such as Pb, V, Cr, W, As, Co, and Cd were detected at concentrations <1 mg/kg. Furthermore, Ru, Rh, Pt, and Au were absent in all honey samples. The use of multivariate statistical methods such as HCA and PCA shows that mineral contents may represent

a major discriminating strength based on the botanical origin of honey samples. Overall, our results indicated that the west Algerian honey is rich in essential minerals beneficial for human health. The levels of the trace elements and heavy metals were below the PTWI established by JECFA. Finally, it can be concluded that the west Algerian honey is uncontaminated and therefore represents a good indicator for monitoring environmental pollution with metals. Moreover, the levels of mineral contents are at safe levels for human consumption.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

AH was responsible for conceptualization, project administration, and original draft preparation. AH and RK were responsible for methodology and formal analysis. GK was responsible for software. AA and RK were responsible for validation and data curation. DBR, SB, AA, GK, and RK were responsible for investigation. DBR, GK, and SB were responsible for resources. SB and RK were responsible for review and editing. AH and SB were responsible for visualization. RK was responsible for supervision.

Acknowledgments

This study was carried out under project no. B00L01UN130120220004 sponsored by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the People's Democratic Republic of Algeria and Abou Bekr Belkaïd University-Tlemcen, Algeria. The authors express their thanks to the beekeepers who donated honey samples for analysis in this study. Also special thanks to Pr. M.E.A. Dib for statistical analyses.

References

- [1] K. L. J. Hung, J. M. Kingston, M. Albrecht, D. A. Holway, and J. R. Kohn, "The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats," *Proc. R. Soc. B*, vol. 285, no. 1870, Article ID 20172140, 2018.
- [2] M. Grayson, "Bees," *Nature*, vol. 521, no. 7552, p. S47, 2015.
- [3] M. Ponikvar, J. Šnajder, and B. Sedej, "Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂," *Apidologie*, vol. 36, no. 3, pp. 403–409, 2005.
- [4] Ž. Bargańska, M. Ślebioda, and J. Namieśnik, "Honey bees and their products: bioindicators of environmental contamination," *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 46, no. 3, pp. 235–248, 2015.
- [5] C. M. Burden, M. O. Morgan, K. R. Hladun, G. V. Amdam, J. J. Trumble, and B. H. Smith, "Acute sublethal exposure to

- toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 4253, 2019.
- [6] G. Murtaza, B. Murtaza, N. K. Niazi, and M. Sabir, "Soil contaminants: sources, effects, and approaches for remediation," in *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*, pp. 171–196, New York, NY, USA, Article ID Springer, 2014.
 - [7] J. E. Gall, R. S. Boyd, and N. Rajakaruna, "Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review," *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 187, no. 4, p. 201, 2015.
 - [8] A. Buccolieri, G. Buccolieri, A. Dell'Atti, G. Strisciullo, and R. Gagliano-Candela, "Monitoring of total and bioavailable heavy metals concentration in agricultural soils," *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 168, no. 1–4, pp. 547–560, 2010.
 - [9] E. Mejias and T. Garrido, "Analytical procedures for determining heavy metal contents in honey: a bioindicator of environmental pollution," in *Honey Analysis*, Intechopen, London, UK, 2017.
 - [10] S. Silici, O. D. Uluozlu, M. Tuzen, and M. Soylak, "Honeybees and honey as monitors for heavy metal contamination near thermal power plants in Mugla, Turkey," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 32, no. 3, pp. 507–516, 2016.
 - [11] X. Wu, S. J. Cobbina, G. Mao, H. Xu, Z. Zhang, and L. Yang, "A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, no. 9, pp. 8244–8259, 2016.
 - [12] H. Ali, E. Khan, and I. Ilahi, "Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation," *Journal of Chemistry*, vol. 2019, Article ID 6730305, 14 pages, 2019.
 - [13] J. P. Vareda, A. J. M. Valente, and L. Durães, "Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: a review," *Journal of Environmental Management*, vol. 246, pp. 101–118, 2019.
 - [14] J. Rodriguez and P. M. Mandalunis, "A review of metal exposure and its effects on bone health," *Journal of Toxicology*, vol. 2018, p. 11, Article ID 4854152, 2018.
 - [15] K. Rehman, F. Fatima, I. Waheed, and M. S. H. Akash, "Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 119, no. 1, pp. 157–184, 2018.
 - [16] R. Singh, N. Gautam, A. Mishra, and R. Gupta, "Heavy metals and living systems: an overview," *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 43, no. 3, p. 246, 2011.
 - [17] P. Fermo, G. Beretta, R. Maffei Facino, F. Gelmini, and A. Piazzalunga, "Ionic profile of honey as a potential indicator of botanical origin and global environmental pollution," *Environmental Pollution*, vol. 178, pp. 173–181, 2013.
 - [18] M. Oroian, A. Prisacaru, E. C. Hretcanu, S.-G. Stroe, A. Leahu, and A. Buculei, "Heavy metals profile in honey as a potential indicator of botanical and geographical origin," *International Journal of Food Properties*, vol. 19, no. 8, pp. 1825–1836, 2016.
 - [19] S. Bogdanov, M. Haldimann, W. Luginbühl, and P. Gallmann, "Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects," *Journal of Apicultural Research*, vol. 46, no. 4, pp. 269–275, 2007.
 - [20] S. K. Altun, H. Dinç, N. Paksoy, F. K. Temamoğulları, and M. Savrunlu, "Analyses of mineral content and heavy metal of honey samples from south and east region of Turkey by using ICP-ms," *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2017, Article ID 6391454, 6 pages, 2017.
 - [21] S. Bartha, I. Taut, G. Goji, I. A. Vlad, and F. Dinulică, "Heavy metal content in PolyfloralHoney and potential health risk. A case study of copşa mică, Romania," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, no. 5, p. 1507, 2020.
 - [22] M. Soleyman, M. A. Islam, S. Paul et al., "Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, no. 1, pp. 219–233, 2016.
 - [23] A. Pisani, G. Protano, and F. Riccobono, "Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy)," *Food Chemistry*, vol. 107, no. 4, pp. 1553–1560, 2008.
 - [24] T. Pehlivan and A. Gul, "Determination of heavy metals contents of some monofloral honey produced in Turkey," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 5, no. 8, pp. 42–45, 2015.
 - [25] M. E. Conti, S. Canepari, M. G. Finoia, G. Mele, and M. L. Astolfi, "Characterization of Italian multifloral honeys on the basis of their mineral content and some typical quality parameters," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 74, pp. 102–113, 2018.
 - [26] I. K. Karabagias, A. P. Louppis, S. Kontakos, C. Drouza, and C. Papastephanou, "Characterization and botanical differentiation of monofloral and multifloral honeys produced in Cyprus, Greece, and Egypt using physicochemical parameter analysis and mineral content in conjunction with supervised statistical techniques," *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2018, Article ID 7698251, 10 pages, 2018.
 - [27] M. F. Lanjwani and F. A. Channa, "Minerals content in different types of local and branded honey in Sindh, Pakistan," *Heliyon*, vol. 5, no. 7, Article ID e02042, 2019.
 - [28] S. Squadrone, P. Brizio, C. Stella et al., "Trace elements and rare earth elements in honeys from the Balkans, Kazakhstan, Italy, South America, and Tanzania," *Environmental Science & Pollution Research*, vol. 27, no. 11, pp. 12646–12657, 2020.
 - [29] G. Azeh Engwa, P. Udoka Ferdinand, F. Nweke Nwalo, and M. N. Unachukwu, "Mechanism and health effects of heavy metal toxicity in humans," in *Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?*, O. Karcioglu and B. Arslan, Eds., IntechOpen, London, UK, 2019.
 - [30] G. Forte, C. Fadda, B. Bocca, G. L. Erre, G. Passiu, and R. Madeddu, "Association between exposure to heavy metals and systemic sclerosis: the levels of Al, Cd, Hg, and Pb in blood and urine of patients," *Biological Trace Element Research*, vol. 190, pp. 1–10, 2019.
 - [31] S. Giacoppo, M. Galuppo, R. S. Calabrò et al., "Heavy metals and neurodegenerative diseases: an observational study," *Biological Trace Element Research*, vol. 161, no. 2, pp. 151–160, 2014.
 - [32] C. J. Carter and R. A. Blizard, "Autism genes are selectively targeted by environmental pollutants including pesticides, heavy metals, bisphenol A, phthalates and many others in food, cosmetics or household products," *Neurochemistry International*, vol. 101, pp. 83–109, 2016.
 - [33] S. M. Kadri, R. Zaluski, and R. d. O. Orsi, "Nutritional and mineral contents of honey extracted by centrifugation and pressed processes," *Food Chemistry*, vol. 218, pp. 237–241, 2017.
 - [34] A. A. Machado De-Melo, L. B. d. Almeida-Muradian, M. T. Sancho, and A. Pascual-Maté, "Composition and properties of *Apis mellifera* honey: a review," *Journal of Apicultural Research*, vol. 57, no. 1, pp. 5–37, 2018.

