REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI-MERBAH

OUARGLA

Faculté des sciences de la Nature, de la vie, de la terre et de l'Univers-

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes supérieures en Biologie

Option : Microbiologie

L'effet antimicrobien du miel

Présenté par :

Melle HAMMOUDI Embarka

Melle BOUDERHEM Amel

Encadrée par :

Promoteur	Mr MERAH Mostefa	M.C.B	Univ. Ouargla
Co- Promoteur	Mr KHODIR Abdalla	Ch .département	CAQE. Ouargla

Année Universitaire: 2008/2009

Dédicaces

Au nom du DIEU clément et miséricordieux et que le salut de **DIEU** soit sur son prophète **MOHAMED**

Nous dédions ce Modeste travail :

amel

Aux être qui me sont les plus chers au monde :
A l'amé de ma chère maman
A papa et mes frère "saci ,atman , Younes"
A ma chère sœurs :"sabah, fatiha et hanan "
A ma grande famille maternelle"chenine"
A tous mes tantes et oncles surtout (arbi)
A tout qui me aide"Chenine halime et Chenine mehdi ,T ammar kasm"
A mes élèves de cours sourtout rahma.
A tous mes amis surtout "khadidja, ghnia ,halima , samia ,hanane ,maria ,nacira, mounir
A zieneb, merci à votre gentillesse.

mbarka

Aux être qui me sont les plus chers au monde :
A l'amé de ma chère maman et papa
A mon frère et mes chères sœurs
A tous mes tantes et oncles
A ma grande famille "hammoudi"
A tous mes amis

Mbarka et amel

A tous nous amis :ahmed bess , khlasse,manel ,fatima, rokia hammoudi
A tous ceux qui ont contribué à notre formation.
A tous personnel de bibliothèque.

Remerciements

*Tout d'abord la notre **DIEU** seul le tout puissant qui nous a éclairé le chemin et nous a guidé pour terminer notre étude.*

Nous adressons nos plus vifs remerciements :

*-A Monsieur "**MRAH, M**" maître assistant .Notre e encadreur pour son soutien indéfectible et ses précieux durant L'élaboration de ce projet.*

*-A Monsieur " **KHODIR** " notre copromoteur pour ses conseils s et son aide afin accomplir ce travail.*

*-A Monsieur "**Belfar**" qui nous a fait le grand honneur de diriger cette étude.*

*-Monsieur "**Bahi**" et tout l'équipe du laboratoire d'hôpital Memd Boudiaf.*

*-On remercie également tous les techniciens du laboratoire, on cite autres Mr"**AICHE**" pour nous a voire faciliter la tache et tous ceux qui ont participé de prés ou loin à réalisation de ce mémoire.*

Résumé

Le miel, élaboré par les abeilles est constitué essentiellement de sucre , et d'eau et d'autres substances d'origine végétale et animale que font de lui un produit complexe hétérogène, variable, au cours du temps.

Quatre facteurs principaux sont avancés à ce propos : sa forte osmolarité, son pH acide, le système peroxyde d'hydrogène et le facteur phytochimiques

Le présent travail est une contribution à l'évaluation de l'effet antimicrobien de quelques échantillons récoltés de trois site en Algériens il s'agit de (Djidjel , Tiziouzoet Sidi bel abbés) et un échantillon du miel importé (Chifaà) d'origine de l'Arabie saoudite , vis-à-vis d'une gamme de souches microbiennes à caractère pathogène .

L'approche expérimentale est basée sur l'évaluation de ce pouvoir antimicrobien à travers une technique conventionnelle : technique de diffusion en gélose.

Les résultats obtenus démontrent clairement l'impact du miel sur la sensibilité microbienne, cet effet inhibiteur à été constaté pour la plupart des échantillons testés avec une certaine variabilité d'un échantillon à un autre et d'une souche à une autre.

Nous avons retenu trois (3) catégories de germes selon leur degré de sensibilité à savoir : souches très sensibles, moyennement sensibl et faiblement sensibles.

En conséquence nous avons classé les miels testés selon leur pouvoir inhibiteur. Les miels locaux se sont avérés les plus efficaces car ils ont montré un grand pouvoir bactéricide et fongistatique vis-à-vis de la plupart des souches pathogènes.

Mots clés : pouvoir antimicrobien, miels, souches microbiennes.

ملخص

العسل المحضر من طرف النحل, يتكون أساسا من السكر, الماء ومكونات أخرى من أصل نباتي و حيواني مما تجعله منتوج معقد, غير متجانس ومتغير على مر الزمن.

أربعة عوامل رئيسية قدمت في هذا الصدد: قوة نفاذية تركيزه, كمونه الهيدروجيني الحمضي,نظام الأكسيد الفوقي للهيدروجين والعوامل الفيتوكيميائية (الكيمائية النباتية).

هذا العمل المقدم يمثل إسهام في تقييم التأثير ضد المكروبات لعينات من العسل تم جمعها من ثلاث مناطق من التراب الوطني و هي (جيجل,تيزي وزو وسيدي بلعباس) بالا صافة إلى عينة من العسل المستورد (الشفاء) اخترنا لهده الدراسة أربع سلالات ميكروبية ذات طبيعة ممرضة .

إن الوجهة التجريبية قائمة على تقييم التأثير ضد المكروبات عن طريق التقنية المتفق علي تسميتها : تقنية الانتشار في الجيلوز.

النتائج المتحصل عليها تبين بوضوح أثر العسل على حساسية المكروبات, هذا الأثر التثبيطي كان ملاحظ عند أغلبية العينات المختبرة مع بعض التفاوت من عينة إلى أخرى ومن سلالة إلى أخرى .
لقد حددنا ثلاث فئات من الجراثيم وهدا حسب درجة حساسيتها: سلالات جد حساسة, نوعا ما حساسة وأخرى حساسيتها ضعيفة. وبناء عليه, قد قمنا بتصنيف عينات العسل المختبرة على حسب قدرتها التثبيطية. فاتضح أن العسل المحلي جد فعال لقدرته على الإبادة الكبيرة: للجراثيم و الفطريات الممرضة.

كلمات المفتاح :
التاثير ضد المكروبات , العسل, السلالات المكروبية .

Abstract

Made by bees;, honey consists of mainly sugar ;water and other substances from animal and vegetal origin; there by rendering it a complex heterogeneous product that is variable in time .

Four principal factors are advanced. Its high osmolarity; its acid pH, its hydrogen peroxide system and the phytochemical factor.

The present work is a modest contribution to evaluated the antimicrobial power of Algerian honey types(Djidjel , Tiziouzou and Sidi bel abbés) as well as Imported honey type Chifaa according to microbial strains with pathogen characteristics.

The experimental approach is based on the evaluation of this antimicrobial power through conventional technique on gelose.

We have retained three germ categories according to their degree of sensitiveness, from a very sensitive, to averagely sensitive to resistant strain.

Thus, we have classified the tested types of honey to its inhibitor power .Local types of honey have proven to be efficient, for they have shown a big bactericide and fungi static power according to most pathogen strains.

Key words: Antimicrobial power, honey, microbial strains.

Liste des tableaux

Tableau N°01: Principaux composants du miel en %(White *et al* cités par Prost ,1979)..... 09

Tableau N°02 : Les propriétés thérapeutiques de quelques miels mono floraux (DONADIEU 1978)……... 12

Tableau N°03 : Influence de la richesse en levures sur la fermentation des miels (CHAUVIN, 1968.)……... 15

Tableau N°04 : Echantillons de miel……..... 20

Tableau N°05 : Bactéries et levures retenus……..... 21

Tableau N°06 : Antibiotiques utilisés……..…. 24

Tableau N°07 : Etude morphologique des souches bactériennes testées ……. 29

Tableau N°08 : Lecture de résultats des galeries API20de ***E. coli*** **et** ***Serratia marcescens***…… 30

Tableau N°09 : Mesures obtenuEs par l'antibiogramme des Gram (-)……..... 33

Tableau N°10 : Mesures obtenues par l'antibiogramme des cocci Gram positifs ……... 34

Tableau N°11 : Résultats des moyennes des diametres d'inhibition en (mm)……..... 40

Liste des figures

Figure N°01: Une abeille butinant du nectar **(A**) et magasinant dans les alvéoles de la ruche (**B**) (d'après WEBMASTER.2)……..……02

Figure N°02 : Principe de la lecture d'un antibiogramme……....26

Liste des photos

Photo N°01 : Résultats d'isolement…….. 27

Photo N°02 : Résultats de l'aspect microscopique des souches bactériennes au

G : x1000……. 28

Photo N°03 :*Candida albicans* au G:X1000..... 29

Photo N°04 : Galerie API 20E de ***E. coli* et *Serratia marcescens***..... 30

Photo N°05 : Test de coagulase..... 31

Photo N°06 : Antibiogramme de ***E. coli***…… 32

Photo N°07 : Antibiogramme de ***Serratia multicins…***……. 32

Photo N°08 : Antibiogramme de ***Pseudomonas aeroginosa***……..... 32

Photo N°09 : Antibiogramme de ***Staphylococcus aureus***……. 33

Photos N°10 : Effet de miel sur ***E. Coli***..... 35

Photo N°11 : Effet de miel sur ***Serratia multicins***..... 36

Photo N°12 : Effet de miel sur ***Pseudomonas aeroginosa*** 37

Photo N°13 : Effet de miel sur ***Staphylococcus aureus***..... 38

Photo N°14 : Effet de miel sur ***Candida albicans***..... 39

Liste des abréviations

- -: test négatif.
- % : pourcentage.
- +: test positif.
- C° : degré Celsius.
- Ug : microgramme
- UL : Microlitre.
- ADH : arginine dihydrolase .
- AMY : amygdaline
- ARA : arabinose
- CTT : citrate de sodium.
- CMI : concentration minimale inhibitrice.
- E. coli: Echerichia coli
- Ech : Echantillon.
- Eté : Etcetera.
- FAO : Food And agriculture organization
- G: Grossissement.
- GEL : gélation
- GLU : glucose
- Gram (-) : Gram négatif
- Gram (+) : Gram positif
- h : heure.
- H2O2 : eau oxygénée.
- H2S sulfure d'hydrogène:
- HMF : Hydroxy méthyl furfural.
- IgG : immunoglobuline de type ô
- IND: indole
- INO: inositol
- INRA: institut national de la recherche agronomique
- LDC : lysine décarboxylase
- MAN: mannitose
- MEL: melibiose
- Mg: milligramme
- MH : Mueller hinton
- ML : millilitre
- mm : millimètre
- N :Numèro
- NaCI :chlororure de sodium
- NO2 : nitrate

- ODC: Ornithine décarboxylase
- OGY: Oxytétracycline levure glucose agar
- OMS: organisation mondiale de la santé
- ONPG : Ortho-nitro –phenyl-galactosidase.
- P: Pseudomonas
- pH : Potentiel d'hydrogène
- PDAac : Potatoes dextrose aga.
- RHA : rhamnose
- S: Staphylococcus
- SAC : saccharose.
- SBA : sidi bel abbés.
- SOR : sorbitol
- T° : température,
- TDA : tryptophane désaminase
- UFC : unités formant une colonie
- URE : urée
- VP : Voges

Sommaire

Introduction 01
ChapitreI : Etude bibliographique
1- Historique 02
2- Définition 02
3 - Origine 03
3.1 - Nectar 03
3.2 - Miellat 04
4 - Formation du miel 04
4.1 - Concentration 04
4.2 - Protection 04
4.3 - Transformation 04
5 - Les principales variétés de miel 05
5.1 - L'origine 05
5.1.1 - Miel de nectar (miel de fleur) 05
5.1.2 - Miel de miellat (miel de forêt) 05
5.2 - Le mode d'obtention 05
5.2.1 - Miel en rayons 05
5.2.2 - Miel avec morceaux de rayons 05
5.3 - Le mode de traitements 06
5.4 - Les taxons butinés 06
6 - Composition 06
6.1 - L'eau 06
6.2 - Les glucides 07
6.3 - Les acides organiques 07
6.4 - Les protéines 07
6.5 - Les sels minéraux 07
6.6 - Les enzymes 07
6.7 - Autres constituants 08
7 - Propriétés 09
7.1 - Propriétés physiques 09
7.1.1 - Propriétés mécaniques 09
7.1.2 - Propriétés thermiques 10
7.1.3 - Propriétés électriques 10
7.1.4 - Propriétés optiques 10
1.7.2 - propriétés chimiques 11
7.3 - Propriétés biologiques 11
7.3.1 - Valeur thérapeutique 11
7.3.2 - Valeur alimentaire 12
8 - La cristallisation 13
9 - L'altération 13

9.1 - Le vieillissement 13
9.2 - La température 14
9.3 - La lumière 14

9.4 - Les ultrasons 14
9.5 - La fermentation 14
15
10 - Propriétés antimicrobiennes du miel 15
10.1 - L'osmolarité 16
10 .2 - L'effet du pH 16
10.3 Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 17
10.4 - Autres facteurs 17
11 - Autres produits de la ruche 17
11.1 – Le pollen 18
11.2 - La cire 18
11.3 - La gelée royale 18
11.4 - La propolis 19
11.5 - Le Venin 19
12 - Miels toxique
Chapitre II : Matériels et méthodes 20
1- Matériels et méthodes 20
1.1 - Matériel biologique 20
1.1.1 - Le miel 20
1.1.2 - Micro-organismes testés 21
1.2- Matériel utilisée pour l'étude microbiologique :(voir annexe 01) 21
2- Méthode d'étude 21
2.1 - Isolement et purification 21
2.1.1- Bactéries 21
2.2- Identification des souches bactériennes 21
2.2.1- Etude des caractères morphologiques 21
2.2.1.1- Bactéries 22
2.2.1.2- levures 23
2.2.2- Etude des caractères biochimiques 23
2.2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques 25
2.3- Etude du pouvoir antimicrobienne du miel 25
2.3.1 - Evaluation de pouvoir antibactérien 25
2.3.1.1 - Méthode de diffusion sur gélose 25
2.3.1.2 - Technique des disques 26
Chapitre III : Résultats et discussions
1- Identification des souches microbiennes 27
1.1- Caractères morphologiques et biochimiques 27
1.1.1- Caractères morphologique 27
1.1.2- Caractères biochimiques 30
2- Résultat de l'antibiogramme 32
2.1- Antibiogramme des bactéries Gram négatives 32
2.2- Antibiogramme des bactéries Gram positives 33
2.3- Discussion des résultats d'antibiogramme 34
3- Évaluation de l'activité antimicrobienne du miel 34
4- Discussion des résultats d'etude qualitative sur l'activité de miel 41
Conclusion 44
Références bibliografiques 45
Annexes

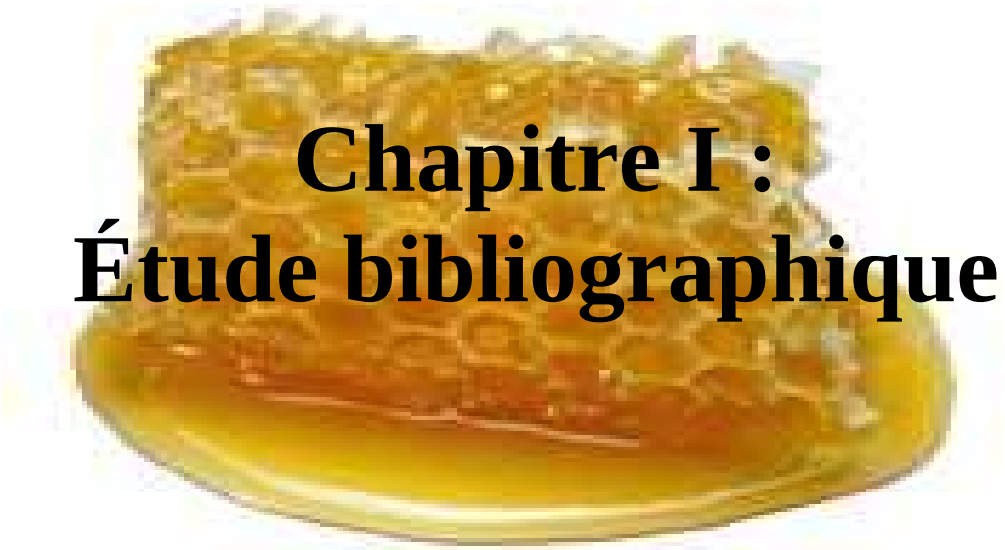
Introduction

La connaissance et l'utilisation du miel par l'homme remonte aux temps les plus reculés de son histoire et il fait partie indubitablement des aliments les plus anciens de l'humanité. Le Saint Coran et le Hadith du prophète présentent le miel.

En tant que guérisseur de maladies (Sourate « El-Nahl » verset 68-69) et comme a dit le prophète (bénédiction et paix sur lui) : "Le miel est un remède pour chaque maladie et le Coran est un remède pour toutes les maladies d'esprit, c'est pourquoi je vous recommande les deux remèdes : le Coran et le miel" (RAPPORTE PAR L'IMAM BUKHARI).

L'impact des maladies infectieuses ne cesse de croître dans le monde. Cela est du généralement au phénomène de l'antibio-résistance. Pour cette raison des études récentes s'intéressent aux vertus thérapeutiques de certains produits naturels, sachant que ces derniers ne présentent pas généralement des effets secondaires. Le miel compte parmi tes produits les plus convoités. En raison de ses propriétés inhibitrices et thérapeutiques de nombreuses études se sont intéressées aux propriétés thérapeutiques du miel (BALTRUSAITYTE *ET COL , 2007).*

Dans cette optique, ce présent travail fixe pour principal objectif la valorisation des propriétés thérapeutiques du miel particulièrement son pouvoir antimicrobien vis-à-vis de certain micro-organismes pathogènes source de maladies et d'infections graves.



Chapitre I :
Étude bibliographique

1 – Historique

Tout au long de l'histoire, une mythologie s'est développée autour du miel, soulignant ses nombreuses propriétés médicinales et l'érigeant en symbole de vie et de richesse. Le miel serait purificateur, antiseptique, tonifiant, sédatif, fébrifuge, apéritif et digestif. À l'origine, le miel était rare. On s'en servait entre autres, pour soigner, pour embellir la peau et pour embaumer les morts. Dans les préparations culinaires, l'utilisation du miel dénotait un certain raffinement ; son usage en cuisine relevait du privilège. Le miel a longtemps servi d'agent de conservation pour les fruits et a peu à peu cédé sa place au sucre et c'est a partir du moyen âge que l'utilisation du miel fut limitée à la confiserie et à la médecine en Europe (WEBMASTER.L).

2- Définition

Selon le CODEX ALIMENTARIUS (FAO -QMS ,1969) le miel est défini comme suit : «Le miel est la substance sucrée produite par les abeilles mellifiques à partir du nectar des fleurs ou des sécrétions provenant des parties vivantes de plantes ou se trouvant sur elles, qu'elles butinent, transforment, combinent avec des matières spécifiques et emmagasinent dans les rayons de la ruche».

A **B**

Figure N°01: Une abeille butinant du nectar **(A**) et magasinant dans les alvéoles de la ruche (**B**)(d'après WEBMASTER.2)

3 – Origine

La matière première de toute sorte de miel provient exclusivement des plantes que fréquentent les abeilles (LIBIS, 1971). Selon le mode d'extraction de cette matière «sève élaborée», on en distingue (PROST, 1987) :

3.1 - Nectar

Le nectar est une sécrétion sucrée produite par des organes glandulaires des végétaux appelés «les nectaires» qui sont très souvent situés dans les fleurs (BONIMOND, 1983).

BIRI (1986) signale que les différents degrés de densité du nectar sont en fonction de l'espèce végétale et du climat. En 1999, le même auteur note que le nectar peut contenir jusqu'à 80% d'eau, 7 à 60% de sucre, des traces d'acides aminés, de sels minéraux, d'hormones végétales, de pigments et de vitamines. Prost (1979) estime que le transport d'un litre de nectar nécessite de nombreux voyages d'abeilles de l'ordre de 20 000 à 100 000 voyages.

3.2 - Miellat

D'après Prost (1979) le miellat est un liquide sucré que les abeilles butinent sur les feuilles de divers arbres ou arbustes comme le Sapin, mélèze, chêne et le tilleul, son origine est l'excrétion des pucerons, des cochenilles ou des autres hémiptères, parasites des végétaux dont ils sucent la sève élaboré, celle-ci est filtrée dans le corps de l'insecte parasite ; les sucres et l'eau qu'elle contiennent en excès sont rejetés par l'anus sous forme de gouttelettes sirupeuses formant le miellat. LIBIS (1971) ajoute que les miels de miellats ont un goût agréable et sont plus foncés que les miels de fleurs. RAVAZZI (1996) note que le miellat se distingue du miel par sa composition plus poisseuse et par sa forte teneur en protéines.

4 - Formation du miel

Le nectar et miellat ne sont pas emmagasinés directement dans la ruche ; cette formation se fait en 4 étapes (PROST, 1987).