- [35] F. R. Khan, Z. Ul. Abadin, and N. Rauf, "Honey: nutritional and medicinal value: honey: nutritional and medicinal value," *International Journal of Clinical Practice*, vol. 61, no. 10, pp. 1705–1707, 2007.
- [36] M. E. Cortés, P. Vigil, and G. Montenegro, "The medicinal value of honey: a review on its benefits to human health, with a special focus on its effects on glycemic regulation," *Ciencia e investigación agraria*, vol. 38, no. 2, pp. 303–317, 2011.
- [37] M. L. Berkani, *Etude des paramètres de développement de l'Apiculture Algérienne*, INA, Singapore, 2007.
- [38] O. M. Hernández, J. M. G. Fraga, A. I. Jiménez, F. Jiménez, and J. J. Arias, "Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry," *Food Chemistry*, vol. 93, no. 3, pp. 449–458, 2005.
- [39] A. Moujanni, L. Partida, A. K. Essamadi, D. Hernanz, F. J. Heredia, and A. Terrab, "Physicochemical characterization of unique unifloral honey: *Euphorbia resinifera*," *CyTA - Journal of Food*, vol. 16, no. 1, pp. 27–35, 2018.
- [40] A. Boussaid, M. Chouaibi, L. Rezig et al., "Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 11, no. 2, pp. 265–274, 2018.
- [41] A. Abdulkhalik and K. M. Swaileh, "Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine," *International Journal of Food Properties*, vol. 20, no. 2, pp. 447–454, 2017.
- [42] H. Imtara, Y. Elamine, and B. Lyoussi, "Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples," *Food Sciences and Nutrition*, vol. 6, no. 8, pp. 2056–2065, 2018.
- [43] A. Khuder, M. Ahmad, R. Hasan, and G. Saour, "Improvement of X-ray fluorescence sensitivity by dry ashing method for elemental analysis of bee honey," *Microchemical Journal*, vol. 95, no. 2, pp. 152–157, 2010.
- [44] L. R. Silva, R. Videira, A. P. Monteiro, P. Valentão, and P. B. Andrade, "Honey from Luso region (Portugal): physicochemical characteristics and mineral contents," *Microchemical Journal*, vol. 93, no. 1, pp. 73–77, 2009.
- [45] L. R. Silva, A. Sousa, and M. Taveira, "Characterization of Portuguese honey from Castelo Branco region according to their pollen spectrum, physicochemical characteristics and mineral contents," *Journal of Food Science & Technology*, vol. 54, no. 8, pp. 2551–2561, 2017.
- [46] A. S. Salama, A. M. Etoriki, and M. H. Awad, "Determination of physicochemical properties and toxic heavy metals levels in honey samples from West of Libya," *Journal of Applied Computer Science*, vol. 5, no. 1, pp. 618–620, 2019.
- [47] R. Fernandeztorres, J. Perezbernal, M. Bellolopez, M. Callejonmochon, J. Jimenezsanchez, and A. Guiraumperez, "Mineral content and botanical origin of Spanish honeys," *Talanta*, vol. 65, no. 3, pp. 686–691, 2005.
- [48] C. de Alda-Garcilope, A. Gallego-Picó, J. C. Bravo-Yagüe, R. M. Garcinuño-Martínez, and P. Fernández-Hernando, "Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content," *Food Chemistry*, vol. 135, no. 3, pp. 1785–1788, 2012.
- [49] A. M. Gonzalez Params, J. A. Gmez Brez, R. J. Garcia-Villanova et al., "Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, no. 1, pp. 157–165, 2000.
- [50] I. Frías, C. Rubio, T. González-Iglesias, Á. J. Gutiérrez, D. González-Weller, and A. Hardisson, "Metals in fresh honeys from tenerife island, Spain," *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 80, no. 1, pp. 30–33, 2008.
- [51] S. Rodríguez-Flores, O. Escuredo, and M. C. Seijo, "Characterization and antioxidant capacity of sweet chestnut honey produced in North-West Spain," *Journal of Apicultural Science*, vol. 60, no. 1, pp. 19–30, 2016.
- [52] A. Terrab, A. F. Recamales, D. Hernanz, and F. J. Heredia, "Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents," *Food Chemistry*, vol. 88, no. 4, pp. 537–542, 2004.
- [53] J. Devillers, J. C. Doré, M. Marengo, F. Poirier-Duchêne, N. Galand, and C. Viel, "Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 21, pp. 5998–6007, 2002.
- [54] J.-B. Saunier, G. Losfeld, R. Freydier, and C. Grison, "Trace elements biomonitoring in a historical mining district (les Malines, France)," *Chemosphere*, vol. 93, no. 9, pp. 2016–2023, 2013.
- [55] R. El-Haskoury, W. Kriaa, B. Lyoussi, and M. Makni, "Ceratonia siliqua honeys from Morocco: physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities," *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 26, no. 1, pp. 67–73, 2018.
- [56] Fao, *73rd Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) Meeting - Food Additives and Contaminants. Summary and Conclusions*, FAO/WHO, Rome, Italy, 2010, <https://www.fao.org/documents/card/en/c/fbf01686-b940-44c2-a077-1052740ad1c6/>.
- [57] M. R. Provenzano, H. El Bilali, V. Simeone, N. Baser, D. Mondelli, and G. Cesari, "Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard," *Food Chemistry*, vol. 122, no. 4, pp. 1338–1343, 2010.
- [58] P. Pohl, H. Stecka, K. Greda, and P. Jamroz, "Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys," *Food Chemistry*, vol. 134, no. 1, pp. 392–396, 2012.
- [59] M. B. Grosvenor and L. A. Smolin, *Visualizing Nutrition: Everyday Choices*, Wiley, Hoboken, NJ, USA, 4th Edition, 2017.
- [60] C. Santos-Buelga and A. M. González-Paramás, *Chemical Composition of Honey, Bee Products - Chemical and Biological Properties*, Springer, Newyork, NY, USA, pp. 43–82, 2017.
- [61] O. R. Awofolu, "Determination of vanadium in foods by atomic absorption spectrometry," *African Journal of Science and Technology*, vol. 5, no. 1, 2005.
- [62] W. T. Cefalu and F. B. Hu, "Role of chromium in human health and in diabetes," *Diabetes Care*, vol. 27, no. 11, pp. 2741–2751, 2004.
- [63] Efsa Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food Ans, "Scientific Opinion on the safety of trivalent chromium as a nutrient added for nutritional purposes to foodstuffs for particular nutritional uses and foods intended for the general population (including food supplements)," *EFS2*.vol. 8, no. 12, 2010.
- [64] N. Strigul, A. Koutsospyros, P. Arienti, C. Christodoulatos, D. Dermatas, and W. Braida, "Effects of tungsten on environmental systems," *Chemosphere*, vol. 61, no. 2, pp. 248–258, 2005.
- [65] S. Kapaj, H. Peterson, K. Liber, and P. Bhattacharya, "Human health effects from chronic arsenic poisoning—A review," *Journal of Environmental Science and Health, Part A*.vol. 41, no. 10, pp. 2399–2428, 2006.
- [66] World Health Organization, "Food and agriculture organization of the united nations, I. Joint FAO/WHO Expert