4.1 - Concentration : elle s'effectue en deux phases:

***Première phase :** Une abeille refoule le contenu de son jabot dans une alvéole ; la goutte du liquide sucré s'étale et perd de l'eau par évaporation. Le processus dure environs vingt minutes et le produit fini est ramené à une teneur en eau de 40 à 50%.

***Deuxième phase :** Dans les rayons et pendant plusieurs jours, le liquide laisse évaporer passivement son eau ; sa concentration en sucre croît jusqu'à atteindre les 70 à 80 % pour 14 à 25% d'eau.

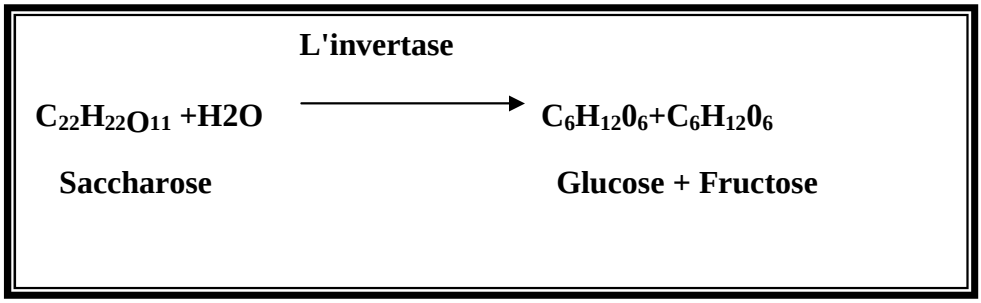
4.2 - Protection

Les abeilles recouvrent le miel bien concentré d'un opercule de cire. Malgré ça, les miels contenant 21% d'eau ou plus peuvent fermenter dans les rayons, sous les opercules : SEULS LES miels à moins de 18% d'eau se conservent bien.

4.3 - Transformation

Les abeilles provoquent aussi les transformations biochimiques du nectar et du miellat. Les sécrétions de ferments ont pour action principale l'inversion du saccharose en glucose et en fructose sous l'action d'enzymes (l'invertase ou saccharase).

La transformation ou l'inversion s'exprime par l'équation suivante :



5 - Les principales variétés de miel : On peut classer les miels selon :

5.1 - L'origine

5.1.1 - Miel de nectar (miel de fleur)

C'est le miel qui est élaboré par les abeilles à partir du nectar des fleurs. (LAMBALLAIS,1989).

5.1.2 - Miel de miellat (miel de forêt)

C'est le miel obtenu principalement à partir des sécrétions provenant des parties vivantes de plantes ou se trouvant sur elles ; sa couleur va du brun clair ou brun verdâtre à une teinte presque noire (VERDAN, 2002). BIRI (1999) rapporte que le miel de miellat a une couleur foncée, un goût agréable et très riche en sels minéraux.

5.2 - Le mode d'obtention

D'après CAILLAS (1974), on distingue les modes suivants :

5.2.1 - Miel en rayons

C’est le miel emmagasiné par les abeilles, dans les alvéoles operculées de rayons fraîchement construits par elles-mêmes, ne contenant pas de couvain et vendu en rayons, entiers ou non.

5.2.2 - Miel avec morceaux de rayons

II contient un ou plusieurs morceaux de miel en rayons.

5.3 - Le mode de traitements

Le CODEX STAN (1981) reconnaît les types de miels suivants :

a) Miel centrifugé : C'est le miel obtenu exclusivement par centrifugation de rayons désoperculés ne contenant pas de couvain.

b) Miel pressé : C'est le miel obtenu par pressage de rayons désoperculés ne contenant pas de couvain, avec où sans traitement thermique modéré.

c) Miel égoutté : C'est le miel obtenu par égouttage des rayons désoperculés ne contenant pas de couvain.

5.4 - Les taxons butinés

Pour déterminer le type de miel de fleurs, on procède à son analyse pollinique.

> **Miels uni floraux (mono floraux)** : Proviennent de façon prédominante d'une plante bien déterminée (HUCHET et col, 1996).

> **Miels multi floraux :** sont communément appelés « miel toutes fleurs ». Ces miels sont élaborés à partir de plusieurs espèces de plantes visitées durant la saison (CLEMENT, 2003). Selon GOUT (1989) se sont des miels dont l'origine florale est jugée peu valorisante. Ils ne présentent aucune dominance d'une plante donnée.

6 - Composition

La composition du miel dépend de très nombreux facteurs : espèces butinées, nature du sol, race d'abeilles et état physiologique dé la colonie (PROST, 1979).

6.1 - L'eau

Selon DONADIEU (1978) le miel contient un certain pourcentage d'eau qui varie en moyenne de 16 à 20 %; cette teneur en eau ; est l'une des caractéristiques les plus importantes du miel dans la mesure où elle conditionne pratiquement sa qualité (l'optimum se situe entre 17 et 18%).

6.2 - Les glucides

Les sucres du miel représentent 95 à 99,9 % de sa matière sèche. Le dextrose et le fructose sont les composés essentiels du miel car ils représentent plus de 85% de la matière sèche (WHITE et DONER, 1980).

6.3 - Les acides organiques

Tous les miels ont une réaction acide. Le pH optimum est de 3,9 et peut varier de 3,2 à 4,5. Ces miels contiennent, non pas, comme on le croyait autrefois, de l'acide formique provenant de la glande à venin, mais un mélange d'acides organiques dont certains sont présents dans le nectar alors que d'autres résultent des multiples réactions chimiques au cours de l'élaboration du miel. L'analyse de ces acides organiques a montré qu'ils sont nombreux ; mais c'est l'acide gluconique provenant du glucose qui domine. Son origine serait une bactérie appelée Gluconobacter qui, lors de la maturation du miel, transformerait le glucose en acide gluconique (DESCOTTES, 2004).

6.4 - Les protéines

JOLY (1984) signale que les protides sont présents dans le miel en faible quantité soit une teneur de 0,3 à 0,60 %. Selon le même auteur, il s'agit essentiellement de peptone, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines qui proviennent soit de la plante ou de l'abeille, et d'acide aminés libres tel que la proline.

6.5 - Les sels minéraux

Il s'agit surtout du potassium, du sodium, du manganèse, du cuivre et du calcium. Leur teneur est en moyenne de 0,17% (PHILLIPPE, 1993).

6.6 - Les enzymes

Le miel contient plusieurs enzymes qui peuvent provenir selon WHITE et DONER (1980), des abeilles, du pollen, du nectar, ou encore des microorganismes.

D'après DONADIEU (2006), les principaux enzymes sont les amylases α et β, la gluco-invertase et la gluco-oxydase. On trouve également de la catalase ainsi qu'une phosphatase (CHAUVIN, 1968).

6.7 - Autres constituants

En plus des principaux constituants, le miel renferme des composés organiques d'une extrême variété et dont une partie seulement est connue, à savoir :

• **Vitamines :** Le miel est relativement pauvre en vitamines si on le compare à d'autres aliments. On n'y trouve aucune vitamine liposoluble (vitamine A et D), mais un peu de vitamine du groupe B et occasionnellement un peu de vitamine C. Les vitamines du miel ont presque toujours leur origine dans les grains de pollen qu'il contient en suspension (DESCOTTES, 2004).

• **Lipides :** Selon DONADIEU (2006) la fraction lipidique représente une faible quantité sous forme de glycéride et acide gras (oléique, palmitique).

• **Substances aromatiques :** On a isolé, des différents miels, plus de 50 substances aromatiques qui paraissent provenir exclusivement de la plante (DESCOTTES, 2004). Selon CHAUVIN (1968), les principaux constituants découverts sont des alcools aliphatiques, des aldéhydes et des cétones qui interviennent en proportions variables dans les miels de différentes origines.

• **Colloïdes :** La teneur en colloïdes des miels varie approximativement de 0,1 à 1%, les miels les plus foncés étant les plus riches, ils sont constitués par des protéines, des substances cireuses, des pigments, des pentosanes et des substances diverses non identifiées (CHAUVIN, 1968).

• **HydroxyMéthylFurfural (H.M.F)** : L'HMF est un aldéhyde cylindrique C6H6O3 issu de la dégradation des sucres en premier lieu par déshydratation du fructose et du glucose en milieu acide et température élevée (GHOSDAR et col, 1992). C'est un indicateur d'âge car il n'est pas présent lors de la récolte du miel, il se forme très lentement dans le temps, sa production est liée à l'acidité du milieu et est favorisée par une forte teneur en fructose (DESCOTTES, 2004). Ce composé provient de la dégradation thermique du fructose lors du chauffage destinée à rendre les miels homogènes, ou bien il se forme lors du stockage prolongé (VIERLING, 2004).

D'après le CODEX-STAN (1981) : La teneur en hydroxyméthylftirfural du miel après le traitement ne doit pas dépasser 40 mg /kg.

* La composition globale du miel figure dans le tableau ci-dessous

Tableau N° 01 : Principaux composants du miel en %(White et al cités par Prost ,1979).

COMPOSANTS		%
*Eau		7.20
* Sucres	-Lévulose (d -Fructose) : 38.19 -Dextrose (d - Glucose) : 31.28 -Sucrose (Saccharose) : 01.31 -Maltose et autres disaccharides réducteurs : 07.31 -Sucres supérieurs : 01.50 -Sucres totaux : 79.59	79.59
* Acides	-Gluconiques, citrique, malique, succinique, formiques, etc. Acides totaux, calculés en acides gluconiques	0.57
* Protéines	-Acides aminés, acide glutamique, alanine, arginine, glycine, leucine, isoleucine, acide aspartique, valine, histidine et lysine	0.26
* Cendres	-Minéraux : potassium, sodium, magnésium, calcium, phosphore, fer, manganèse, cuivre, etc.	0.17
*Composants mineurs	-Comprenant principalement des pigments des substances aromatiques, des alcools, des sucres, des tanins, des enzymes et diastases dont l'amylase, la peroxydase, la succinyl déshydrogénase, la phosphatase et les invertases, des vitamines dont la thiamine, la riboflavine, l'acide nicotinique, la vitamine k, l'acide folique, la biotine, la pyridoxine et l'acide pantothénique.	2.21

7 – Propriétés

Le miel est un produit biologique d'une grande complexité, présentant un certain nombre de propriétés physiques, chimiques et biologiques.

7.1 - Propriétés physiques

7.1.1 - Propriétés mécaniques

*** La densité (poids spécifique) :** C'est à dire le rapport de la masse d'un miel avec le même volume d'eau, c'est une donnée très utile pouvant être utilisée pour mesurer la teneur en eau des miels. La valeur moyenne de densité est de 1,4255 à 20 C° (DESCOTTES, 2004).

*** La viscosité :** Selon DESCOTTES (2004), elle dépend de la température, de la teneur en eau et de la composition chimique. Elle diminue quand la température s'élève jusqu'à 30 C° et varie au delà de 35 C° (PROST, 1987).

7.1.2 - Propriétés thermiques

*** Chaleur spécifique :** Pour se réchauffer le miel demande deux fois moins de calories que le même poids d'eau, mais il transmet très mal la chaleur qu'il reçoit de sorte qu'il peut être réchauffé rapidement en un point et rester froid d'un autre côté (Prost, 1987).

*** Conductibilités thermique :** Le miel est 6 fois moins bon conducteur que l'eau (PROST, 1979).

7.1.3 - Propriétés électriques

> **Conductibilité électrique :** C'est la propriété du miel à conduire le courant électrique (BONIMOND, 1983). D'après PROST (1987) la conductibilité électrique est liée à la teneur du miel en matières minérales.

7.1.4 - Propriétés optiques

*** Indice de réfraction :** Le miel a un indice de réfraction qui oscille entre 1.47 et 1.50 selon sa teneur en eau à la température de 20 C° (DONADIEU, 1978).

*** Pouvoir rotatoire :** Il concerne l'action des miels sur la lumière polarisée. La majorité des miels sont lévogyres (PROST, 1979).

*** Coloration :** C'est la mesure de la couleur des miels à l'aide d'un comparateur visuel dit «Pfund-color-grader» ou «Lovibond».0n l'exprime en indice de Pfund. De 1,0 pour les miels les plus clairs à 14,0 pour les plus foncés (BONIMOND, 1983).

Selon PROST (1987), le vieillissement et le chauffage accentuent la coloration du produit. La couleur des miels va du blanc au noir. Elle s'apprécie au moyen de colorimètre et varie selon l'espèce butinée et la rapidité de la sécrétion. (Miel clair si sécrétion rapide)(PROST, 1979).

*** Turbidité :** Lorsque les miels sont ramenés à l'état liquide par passage, à l'étuve à 65°C jusqu'à disparition totale des cristaux de glucose, ils se présentent généralement comme des liquides très transparents. Toutefois, ils contiennent toujours en suspension des éléments figurés (levures, poussières, grains de pollen, colloïdes) qui leur donne une certaine turbidité (CHAUVIN, 1968).

*** Fluorescence :** Beaucoup de miels présentent une fluorescence plus ou moins marquée sous l'action de l'ultraviolet (DESCOTTES, 2004).

1.7.2 - propriétés chimiques

*** pH:** le pH du miel va de 3,2 à 5,5 .il est généralement inférieur à 4 dans les miels de nectar, supérieur à 5 dans ceux de miellats (PROST, 1987).

*** l'hygroscopicité :** Un miel à 18% d'eau se trouve en équilibre dans une atmosphère dont l'humidité relative est de 60% (PROST ,1979)

7.3 - Propriétés biologiques

7.3.1 - Valeur thérapeutique

Grâce à ces sucres, le miel augmente le débit les vaisseaux sanguins, il connu aussi pour ces propriétés antiseptique avec une action remarquable sur la flore intestinale (DONADIEU ET MARCHISE, 1984). Il intervient dans la croissance en favorisant une meilleure rétention de calcium et de magnésium (LAFFONT, 2000). De plus le miel entraîne un accroissement du taux d'hémoglobine dans le sang. En usage externe, il active la guérison des brûlures, des plais et des affections rhinopharyngées. Il a un pouvoir de détoxication du foie en cas d'empoisonnement, en plus c'est un très bon antioxydant, qui par cette activité anti radicalaire, s'avère être un atout de force en terme de prévention contre le cancer (DEXTRIET, 1999).

Le miel stimule la prolifération des lymphocytes et phagocytes, activant ainsi la repense immunitaire à l'infection (BADAWY et AL ; 2004).

Ces propriétés sont communes entre tous les miels, mais chaque miel mono floral, se caractérise par des propriétés thérapeutiques propres à lui.

L’effet thérapeutique de certains miels floraux est exposé dans le tableau ci-dessous.

Tableau N°02: Les propriétés thérapeutiques de quelques miels mono floraux (DONADIEU 1978)

Variétés de miel	Caractérisations habituelles.	Propriétés et indication
Miel d'eucalyptus	Ambre, très aromatique de saveur assez prononcée.	Antiseptique pulmonaire, intestinal, calmant de la toux les maladies broncho-pulmonaires.
Miel d'oranger	Faiblement ambre, saveur agréable et consistance pâteuse, très doux.	Antispasmodique, sédatif utilisé en cas de blessure.
Miel de lavande	Blanc, a doré, parfumé et onctueux.	Bactéricide, calmant ; application externe en cas de blessure. Les maladies respiratoires (asthme, emphysème)
Miel de sapin	Foncé, saveur exquise, fortement aromatique.	Excellant antiseptique et anti-infectieux dans les affections des voies respiratoires et l'anémie.
Miel de romarin	Pale, presque blanc, odeur subtile.	Puissant stimulant de l'état général, combat les colites, Les maladies hépatiques.
Miel de thym	Assez foncé, saveur forte.	Antiseptique vermifuge contre les maladies infectieuses.

7.3.2 - Valeur alimentaire

Selon LIBIS (1971)**,** le miel est un aliment énergétique par excellence et une denrée merveilleuse, il est à la fois : produit naturel, une quintessence des fleurs, aliment incomparable pour les nourrissons, les enfants et les vieillards; reconstituant pour les sportifs et les surmenés, friandise aux parfums varies, soit nature, soit en pâtisserie ou confiserie.

Toujours est il que le miel a beau être aliment naturel n'est pas autant un aliment complet comme le souligne d'ailleurs KHENFER ET FETTAL (2001): il manque de protide et lipide.

8 - La cristallisation

Les miels constituent des solutions sur saturées de différents sucres, correspondent à des systèmes instables dans lesquels se produisent plus ou moins rapidement des phénomènes de cristallisation fractionnée qui intéressent surtout le glucose .Selon la composition des miels et selon la température de conservation, on note des différences considérables dans la vitesse de cristallisation, qui peut aller de quelque jours à plusieurs année (CHAUVIN, 1986). La cristallisation des miels est un phénomène très important car elle détermine sa qualité. Elle est plus rapide à la température, les basses températures retardent la croissance des cristaux, les hautes températures entraînent la dissolution des cristaux qui disparaissent totalement à .Des 78C°.Des 25°C la croissance des cristaux est arrêtée (HUCHET ET Col; 1996). La cristallisation du miel est un phénomène naturel et général et doit être considérée comme une première étape du vieillissement (DESCOTTES, 2004).

9 - L'altération

Vu sa nature biologique et dans le cas d'une mauvaise conservation, le miel peut être enclin à plusieurs altérations et ce par l'effet de plusieurs facteurs à savoir**:**

9.1 - Le vieillissement

Le vieillissement du miel à la température ordinaire aboutit à une dégradation progressive qui se traduit par:

- une parte des substances volatiles qui contribuent à l'arome du miel.
- une augmentation de la coloration .de la teneur en H.M.F et de l'acidité.
- une modification du spectre des sucres.
- une destruction des diastases **(**CHAUVIN.1968).

9.2 - La température

Les températures élevées ont sur le miel un effet assez semblable à celui du vieillissement. Les basses températures ont au contraire un effet de protection contre le vieillissement, par blocage des réactions enzymatiques et chimiques (CHAUVIN, 1968).

9.3 - La lumière

Selon MILLUM en 1948 cité par CHAUVIN (1968), il ne semble pas que l'action de la lumière sur le miel ait fait l'objet d'études très poussées, il indique cependant l'on prétend généralement la lumière décolore le miel **.**DUISBERG et WARNECKE (1959) ont mis en évidence une destruction importante de l'inhibe par rapport à la saccharose.

9.4 - Les ultrasons

Le traitement par les ultrasons détruisent les levures, fait disparaître les germes de cristallisation, mais il apporte également des modifications dans la composition chimique Du produit ainsi que son pH son goût (CHAUVIN, 1968).

9.5 - La fermentation

Tous les miels contiennent des levures et champignons microscopiques responsables des fermentations alcooliques. Ces levures ne peuvent se multiplier que si la teneur en eau du miel est suffisant élevée; une forte concentration en sucres ne les tue pas mais inhibe leur développement.

La marge est faible entre les concentrations qui garantissent la conservation et celles qui la mettent en danger. A partir de 18% d'eau, un miel suffisamment riche en levures est exposé à une fermentation plus ou moins rapide et plus ou moins totale si température est convenable (DESCOTTES, 2004).

D'après CHEVIN (1968), la fermentation du miel est un phénomène lié à la teneur en eau à la température et à la présence de germe susceptible des multiplier au sein de la masse du produit (voir **Tableau N° 03**).

***Tableau N°03**:Influence de la richesse en levures sur la fermentation des miels (CHAUVIN, 1968.

Teneur en eau du miel	Effet de la richesse en levure. Le nombre de germes de fermentation est exprimé par gramme de miel.
Moins de 17,1 %	Pas de fermentation quelle que soit la richesse en l levures.
17.1 à 18,0 %	Pas de fermentation si le nombre de levures ne dépasse pas 1000.
18,1 à 19.0 %	Pas de fermentation si le nombre de levures ne dépasse pas 10.
19,1 à 20.0 %	Pas de fermentation si le nombre de levures ne dépasse pas 1.
Plus de 20 %	Danger de fermentation dans tous les cas.

10 - Propriétés antimicrobiennes du miel

Les propriétés antimicrobiennes du miel ont été exploitées par les hommes, on sait aujourd'hui que le miel provenant d'une ruche saine ne contient pas de bactéries, sous forme végétative. Comme explication de l'activité anti bactériostatique et bactéricide du miel, on avait donne sa teneur en sucre ou bien, la présence de pollen transformé ou encore son pH (LIBIS, 1971). Selon le même auteur la valeur antibiotique du miel est attribuée à l'inhibée, qui est une enzyme très fragile à la chaleur et à la lumière ; il affirme que pour conserver l'activité de cette enzyme il ne faut pas dépasser 80°C pendant de 30 minutes

Selon DESCOTTES (2004), quatre facteurs sont mis en avant à savoir :

10.1 - L'osmolarité

L'effet osmotique est la conséquence de la forte teneur en sucre 84% étant un mélange de fructose et glucose dans le miel. Ce dernier agit comme une solution hypertonique et l'eau contenue représente habituellement 15 à 21% du poids La forte interaction de ces molécules de sucres avec les molécules d'eau laisse très peu de molécules d'eau disponible pour les micro-organismes et conduit à une déshydratation qui absorbe l'eau vitale de ces derniers.