committee on food Additives. Meeting (74th: 2011: rome, evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-fourth [74th] report of the joint FAO/WHO Expert committee on food Additives," 2011, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44788>.

- [67] A. Chakir, A. Romane, N. Barbagianni, and D. Bartoli, "Major and trace elements in different types of moroccan honeys," *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 5, no. 4, p. 223, 2011.
- [68] S. Dobson, "International programme on chemical safety weltgesundheitsorganisation," *Cadmium - Environmental Aspects*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1992.

Analysis of trace-elements and toxic heavy metals in honeys from Tlemcen Province, north-western Algeria

Dalila BEREKSI-REGUIG¹

Hocine ALLALI¹ (✉)

Salim BOUCHENTOUF^{1,2}

Agnieszka ADAMCZUK³

Grażyna KOWALSKA⁴

Radosław KOWALSKI⁴

Summary

Eighteen honeys collected from various botanical and geographical sources in Tlemcen Province (north-western Algeria) were studied to determine the presence of the following fifteen trace elements and heavy metals: K, Na, Ca, Mg, Mn, Cu, Fe, Zn, V, Cr, Co, As, Cd, Pb and W. Element determination was performed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), after digestion, by concentrated nitric acid using microwave mineralizer. The most abundant minerals were K, Ca, Mg and Na ranging within 153-989 mg/kg, 33.1-377 mg/kg, 69.1-162 mg/kg and 13.3-146 mg/kg, respectively. Fe was the most abundant heavy metal followed by Mn, Zn and Cu while Cr, Co, V, W, As, Cd and Pb were the lowest trace elements detected at level < 1 mg/kg in the honey samples surveyed. The variation in the mineral content in the honey samples studied is probably due to geochemical and geographical differences. Multivariate methods were used in order to classify honey samples according to their mineral content. The present study revealed that honeys collected from the various beekeepers apiaries of Tlemcen Province were not contaminated with toxic trace elements and therefore poses no threat to consumers.

Key words

honey, trace element, heavy metal, microwave digestion, ICP-MS

¹ Laboratory of Natural and Bioactive Substances (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaïd University, P.O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria

² Doctor Tahar Moulay University of Saïda, Algeria, BP 138 cité EN-NASR, Saïda 20000, Algeria

³ Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

⁴ Department of Analysis and Evaluation of Food Quality, University of Life Sciences in Lublin, 8 Skromna Street, 20-704 Lublin, Poland