L'effet osmotique joue un rôle fondamental dans l'action anti bactérienne du miel, toutefois un certain nombre de bactéries n'étant pas inhibées dans des milieux à faible coefficient hydrique, il est clair que d'autres mécanismes interviennent.

10 .2 - L'effet du pH

Le pH du miel est relativement acide, il varie entre 3,2 et 4,5. Cette acidité est principalement du à sa teneur en acide gluconique et en gluconolactone.

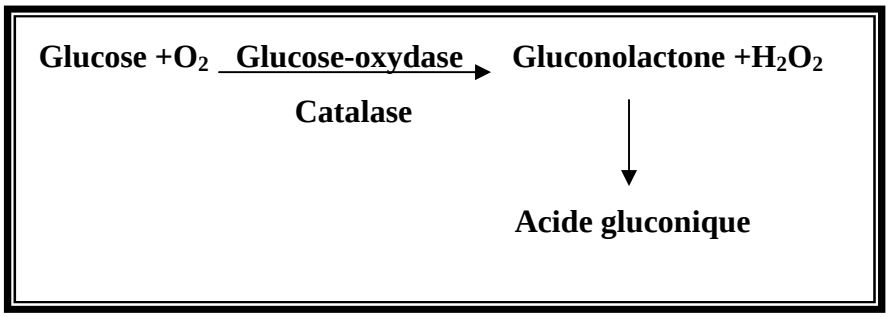
D'autres études retrouvent la persistance d'une activité antibactérienne marquée lorsque le miel a été neutralisé. Malgré ces observations cela ne signifie pas que l'acidité ne contribue pas à l'activité antibactérienne du miel.

Le pH du miel semble être suffisamment bas pour ralentir ou éviter la croissance de nombreuses espèces pathogènes.

10.3 Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

L'activité antimicrobienne de certains miels dépend de leur contenu en peroxyde d'hydrogène endogène (BRUDZYNSKI, 2006).

L'eau oxygénée aussi appelée peroxyde d'hydrogène est considérée comme la principale inhibitive du miel. Elle est produite par réaction enzymatique ; c'est la **glucose-oxydase,** sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel qui permet la réaction suivante :



La réaction montre que la production d'eau oxygénée et d'acide gluconique résulte de l'oxydation de l'eau et du glucose. La catalase réduit l'eau oxygénée, ainsi la concentration en peroxyde dépend donc de l'activité de ces deux enzymes.

L'eau est indispensable au processus d'oxydation, c'est ainsi que le peroxyde d'hydrogène se forme uniquement dans le miel non-mur ou dilué, dans le miel mur, leProcessus est bloqué, avec possibilité de réactivation par dilution (BOGDANOV et BLUMER ,2001).

10.4 - Autres facteurs

Des recherche ont décelé différents inhibiteurs dites peroxydes tel que lysozymes, flavonoïdes, les acides aromatiques et d'autres composants indéterminés du miel. Certaines substances ont une origine végétale et d'autres sont ajoutées par abeilles lors de l'élaboration du miel (BOGDANOV ET BLUMER, 2001).

Prenons le cas des flavonoïdes ; des recherches sur le miel ont permis de mettre en évidence des substances qui sont d'origine botanique et qui contribuent à défense de l'organisme en renforçant lez système immunitaire (LAFFONT, 2000).

11 - Autres produits de la ruche

Parmi les nombreux produits dotés de vertus médicinales que la nature met à notre disposition sans aucune parcimonie et auxquelles nous pouvons faire appel avec une grande facilite, les produits de la ruche occupent une place de choix ; certains depuis la plus haute antiquité comme le miel, la cire et la propolis, d'autres depuis seulement un demi- siècle comme le pollen de fleurs et la gelée royale (WEB MASTER.3).

11.1 – Le pollen

Le pollen se trouve dans les anthères des étamines ; c'est une poudre fine qui sert à la fécondation de la fleur mais qui est également récolte par les abeilles (BIRI, 1986). Il contient environ ; 15% d'eau, 20% de matières albuminoïdes, 40% d'acide aminés, 30% de glucides, des vitamines et en faible proportion toute une gamme d'oligo-éléments (LIBIS, 1971). C'est un complément alimentaire majeur, tonifiant et stimulation générale et rééquilibrant fonctionnel naturel (DONADIEU, 1981).

11.2 - La cire

La cire est une substance grasse sécurité par les glandes cirières des jeunes ouvrières (LOUVEAUX, 1985). Elle contient 71% d'ester d'acide, 14% d'acide, 12% d'hydrocarbures et 03% d'eau (PROST, 1987).

La cire n'est pas antifongique (Chauvin, 1968) .En effet TAUSSON (1928) a montré que **Aspergillus favus** est capable d'utiliser la cire d'abeille comme source de carbone.

11.3 - La gelée royale

D'après DONADIEU (1981): La gelée royale est un produit de sécrétion du système glandulaire céphalique des abeilles ouvrières, produit blanchâtre aux reflets nacrés, à consistance gélatineuse, de saveur chaude, acide et légèrement sucrée.

La gelée royale contient 66% d'eau, 14,5% de glucides, 4,5% de lipides st environs 13% de protides et aussi des vitamines du groupe B, des substances minérales et des oligo-éléments et enfin d'autre constituant dont l'acétylcholine qui est retrouvée en très forte quantité.

Ses propriétés essentielles sont celles de l'augmentation de la résistance biologique, stimulation de l'humeur psychique avec un effet euphorisant et diminution de l'émotivité, eupeptique avec reprise de l'appétit et revitalisation générale.

Elle est indiquée en gastro-entérologie et dans tous les états de fatigue physique et nerveux.

La gelée royale distingue par son pouvoir :

- Antibiotique et fongicide.
- Anesthésiant.
- Cicatrisant.
- Anti–inflammatoire.

11.4 - La propolise

C'est une substance résineuse que les abeilles qui se recueillent sur les bourgeons et l'écorce de certains arbres.

Elle est constituée de 50 à 55% de résine et de baumes, de 25 à 35% de cire, de 10% d'huiles volatile, de5% de polplen ; et de 5% de diverses matières organiques et minérales (WEBMASTRE.4) .Elle est utilisée par des abeilles comme mastic pour restaurer la ruche ou réduire la taille d'une entrée par exemple (VANNIER, 1998).

11.5 - Le Venin

Le venin est secret par une glande acide et par une glande alcaline incluse dans l'abdomen de l'abeille ouvrière. Il est introduit dans notre peau, à raison d'un tiers de mg à la fois, par un appareil vulnérant dont l'aiguillon particulièrement connu (PROST, 1979)

Le venin d'abeille contient de l'acide formique, de l'acide chlorhydrique et de l'acide ortho phosphorique, de même qu'un acide aminé, en se dégradant .fait apparaître de histamine toxique. D'autre substances sont également présentes : de la choline, du tryptophane, du soufre, du phosphate de magnésium, des traces de cuivre et de calcium, des substances azotées, ainsi que des graisse volatiles (causse probable de sensation de douleur cuisant) et des diastases (Webmaster.5).

D'après LIBIS (1971) le venin d'abeille à 4 propriétés fondamentales : le médecin reconnaît son efficacité antirhumatismal et son pouvoir anti- infectieux en cas de bronchite, il est un excellent révulsif et un tonique général.

12 - Miels toxiques

Par opposition à la qualité thérapeutique du miel, MARCHENAY (1984) rapporte que certain miel étaient connus nocifs à cause de leurs origines botanique. Le nectar de ces plantes, sans représenter une toxicité pour les abeilles, peut porter atteinte à la santé humaine.

Chapitre II :
Matériels et méthodes

- ***Objectif***

Ce présent travail repose essentiellement sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de trois variétés de miels locaux et un échantillon de miel importé, vis-à-vis d'une gamme des souches microbiennes.

L'expérimentation s'est déroulée au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université KASDI MERBAH OUARGLA et laboratoire microbiologique d 'ETABLISSEMENT PUPLIQUE MOHAMMED BOUDIAF.

1- Matériels et méthode

1.1 - Matériel biologique

1.1.1 - Le miel

L'étude a porté sur trois échantillons de miel récoltés dans différentes régions du territoire national et un (1) d'importations **(Tableau N°04**).

Tableau N°04: Echantillons de miel

N°échantillon	Provenance	Origine florale	Année de la récolte
01	Jijel	Multi florale	2009
02	Tizi-Ouzou	Multi florale	2007
03	Sidi bel abas	Multi florale	2008
04	Arabie saoudite	Multi florale	2008

1.1.2 - Micro-organismes testés

Les souches microbiennes testées ont été fournies par le laboratoire d'ETABLISSEMENT MOHAMED BOUDIAF.

Il s'agit d'isolats cliniques responsables d'infections nosocomiales. Ainsi nous avons retenu les espèces suivantes cités dans le **Tableau N°05**.

Tableau N°05 *:* Bactéries et levures retenues

Bactéries	***levure***
E.coli ***Serratia marcescens*** ***Staphylococcus aureus*** ***Pseudomonas aeroginosa***	***Candida .albicans***

1.2- **Matériel utilisée pour l'étude microbiologique :(voir annexe 01).**

2- Méthode d'étude

2.1 - Isolement et purification

2.1.1- Bactéries

Hektoen est un milieu sélectif pour les entérobactéries (***Serratia marcescens ; E. coli***) et les pseudomonas ce milieu permet l'inhibition de la flore Gram (+)

Le milieu Chapman, caractérisé par sa fort teneur en NaCl inhibe les bactéries Gram (–) et favorise la croissance des bactéries Gram (+).

2.2- Identification des souches bactériennes

2.2.1- Etude des caractères morphologiques

2.2.1.1- Bactéries

****Mobilité à l'état frais**

Il s'agit de déterminer si la bactérie est mobile ou non.

**** Coloration de Gram**

La coloration de gram est répalisé systématiquement sur les différentes colonnes pour préciser le caractère gram+ ou gram-, le mode de regroupement, et la forme des bactéries. Elle se déroule en plusieurs étapes successives:

1) fixé le frottis

2) recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir 1 min

3) rejeter le colorant, laver à l'eau

4) recouvrir la préparation de Lugol et laisser agir pendant 1 min

5) rejeter Lugol puis laver à l'eau

6) décolorer avec l'alcool à 95°

7) rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de la solution de Fushine diluée laissé agir quelque secondes

8) rejeter la Fushine, laver abondement

9) déposer la lamelle et en fin observer immédiatement au microscope optique

2.2.1.2- levures

***Test de filamentation**

Ce test se fait pour déterminer l'aspect morphologique de levure. Il se fait selon les étapes suivantes :

1) poser 10 ml de sérum de cheval dans un tube aisée stérile

2) ajouter une inoculum de levure

3) incuber le suspension pendant 24 h à 37C°

4) poser sur lame une goutte de ce suspension et le couvert par l' huile du vaseline

5) Voir sous microscope

2.2.2- Etude des caractères biochimiques

*** Galerie API 20E**

Nous avons procédé à l'identification par la galerie API 20E, qui permet de différencier les espèces de la famille des enterobacteriaceae. Son principe consiste à incuber dans les micro -tubes à l'aide d'une pipette pasteur, une suspension bactérienne homogène. L'incubation se fait à 37C° pendant 24h et se traduit par les virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'identification se fait à l'aide d'un tableau de lecture fournies par le laboratoire microbiologique de l'Hôpital.

***Culture sur milieu spécifique**

Le milieu de gélose en Cétrimide est un milieu sélectif pour ***Pseudomonas aerogénosa,*** les colonies sont appariées muqueuses et vertes**.**

***Recherche de la coagulase par la technique de Latex**

La technique utilisée est celle du latex qui consiste à recherche et la détection des Staphylocoques (et plus particulièrement ***Staphylococcus aureus*)** possédant une coagulase (clumping factor) et /ou la protéine A, par une méthode rapide d'agglutination sur carte de particules de latex (en polystyrène sensibilise par du fibrinogène et IgG).

2.2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La méthode d'antibiogramme consiste à déposer des disques de différents antibiotiques pour tester leurs efficacités sur les souches. Les disques d'antibiotiques nous ont été donnés par le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital (BIO RAD4SUSCEPTIBILITE DISKS).Il existe des disques spécifiques des bactéries à Gram (+) et des disques spécifiques des bactéries à Gram (-)

**** Préparation de l'inoculum***

On prélève à l'aide d'une anse de platine deux à trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérile

L'inoculum peut-être ajouté, soit dans la culture s'il est trop faible, ou bien dans l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

*** Ensemencement**

Sur des boites contenant le milieu gélosé **MH** sur une épaisseur de **4mm** bien séchées, on introduit **3** à **5** ml de l'inoculum. On obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe. L'excès du liquide est aspiré à laide d'une pipette pasteur et rejeté dans un bac d'eau de javel et les boites sont mises a sécher pendant **15** minutes.

*** Application des disques**

A l'aide d'une pince stérile, on dépose les disques correspondants à chaque antibiotique en appuyant légèrement pour facilite l'adhérence, les boites sont laissées 20 minutes à la température ambiante pour une bonne diffusion l'antibiotique.

Les choix des antibiotiques dépendent de la sensibilité des bactéries (voir **Tableau N° 06**).

Tableau N°06 : Antibiotiques utilisés

Antibiotiques	Charge(µg)	Antibiotiques	Charge(µg)
Ampiciline AM	10	AcideFusidique FA	10
Amoxicilline AMC	20	Imiperem IPM	10
Amikacine AN	30	Gentamicine GM	10
Clindamycine CM	30	Penicilline P	6
Céfaloxine CN	30	Spiramycine SP	100
Colistine CS	50	Sulfamide SXT	23.75
Céfalozoline CZ	30	Vanomycine VA	30
Erythromycine E	15		

***Incubation**

Les boites sont incubées p18 à 24 h à 37 C°.

***Lecture**

Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle l'extérieur de la boite.

2.3- Etude du pouvoir antimicrobienne du miel

La méthode d'évaluation du pouvoir antimicrobien des miels. Notre choix a porté sur d'une technique standard simple, rapide, économique et faible.

2.3.1 - Evaluation de pouvoir antibactérien

Pour détermine la sensibilité des souches vis–à-vis des trois miels, on a employé une méthode.

2.3.1.1 - Méthode de diffusion sur gélose

2.3.1.2 - Technique des disques

La technique de diffusion sur milieu gélosé, consiste à mettre sur des milieux des cultures spécifiques des agents microbien contact de substances naturelles ou chimiques dans le but d'apprécier leur effet antiseptique.

***Ensemencement**

L'ensemencement est effectué selon la technique de la culture en nappe sur milieu gélose Muller Hinton.

***Application des disques**

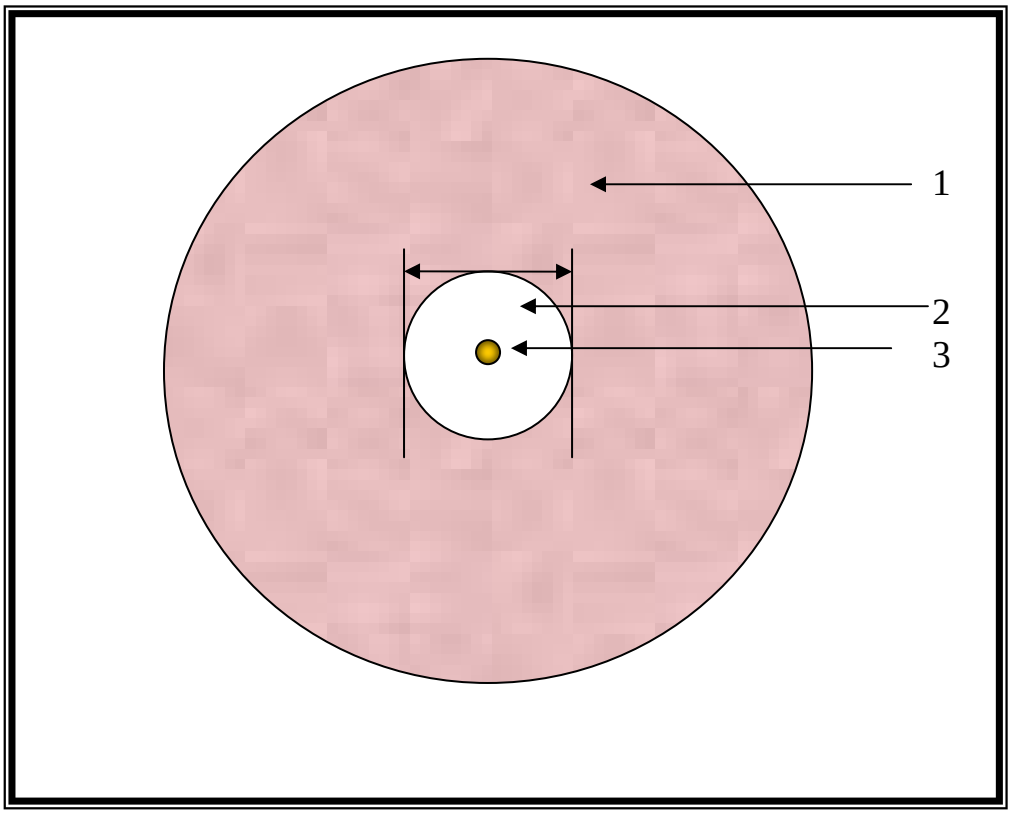
On dépose dans chaque boite des disques stériles imprégnés jusqu'à la saturation dans chaque dilution : **A (0%), B (25%), C (50%), D (75%).**

****L'incubation***

Les boites sont incubées 18 à 24 h à 37C°.

****Lecture***

La lecture se fait de la même façon que la lecture de l'antibiogramme (voir **Figure N°02**).



1- Nappe microbienne.

2- Zone d'inhibition en mm.

3- Disque imprégné par le miel.

Figure N°02 : Principe de la lecture d'un antibiogramme.

***Remarque :** le profile de sensibilité des bactéries aux antibiotiques ou aux disques de miel peut être déterminer par la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

Vue l'absence d'une référence de lecture qui détermine le seuil de sensibilité nous avons considéré si le diamètre de zone d'inhibition est:

Inférieure de 10mm : on dit qu'il y aune résistance

- Egale de10mm : indique-la sensibilité intermédiaire.

-Supérieure de10mm : on dit qu'il y aune sensibilité.

Chapitre III :
Résultats et discussions

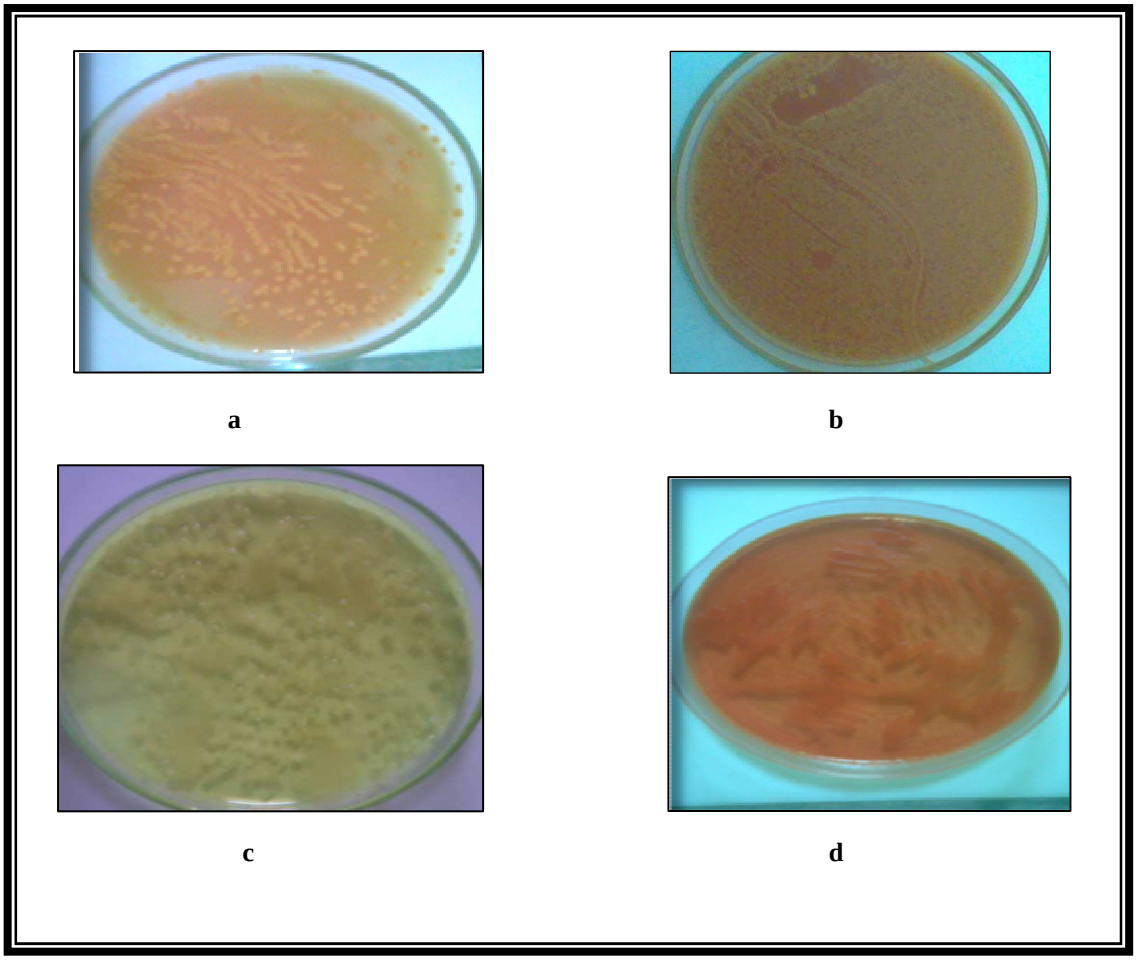
1- Identification des souches microbiennes

1.1- Caractères morphologiques et biochimiques

1.1.1- Caractères morphologiques

***Aspect macroscopique**

Les souches sont isolées sur des milieux sélectifs pour chaque germe (Photo **N°01**).



a: ***Echirichia coli*** sur Hecktoen.

b: ***Serraci marcescens*** sur Hecktoen.