✉ Corresponding author: h_allali72@yahoo.fr

Received: March 24, 2020 | Accepted: June 3, 2020

Introduction

Honey is a substance widely suggested to different investigations by many researchers during the last decades in terms of its nutritive and therapeutic aspect (Bogdanov, 2010; Khan et al., 2007, 2017; Mandal and Mandal, 2011). Several studies from Poland (Grembecka and Szefer, 2013), Italy (Conti et al., 2007), Turkey (Altun et al., 2017), Spain (de Alda-Garcilope et al., 2012), France (Devillers et al., 2002), Slovenia (Golob et al., 2005), Croatia (Bilandžić et al., 2012; Lasić et al., 2018), Argentina (Cantarelli et al., 2008), Brazil (dos Santos et al., 2008) and China (Ru et al., 2013) focused on honey composition in minerals and metals. Heavy metals may cause many damages to human health through various ways by accumulating in vital body organ such as liver, heart, kidney and brain (Rehman et al., 2018). Because of their persistence in the environment, heavy metals accumulate in human body mainly via food chain (Ali et al., 2019) causing harms to quality of human life (Jaishankar et al., 2014). Even if heavy metals are present naturally on earth crust, it has been well established that anthropogenic activities are the main sources introducing metals into the environment (Tchounwou et al., 2012). Volcanic eruption and weathering have also been reported as natural phenomena contributing significantly to metal pollution (Bradl, 2005). Many authors have indicated that the presence of mineral and heavy metals in honey depends closely on the geographical and botanical origin (Oroian et al., 2016; Pisani et al., 2008; Rashed and Soltan, 2004). Several researches reported that honey may be considered as a biological indicator of the environmental contaminants including heavy metal, low-level radioactivity and pesticide residues (Bogdanov et al., 2007; Formicki et al., 2013; Fredes and Montenegro, 2006; Nozal Nalda et al., 2005; Ponikvar et al., 2005). The objective of this study was to determine the level of 15 trace elements and heavy metals in 18 honey samples from Tlemcen Province in Algeria in order to evaluate the honey quality, which may be useful for assessing the presence of environmental contaminants. To the best of our knowledge and according to main research databases, we present here below the first study of honey bees samples from Tlemcen Province located in the western region of Algeria.

Materials and methods

Honey Samples

A total of eighteen *Apis mellifera intermissa* honey samples, namely S(1 - 18), were collected from twelve geographical locations (Sidi Djillali, El Aricha, Ain Fezza, Beni Snous, Oued Chouly, Beni Mester, Beni Ghazli, Oued es Safsâf, Sebaa Chioukh, Hennaya, Remchi and Honaïne) in Tlemcen Province in north west Algeria (Fig. 1 and Table 1). Samples were harvested from April 2017 to August 2018 directly from beekeepers. It is to highlight that the botanical origin of the honey samples studied was determined on the basis of a survey carried out among beekeepers. This study allowed to classify the honeys into monofloral and multifloral according to where the hives were established (Table 1). In the case of the monofloral honeys, their productions were possible by establishing hives where flowers of a particular plant species are dominant. Besides, multifloral honeys have several botanical sources where none is predominant. However, these results must be confirmed by pollen analyzes, which is widely used to verify the alleged geographic and floral origin of honey samples. Collected honeys were stored in dark conditions at + 4°C until analysis.

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

The inductively coupled plasma mass spectrometer ICP-MS Varian 820-MS (Varian, Australia) was used for the determination of Cr, Co, V, W, As, Cd and Pb of the honey samples. The ICP-MS parameters were: plasma gas flow 18 L/min, auxiliary gas flow 1.70 L/min, nebulizer gas flow 1 L/min, and frequency power 1.37 kW.

Atomic absorption spectroscopy (AAS)

The concentration of K, Na, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe and Zn ions was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) method using a spectrometer SpectrAA 280 FS with autosampler SPS 3 (Varian, Australia), which was equipped with a deuterium lamp, hollow cathode lamp for each element and an air-acetylene burner. The Instrumental parameters related to each element are summarized in Table 2.

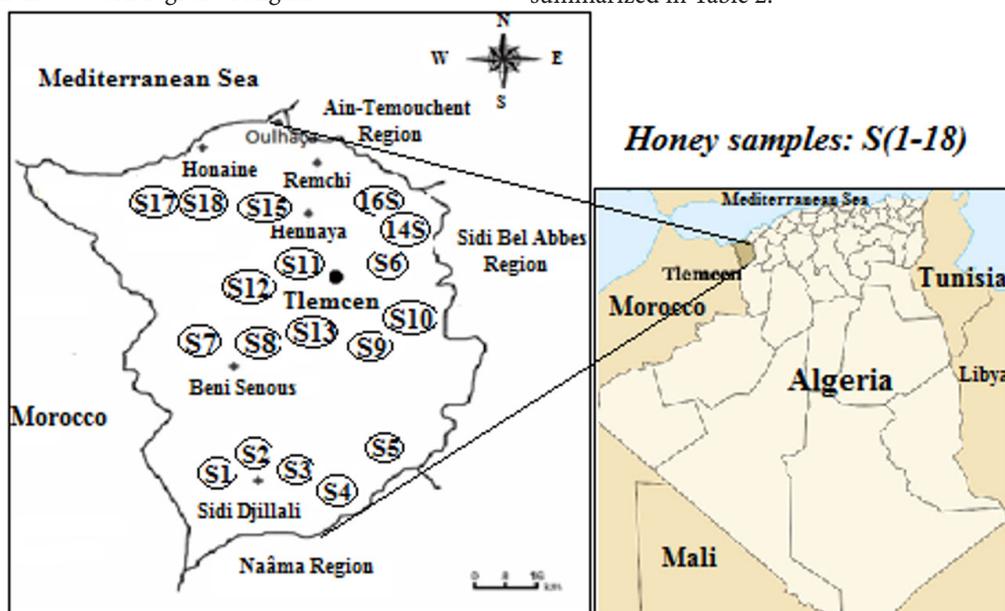


Figure 1. Geographical distribution of the sampling points in Tlemcen Province

Table 1. Honey samples and their botanical, geographical origin and production month/year

N°	Sample code	Arabic name	English name	Scientific name	Location	Month and year of harvest
1	S1	الخرامي البري	Lavender	<i>Lavandula vera</i> D.C.	Sidi Djillali	July 2018
2	S2	إكليل الجبل	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Sidi Djillali	May 2018
3	S3	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Sidi Djillali	June 2018
4	S4	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Sidi Djillali	July 2017
5	S5	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	El Aricha	August 2017
6	S6	خردل	Mild white mustard	<i>Sinapis alba</i> L.	Aïn Fezza	July 2017
7	S7	زعتر	Thyme	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Beni Snous	June 2018
8	S8	شوك الجمل	Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Beni Snous	July 2018
9	S9	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Oued Chouly	October 2017
10	S10	خروب	Carob tree	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Oued Chouly	September 2017
11	S11	زعتر	Thyme	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Beni Mester	June 2017
12	S12	خروب	Carob tree	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Beni Ghazli	June 2017
13	S13	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Oued es Safsâf	August 2018
14	S14	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Sebaa Chioukh	June 2017
15	S15	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Hennaya	July 2017
16	S16	برتقال	Orange tree	<i>Citrus sinensis</i> L.	Remchi	April 2017
17	S17	متعدد الزهور	Multifloral	Multifloral	Honaïne	June 2018
18	S18	شوك الجمل	Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Honaïne	July 2018

Table 2. Instrumental operation conditions used for elements analysis by AAS method

Elements	Flame type	Fuel flow (L/min)	Lamp current (mA)	Wave length (nm)	Slit width (nm)	Air flow (L//min)
Na	Air-acetylene	2.00	-	589.0	0.2	10.00
Mg	Air-acetylene	2.00	40	202.6	1.0	10.00
K	Air-acetylene	2.00	-	766.5	0.2	10.00
Ca	Air-acetylene	2.00	10	422.7	0.5	10.00
Mn	Air-acetylene	2.00	5	279.5	0.2	10.00
Fe	Air-acetylene	2.00	5	248.3	0.2	10.00
Cu	Air-acetylene	2.00	4	324.8	0.5	10.00
Zn	Air-acetylene	2.00	5	213.9	1.0	10.00

In order to avoid sample ionization during potassium analysis Schinkel buffer solution (mixture contents 10 g/L cesium chloride and 100 g/L lanthanum chloride) was used.

Reagents and solutions

Certified single-element standard solutions (1000 mg/L) used to prepare calibration curve were of highest purity grade (99.999%) and were purchased from Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA). The calibration standards for ICP-MS analysis were prepared by diluting certified standard solutions in 1% HNO₃ and for AAS analysis by diluting in high purity de-ionized Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) purified by reverse osmosis followed by ion-exchange cartridges.

Preparation of Honey Sample

Digestion

Approximately 0.5 g of honey samples were placed in a Teflon vessel; 10 mL of 65% HNO₃ (suprapur grade®, Merck, Germany) was added into the vessel and the sealed vessel was put into microwave mineralizer MARS Express (CEM, USA). The microwave mineralization was performed stepwise at 400 W and 363 K, at 800 W and 393 K, at 1600 W and 483 K. The cooled digestion solution was then diluted to 50 mL using high purity de-ionized water. All sample solutions were clear before determination of the mineral content in honey sample.

Statistical method

Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were performed using the XLStat 2014.5.03 software for Microsoft Excel (Addinsoft, Bordeaux, France) to rationalize and interpret the analytical data. The analyses of the eighteen honey samples involving the determination of the fifteen mineral elements resulted in a (18 × 15) data matrix using the 18 honey samples (objects) as rows and the elements (variables) as columns. The data were auto-scaled because the element concentrations are of different orders of magnitude. So, the data were evaluated employing the PCA technique. Fifteen dimensions are necessary for the total explanation of the data variability. In the case of the evaluation using HCA, these data were also auto-scaled using the single linkage method, and the Euclidean distances were used to calculate sample interpoint distances and similarities.

Results

Trace elements and heavy metals found in eighteen analyzed honeys, expressed in mg/kg fresh weight, collected from Tlemcen Province (northwest region of Algeria) are shown in Tables 3 as mean ± standard deviation (SD). The range of variation of each element was very wide in the samples from the different locations (Fig. 1 and Table 1). K The most abundant mineral element was K with a mean concentration of 540.5000 ± 240.8559 mg/kg. The highest concentration of trace-elements and heavy metals detected in honey samples was the potassium (989.0000 mg/kg) representing 61.30% of the total mineral content of the multifloral honey from Sebaa Chioukh region (S14). This essential element

was followed by calcium, magnesium, sodium and iron with 23.37% (S14), 14.68% (S8), 10.49% (S6) and 5.38% (S1) of the total mineral content, respectively. The lowest levels were found for the following elements: Cd, W, Co, V, Pb and Cr at mean concentrations of 0.0012 ± 0.0018 mg/kg, 0.0017 ± 0.0021 mg/kg, 0.0072 ± 0.0056 mg/kg, 0.0102 ± 0.0176 mg/kg, 0.0201 ± 0.0288 mg/kg and 0.0486 ± 0.0162 mg/kg, respectively (Table 3). Mineral contents significantly differed in honey samples that belonged to the different studied locations. The mean levels of the essential elements (K, Ca, Mg, Na and Fe) in honeys samples from east Tlemcen Province (S6, S10 and S14) were higher than concentrations of these mineral elements in the honey samples from other locations (Table 1). Based on our results the lowest mean values for mineral elements belonged to honey samples S12, S7, S5 and S16 from Beni Ghazli, Beni Snous, El Aricha and Remchi locations, respectively. Due to the existence of different factors, such as botanical origins, soil characteristics, climates and pollution, which could affect the content of the trace elements and heavy metals in honey, the multivariate analysis and, in particular, PCA and HCA were applied to the elemental composition data in order to study the chemistry variables capable of characterizing the honey produced in each location (Fig. 2 and 3).

Table 3. Mean concentration, standard deviation and range (mg/kg) for 15 trace-elements and toxic heavy metals analyzed by ICP-MS and AAS method. Samples collected in Tlemcen Province (S1 - 18) during 2017 to 2018

N°	Elements	Min.	Max.	Mean±SD
1	Cr ^{b,c}	0.0276	0.0874	0.0486±0.0162
2	Co ^{b,c}	0.0004	0.0208	0.0072±0.0056
3	V ^{b,c}	0.0014	0.0797	0.0102±0.0176
4	W ^{b,c}	0.0000	0.0065	0.0017±0.0021
5	As ^b	0.0000	0.0216	0.0060±0.0055
6	Cd ^{b,c}	0.0000	0.0081	0.0012±0.0018
7	Pb ^{b,c}	0.0000	0.1327	0.0201±0.0288
8	K ^a	153.0000	989.0000	540.5000±240.8559
9	Na ^a	13.3000	146.0000	61.4667±40.3394
10	Ca ^a	33.1000	377.0000	95.2278±80.9629
11	Mg ^a	69.1000	162.0000	119.0778±29.2762
12	Cu ^{b,c}	0.0000	9.6200	4.0175±2.6801
13	Mn ^{b,c}	1.3600	13.9000	10.2539±3.2554
14	Fe ^{b,c}	11.7000	59.6000	26.9333±12.8490
15	Zn ^{b,c}	0.2230	13.9000	4.4796±3.0702

^a Major elements; ^b Trace-elements; ^{b,c} Trace-elements/Heavy metals; SD: standard deviation