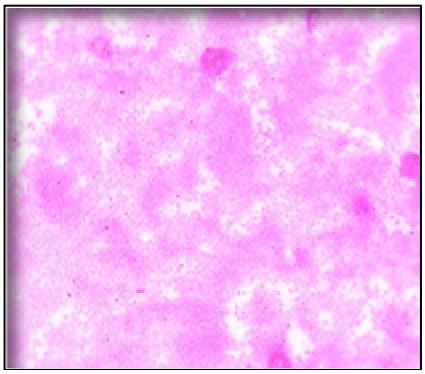
c: ***Pseudomonas aeroginosa*** sur gélose de Cétrimide.

d: ***Staphylococcus aureus*** sur Chapman.

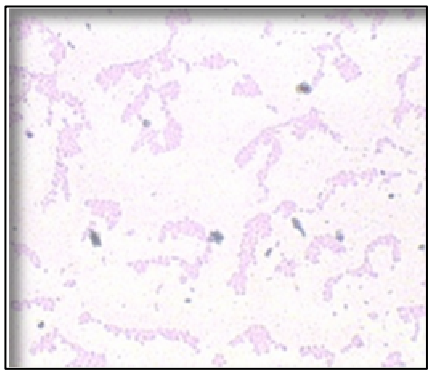
Photo N°01 : Résultats d'isolement des souches bactériennes

*** Aspect microscopique**

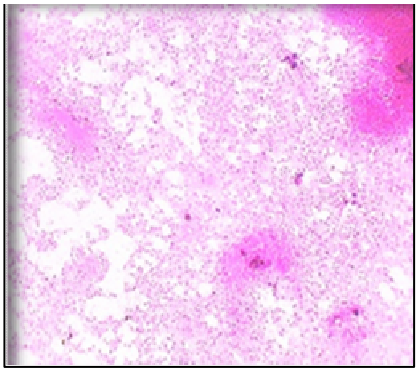
**** Bactéries**



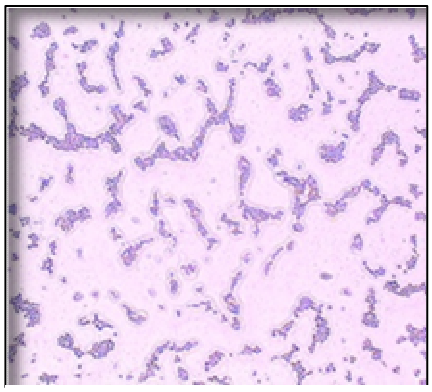
E .coli



Serratia



Pseudomonas



Staphylococcus

- Les bactéries Gram (+): sont colorées par violé.
- Les bactéries Gram (-): sont colorées par rose.

Photo N° 02 : Résultats de l'aspect microscopique des souches bactériennes au G : x1000

Tableau N °07: Etude morphologique des souches bactériennes testées

Nom de la souche	Milieu selectif	Coloration de Gram	Morphologie
E. coli	Hecktoen	-	Coccobacilles
Serratia marcescens	Hecktoen	-	Coccobacilles
P. aeroginosa	Gelosedu cétrimide	-	Bâtonnet droit par ciliature polaire
S. aureus	Chapman	+	Cocci sphérique arrondies, disposées en amas irréguliers qui présent l'aspect caractéristique de grappes de raisin

****Levure**

Photo N°03 :*Candida albicans* au G:X1000

D'après le Test de filamentation ***Candida albicans*** apparaît sous forme des grandes cellules délimitées par une paroi de forme ovale et bourgeonné.

1.1.2- Caractères biochimiques

Galerie API 20 E:** la lecture de galerie API 20 E de ***E. coli* et *Serratia marcescens est présentée dans la **photo N°04** et le **Tableau N°08**

A: E. coli

B: Serratia marcescens

Photo N°04 : Galerie API 20E de ***E. coli* et *Serratia marcescens***

Tableau N° 08 : Lecture de résultats des galeries API20de ***E. coli* et *Serratia marcescens***

Test	ONPG	ADH	LDC	ODC	Cit	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SAR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
E.coli	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Serratia	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-

*** Test de Coagulase par la technique de Latex**

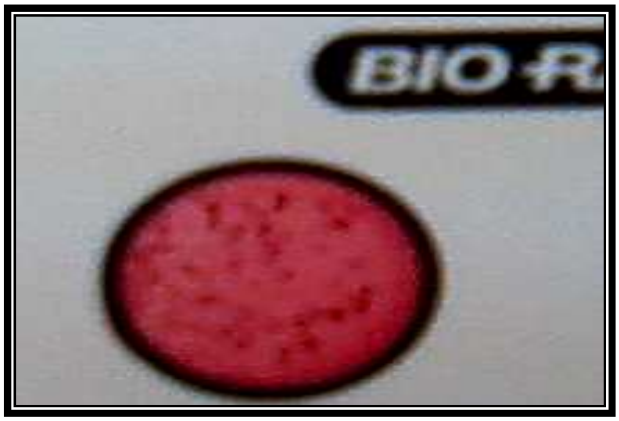


Photo N°05 : Test de coagulase

La présence d' agglutination signifie que ***Staphylococcus aureus*** a un test positif (+) (la présence de enzyme coagulase).

2- Résultat de l'antibiogramme

2.1- Antibiogramme des bactéries Gram négatives

Photo N°06 : Antibiogramme de ***E. coli***

Photo N°07 : Antibiogramme de ***Serratia marcescens***

Photo N°08 : Antibiogramme de ***Pseudomonas aeroginosa***

Tableau N°09: Mesures obtenues par l'antibiogramme des bactéries Gram (-)

Antibiotiques / Germes	Diamètres d'inhibition en mm								
	AMC	AN	CN	CZ	CS	IPM	GM	P	SXT
E. coli	20	22	4	14	20	32	24	0	24
Serratia marcescens	20	24	0	6	0	28	30	0	20
P. aeroginosa	20	20	0	18	15	22	20	0	26

D'après le **Tableau N°09** :

- ***E. coli* :** est presque sensibles à tous les antibiotiques sauf les Céfaloxine (**CN**) et Pénicilline (**P**)

- ***Serratia marcescens* :** a une résistance pour Céfaloxine (**CN**)**,** Colistine (**CS**), Céfalozoline (**CZ**) et Pénicilline (**P**)**,** mais ce germe à une grande sensibilité aux autres antibiotiques.

- ***P.aeroginosa* :** ce microbe présente une résistance moyenne **à** des plupart des antibiotiques utilisés et une résistance totale aux Céfaloxine (**CN**) et Pénicilline (**P**) **,**

2.2- Antibiogramme des bactéries Gram positives

Photo N°09 : Antibiogramme de ***Staphylococcus aureus***

Tableau N°10 : Mesures obtenues par l'antibiogramme des coccis Gram positives

Familles Antibiotique	Bétalactamines					Macrolides			Aminosides	divers		sulfamides
Antibiotique	AMC	CTX	P	Z	AM	SP	E	SM	GM	CM	FA	SXT
Diamètre	7.6	0	0	0	0	0	0	0	10	10.	9.68	24.32

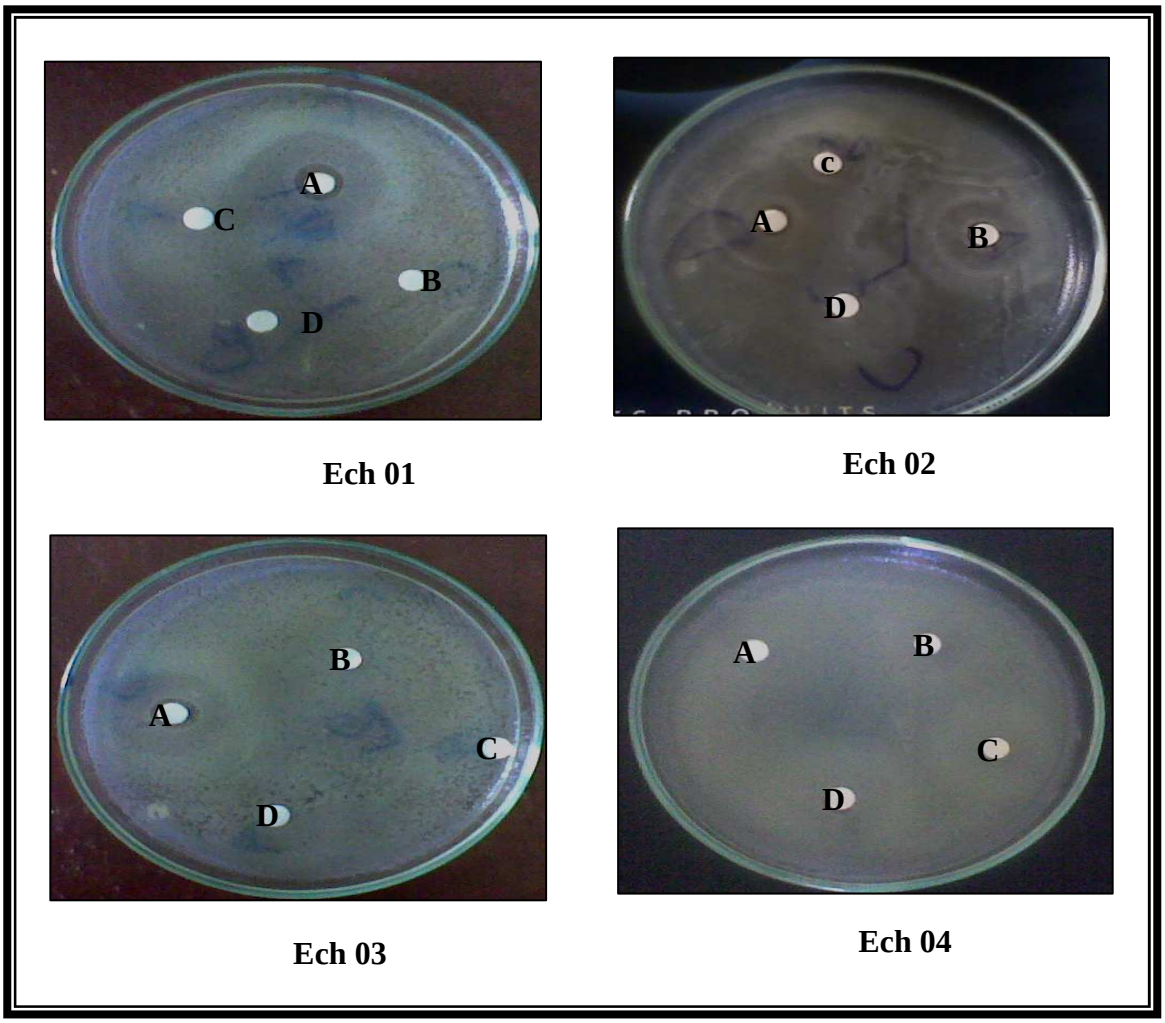
D'après ce tableau, On note que ***Staphylococcus aureus*** a une résistance aux Bétalactamines, et aux macrolides, mais ce germe est moyennement sensible aux aminosides, au Clindamycine (**CM**) et Acide Fusidique (**FA**) par contre il est sensible au Sulfamide (**SXT**).