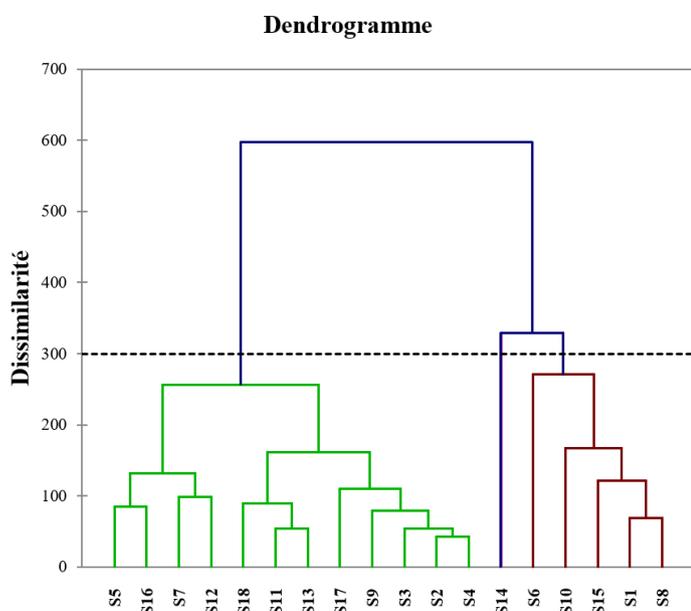


Figure 2. Dendrogram for honey samples S(1 - 18) showing single linkage with Euclidean distances

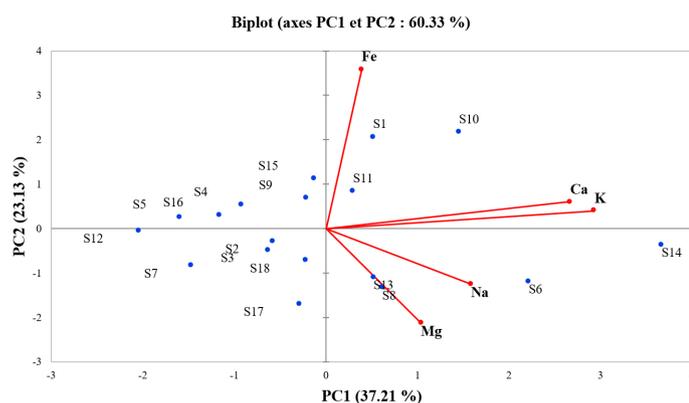


Figure 3. Principal component analysis. Distribution of honey samples S(1 - 18) and dominant elements (K, Ca, Mg, Na and Fe) on scores plot

Discussion

Mineral composition

Our study shown that mineral content in honeys is low and accounts for 0.16% to 0.04% of the total composition, which is in agreement with the composition of nectar honeys (Hernández et al., 2005; Solayman et al., 2016).

The most abundant macro minerals found in these analyzed honey types were K, Ca, Mg and Na, which ranged from 153 to 989 mg/kg, 33.1 - 377 mg/kg, 69.1 - 162 mg/kg and 13.3 - 146 mg/kg, respectively. The results for K and Ca in the analyzed types were coherent with Moroccan, Tunisian, Portuguese, Spanish and Italian honey, in which the total mineral content consisted mainly of potassium ranging from 42.56% to 75.41% (Chakir et al., 2011; Boussaid et al., 2018; Imtara et al., 2018; Silva et al., 2017; Machado De-Melo et al., 2017; Di Rosa et al., 2019). Indeed, potassium was the most important mineral among the fifteen

evaluated elements with prevalence in the sample S14 (989 mg/kg), while S12 had the lowest value (153 mg/kg). The calcium was the second most abundant mineral in the studied honeys with the highest concentration in S14 being present at levels of 377 mg/kg and the lowest in S7 (33.1 mg/kg) (Table 3). These results were in agreement with Spanish, Italian, Latvian and Palestinian honeys as described in literature (Fernandez-Torres et al., 2005; Pisani et al., 2008; Vincevica-Gaile et al., 2011; Abdulkhalik and Swaileh, 2017). Our results for magnesium (69.1 - 162 mg/kg) and sodium (13.3 - 146 mg/kg) were high as compared to the results reported by Moujanni et al. (2017) in Moroccan *Euphorbia resinifera* honeys (Mg = 19.85-45.84 mg/kg; Na = 18.81 - 118.74 mg/kg) and those reported by Lasić et al. (2018) in chestnut honey from Croatia (Mg = 7.326 - 68.320 mg/kg; Na = 18.363 - 48.550 mg/kg). Among the trace elements quantified in the eighteen honey types, Fe content was the highest in *Lavandula vera* D.C. honeys (S1; 59.6 mg/kg) and the lowest in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (S8; 11.7 mg/kg) (Table 3). The concentration of iron was higher compared to other Moroccan honey types (1.46 - 13.95 mg/kg) (Chakir et al., 2011; Moujanni et al., 2017) but similar Fe content was found in United Arab Emirates honey (1.15 - 110.79 mg/kg) (Habib et al., 2014). Besides, these values were lower than those found in honeys from Turkey (< 0.001 - 7.255 mg/kg) (Altun et al., 2017) and Canari Island (0.400 - 5.251 mg/kg) (Hernández et al., 2005), which may be due to the different composition of soils and consequently vegetation diversity (Oroian et al., 2016).

The quantification of the mineral elements such as potassium, calcium, magnesium, sodium and iron in honey is useful to evaluate the nutritional quality of honey samples and to determine a botanical origin differentiation. However, the mineral content is not yet a quality parameter of the European Union Directives (Codex Alimentarius, 2001).

The manganese concentration of the analyzed honey types ranged from 1.36 mg/kg to 13.9 mg/kg with maximum concentration of 13.9 mg/kg in mild white mustard (*Sinapis alba* L.; S6) and minimum in multifloral honey from the Hennaya region (S15; 1.36 mg/kg). As compared with all trace minerals and heavy metals, the mean content of Zn and Cu were 4.4796 ± 3.0702 mg/kg and 4.0175 ± 2.6801 mg/kg, respectively. In addition, the following elements: Cr, Mn, Co, Cu, V, As, Pb and Cd were present in the eighteen analyzed honeys, except for W that is totally absent in almost half of them. These trace elements and heavy metals were detected at level < 1 mg/kg. The resulting data, summarized in Table 3, were consistent with the ranges indicated for honeys from other studies (Di Rosa et al., 2019; Lasić et al., 2018; Moujanni et al., 2017; Oroian et al., 2015; Aghamirlou et al., 2015; Boussaid et al., 2018; Akbari et al., 2012). It was reported by Silva et al. (2009) that the mineral content of honey samples is a potential indicator of its geographical origin. Furthermore, it can be considered as a biomarker of possible pollution by toxic metals (Machado De-Melo et al., 2017; Pohl, 2009; Alves et al., 2013; Devillers et al., 2002). It should be noted that the present study revealed no evidence of contamination with toxic metals of the honey samples collected from the various locations in Tlemcen Province, which could be considered as an indication of honey quality.

Classification of Honey Samples Based on the mineral content

The data mentioned in Table 3 were analyzed using statistical techniques including Principal Components Analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) to discriminate the honey samples based on their mineral contents.

A matrix (18 × 15) with rows representing the different analyzed honey samples and columns corresponding to the content of the fifteen investigated trace elements and heavy metals was constructed for the PCA (Fig. 3). Since the concentrations of the elements were of different orders of magnitude, the data were first automatically scaled. Fifteen dimensions were needed for the total explanation of the data variability. Table 4 shows that the first four PCs jointly explain 60.33% of the total variance of the data. The first component eigenvalue was 2.417 and accounted for 36.90 % of the total variance, the second component eigenvalue was 1.572 (cumulatively explaining 44.51%), the third component eigenvalue was 1.521 (cumulatively explaining 48.17%) and the fourth component eigenvalue was 1.156.

The HCA resulted in a dendrogram in which three clusters (A - C) were noticed. The first cluster A included S5, S16, S7, S12, S18, S11, S13, S17, S9, S3, S2 and S4; the second one (cluster B) contained S14 and then cluster C was comprised of S6, S10, S15, S1 and S8. The optimal linkage distance level was 300, represented by the dashed line in Fig. 2. It represents a relative measure of similarity between analyzed honeys. Considering the dominant variables (potassium, calcium, magnesium, sodium and iron concentrations), Fig. 3 shows clearly that the honey samples: S1, S6, S8, S10, S15 and S14 (clusters B and C) have higher concentrations of these elements than the other sampling sites.

It can be observed that the cluster A contains orange tree, thyme, rosemary and many multifloral honey types with low mineral contents, which showed similarities to each other. The cluster B contains one multifloral honey type. Furthermore, the cluster C comprises lavender, mild white mustard, milk thistle and carob tree honey types with high levels of minerals, which correlated to each other. Based on PCA and HCA, different honey samples were found to vary not only in their geographic locations, but also in their mono or multifloral characteristics (Table 1). In addition, the mineral element composition contained enough information to develop a classification method of the honey samples studied.

Table 4. Variance estimates (eigenvalues) and cumulative percentage of total variance (%), obtained by PCA considering 18 honey samples and elements characters

Principal components	Honey samples	
	Eigenvalues	Cumulative %
PC1	2.417	36.90
PC2	1.572	44.51
PC3	1.521	48.17
PC4	1.156	60.33

Conclusion

The trace-elements and toxic heavy metals content were found in the eighteen honeys analyzed from the Tlemcen Province of north west region of Algeria; their levels were comparable with other honeys coming from the neighboring countries during the last decade. From the minerals analyzed the most abundant was K, followed by Ca, Mg, Na, Fe, Zn and Cu, while Cr, Mn, W, Co, V, As, Pb and Cd were in low concentrations.

The results obtained in this study showed that the honey samples studied were rich in mineral elements. It was concluded that among all honey samples, multifloral (Sebaa Chioukh, S14) and mild white mustard (Ain Fezza, S6) honeys contained the highest levels of mineral content. By applying multivariate techniques (PCA and HCA), the study confirmed that dominant minerals (K, Ca, Mg, Na and Fe) possessed a high discriminating power and were a useful tool to characterize different types of honey.

Furthermore, the present study showed that the honey samples investigated were not contaminated by heavy metals, which indicates that apiaries are located far from the various anthropogenic activities that cause environmental pollution. Also, the data suggested that honey samples were of good quality, because they contain higher levels of the essential and trace mineral elements, which are beneficial to human health.

Acknowledgements

Authors are very much thankful to Abou Bekr Belkaïd University and to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for the support under the PRFU project (approval No. B00L01UN130120180009).

Declarations

Author contribution statement

A. H. conceived and designed the experiments; B-R. D., B. S., A. A., K. G. and K. R. performed the experiments; analyzed and interpreted the data; A. H., wrote and edited the article. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdulkhaliq A., Swaileh K.M. (2017). Physico-chemical properties of multi-floral honey from the West Bank, Palestine. *Int J Food Prop* 20(2): 447-454. doi: 10.1080/10942912.2016.1166128
- Aghamirlou H.M., Khadem M., Rahmani A., Sadeghian M., Mahvi A.H., Akbarzadeh A., Nazmara S. (2015). Heavy metals determination in honey samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *J Environ Health Sci Eng* 13: 39. doi: 10.1186/s40201-015-0189-8
- Akbari B., Gharanfoli F., Khayyat M.H., Khashyarmansh Z., Rezaee R., Karimi G. (2012). Determination of heavy metals in different honey brands from Iranian markets. *Food Addit Contam Part B Surveill* 5(2): 105-111. doi: 10.1080/19393210.2012.664173

- Ali H., Khan E., Ilahi I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous Heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *J Chem* 2019: 1-14. doi: 10.1155/2019/6730305
- Altun S.K., Dinç H., Paksoy N., Temamoğullari F.K., Savrunlu M. (2017). Analyses of mineral content and heavy metal of honey samples from south and east region of Turkey by using ICP-MS. *Int J Anal Chem*. Article ID 6391454, 6 pages. doi: 10.1155/2017/6391454
- Alves A., Ramos A., Gonçalves M.M., Bernardo M., Mendes B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *J Food Compos Anal* 30(2): 130-138. doi: 10.1016/j.jfca.2013.02.009
- Bilandžić N., Đokić M., Sedak M., Varenina I., Kolanović B.S., Končurat A., Rudan N. (2012). Content of five trace elements in different honey types from Koprivnica-Kri Evci County. *Slov Vet Res* 49: 167-175.
- Bogdanov S. (2010). Nutritional and functional properties of honey. *Vopr Pitan* 79(6): 4-13.
- Bogdanov S., Haldimann M., Luginbühl W., Gallmann P. (2007). Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. *J Apic Res* 46(4): 269-275. doi: 10.1080/00218839.2007.11101407
- Boussaid A., Chouaibi M., Rezig L., Hella R., Donsi F., Ferrari G., Hamdi S. (2018). Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arab J Chem* 11(2): 265-274. doi: 10.1016/j.arabjc.2014.08.011
- Bradl H.B. (2005). *Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation*, first ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Cantarelli M.A., Pellerano R.G., Marchevsky E.J., Camiña J.M. (2008). Quality of honey from Argentina: Study of chemical composition and trace elements. *J Argent Chem Soc* 96: 33-41. doi: 10.12691/jfnr-2-9-1
- Chakir A., Romane A., Barbaggianni N., Bartoli D., Ferrazzi P. (2011). Major and Trace Elements in Different Types of Moroccan Honeys. *Aust J Basic Appl Sci* 5(4): 223-231.
- Codex Alimentarius Commission (2001). *Codex Alimentarius Commission Standards*. Codex Stan 12-1981, 1-8.
- Conti M., Stripeikis J., Campanella L., Cucina D., Tudino M. (2007). Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. *Chem Cent J* 1:14. doi: 10.1186/1752-153X-1-14
- de Alda-Garcilope C., Gallego-Picó A., Bravo-Yagüe J.C., Garcinuño-Martínez R.M., Fernández-Hernando P. (2012). Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content. *Food Chem* 135: 1785-1788. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.057
- Devillers J., Doré J.C., Marengo M., Poirier-Duchêne F., Galand N., Viel C. (2002). Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *J Agric Food Chem* 50: 5998-6007. doi: 10.1021/jf020497r
- Di Rosa A.R., Leone F., Cheli F., Chiofalo V. (2019). Novel approach for the characterisation of Sicilian honeys based on the correlation of physico-chemical parameters and artificial senses. *Ital J Anim Sci* 18(1): 389-397. doi: 10.1080/1828051X.2018.1530962
- dos Santos J.S., dos Santos N.S., dos Santos M.L.P., dos Santos S.N., de Jesus Lacerda J.J. (2008). Honey classification from semi-arid, Atlantic and transitional forest zones in Bahia, Brazil. *J Braz Chem Soc* 19: 502-508. doi: 10.1590/S0103-50532008000300018
- Fernandez-Torres R., Perez-Bernal J.L., Bello-Lopez M.A., Callejon-Mochon M., Jomenez-Sanchez J.C., Guiraum-Perez A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta* 65(3): 686-691.
- Formicki G., Greń A., Stawarz R., Zyśk B., Gał A. (2013). Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Pol J Environ Stud* 22: 99-106.
- Fredes C., Montenegro G. (2006). Heavy metals and other trace elements contents in Chilean honey. *Cien Inv Agr* 33: 50-58.
- Golob T., Doberšek U., Kump P., Nečemer M. (2005). Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chem* 91: 593-600. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.04.043
- 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. doi: 10.1007/s10661-012-2847-y
- Habib H.M., Al Meqbali F.T., Kamal H., Souka U.D., Ibrahim W.H. (2014). Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chem* 153: 35-43. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.048
- Hernández O.M., Fraga J.M.G., Jimenez A.I., Jimenez F., Arias J.J. (2005). Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chem* 93(3): 449-458. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.036
- Imtara H., Elamine Y., Lyoussi B. (2018). Physicochemical characterization and antioxidant activity of Palestinian honey samples. *Food Sci Nutr* 6(8): 2056-2065. doi: 10.1002/fsn3.754
- Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., Beeregowda K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 7: 60-72. doi: 10.2478/intox-2014-0009
- Khan F.R., Abadin Z.U.I., Rauf N. (2007). Honey: nutritional and medicinal value. *Int J Clin Pract* 61(10): 1705-1707. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01417.x
- Khan R.U., Naz S., Abudabos A.M. (2017). Towards a better understanding of the therapeutic applications and corresponding mechanisms of action of honey. *Environ Sci Pollut Res* 24: 27755-27766. doi: 10.1007/s11356-017-0567-0
- Lasić D., Bubalo D., Bošnjir J., Šabarić J., Konjačić M., Dražić M., Racz A. (2018). Influence of the botanical and geographical origin on the mineral composition of honey. *Agri Conspec Sci* 83(4): 335-343.
- Machado De-Melo A.A., Almeida-Muradian L.B., Sancho M.T., Pascual-Maté A. (2017). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J Apic Res*. doi: 10.1080/00218839.2017.1338444
- Mandal M.D., Mandal S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 1(2): 154-160. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60016-6
- Moujanni A., Partida L., Essamadi A.K., Hernanz D., Heredia F.J., Terrab A. (2017). Physicochemical characterization of unique unifloral honey: *Euphorbia resinifera*. *CyTA - J Food* 1-8. doi: 10.1080/19476337.2017.1333529
- Moujanni A., Terrab A., Eddoha R., Nasser B., Benbachir M., Tannaoui M., Zouaoui A., Essamadi A.K. (2017). Quantification of heavy metals and pesticides residues in labeled Moroccan *Euphorbia resinifera* honey from Tadla-Azilal. *J Mater Environ Sci* 8(5): 1826-1836.
- Nozal Nalda M.J., Bernal Yagüe J.L., Diego Calva J.C., Martín Gómez M.T. (2005). Classifying honeys from the Soria province of Spain via multivariate analysis. *Anal Bioanal Chem* 382(2): 311-319. doi: 10.1007/s00216-005-3161-0
- Oroian M., Amariei S., Leahu A., Gutt G. (2015). Multi-element composition of honey as a suitable tool for its authenticity analysis. *Pol J Food Nutr Sci* 65(2): 93-100.
- Oroian M., Prisacaru A., Hretcanu E.C., Stroe S.G., Leahu A., Buculei A. (2016). Heavy metals profile in honey as a potential indicator of botanical and geographical origin. *Int J Food Prop* 19(8): 1825-1836. doi: 10.1080/10942912.2015.1107578
- Pisani A., Protano G., Riccobono F. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chem* 107(4): 1553-1560. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.029
- Pohl P. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *TrAC-Trends Analyt Chem* 28(1): 117-128. doi: 10.1016/j.trac.2008.09.015
- Ponikvar M., Šnajder J., Sedej B. (2005). Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂. *Apidologie* 36: 403-409. doi: 10.1051/apido:2005027
- Rashed M.N., Soltan M.E. (2004). Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. *J Food Compos Anal* 17: 725-735. doi: 10.1016/j.jfca.2003.10.004
- Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash M.S.H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem* 119: 157-184. doi: 10.1002/jcb.26234

- Ru Q-M., Feng Q., He J-Z. (2013). Risk assessment of heavy metals in honey consumed in Zhejiang province, southeastern China. *Food Chem Toxicol* 53: 256-262. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.015
- Silva L.R., Sousa A., Taveira M. (2017). Characterization of Portuguese honey from Castelo Branco region according to their pollen spectrum, physicochemical characteristics and mineral contents. *J Food Sci Technol* 54(8): 2551-2561. doi: 10.1007/s13197-017-2700-y
- Silva L.R., Videira R., Monteiro A.P., Valentão P., Andrade P.B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchem J* 93: 73-77.
- Solayman M., Islam M.A., Paul S., Ali Y., Khalil M.I., Alam N., Gan S.H. (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 15(1): 219-233. doi: 10.1111/1541-4337.12182
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment, in: Luch A. (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Springer Basel, Basel, pp. 133-164. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Vincevica-Gaile Z., Klavins M., Rudovica V., Viksna A. (2011). Geographical dissemination of trace and major elements in honey. *WIT Trans Ecol Envir* 167: 211-220.

aCS85_39