2.3- Discussion des résultats d'antibiogramme

- ***E. coli*** et ***Serrratia marcescens*** sont relativement sensibles à des antibiotiques actifs sur les Gram négatif. La résistance aux Bétalactamines (pénicilline **P**, Céfaloxine **CN**) est très élevée est due à la production de Bétalactamases.
- ***Pseudomonas aeroginosa*** *a* une particularité concernant sa sensibilité aux antibiotiques qui ont un spectre bactériostatique pour des diamètres considérables à tous les antibiotiques sauf qu'il y a une forte sensibilité au Sulfamide (**SXT**).
- ***Staphylococcus aureus*** est l'une des espèces les plus résistantes. Le sulfamide utilisé est l'antibiotique le plus régulièrement actif sur cette espèce contre les Bétalactamines, macrolides et les aminosides. Cette résistance est naturelle.

3- Évaluation de l'activité antimicrobienne du miel

Cette étude est basée sur la mesure des diamètres des hallos d'inhibition de différentes dilutions de miel. Cette mesure permet de déterminer l'activité antimicrobienne du miel *in vitro.* Les résultats sont présentés sur les photos 10,11,12,13 et 14.



Photos N°10: Effet de miel sur ***E. Coli***

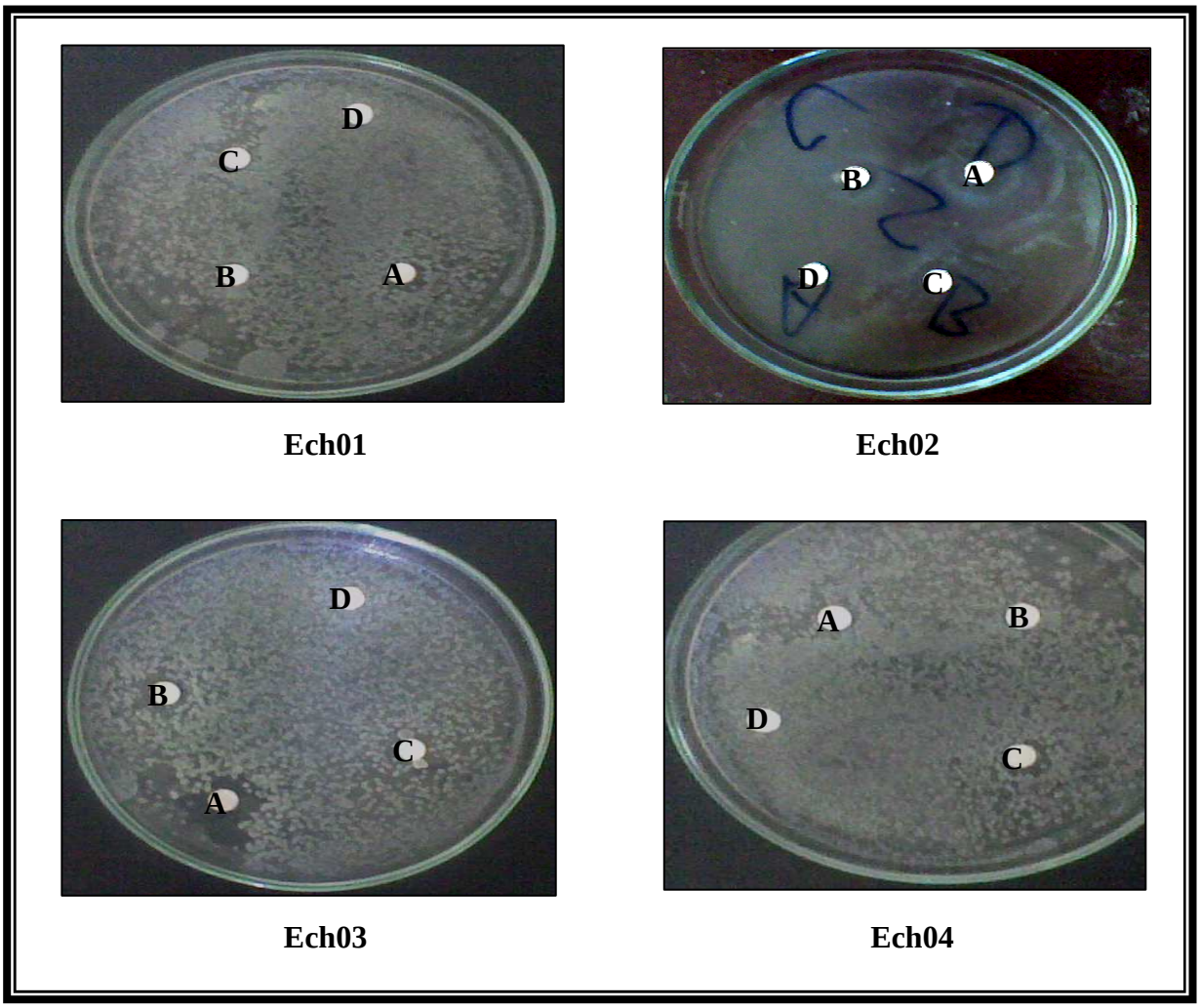


Photo N°11: Effet de miel sur ***Serratia marcescens***

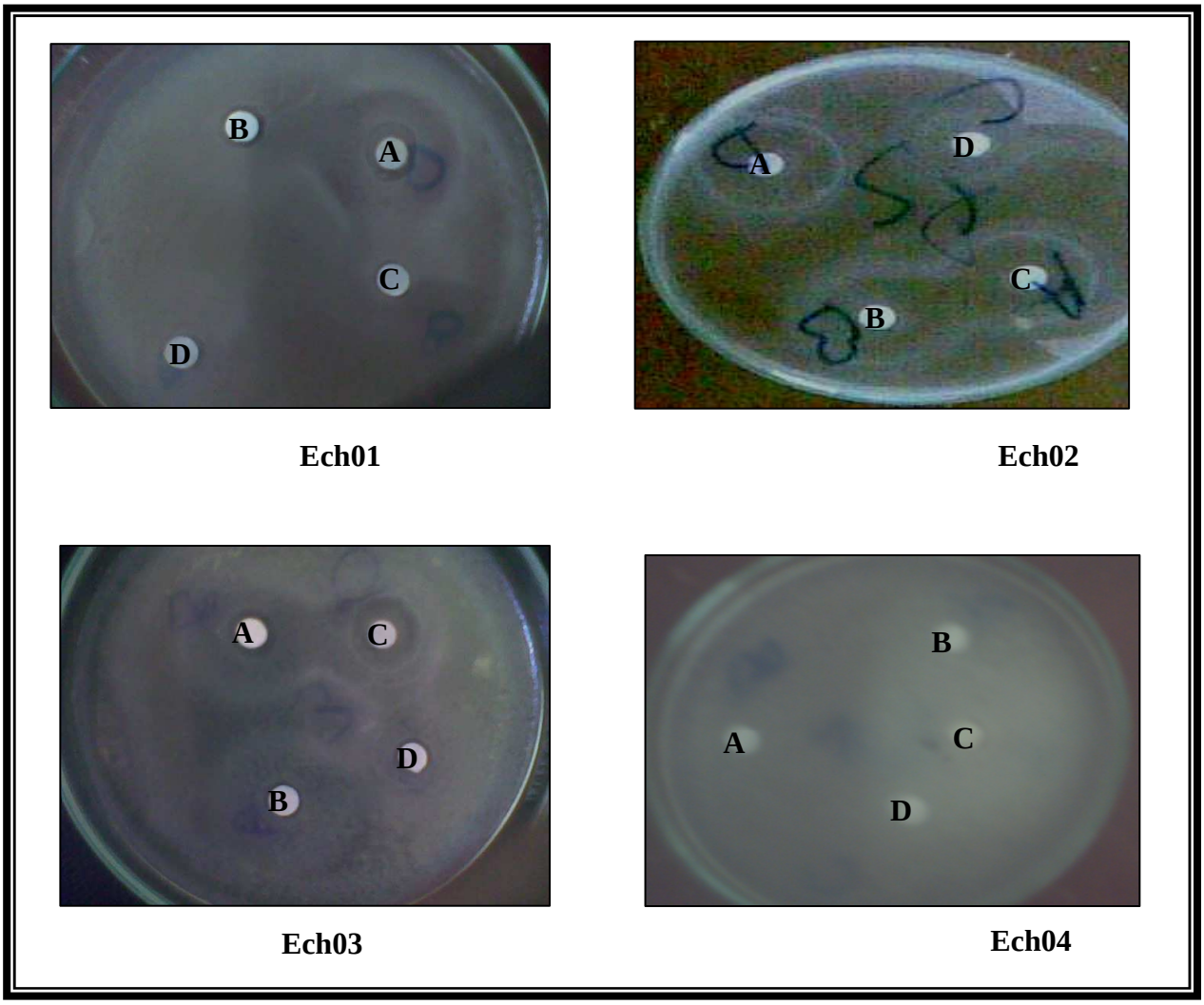


Photo N°12: Effet de miel sur ***Pseudomonas aeroginosa***

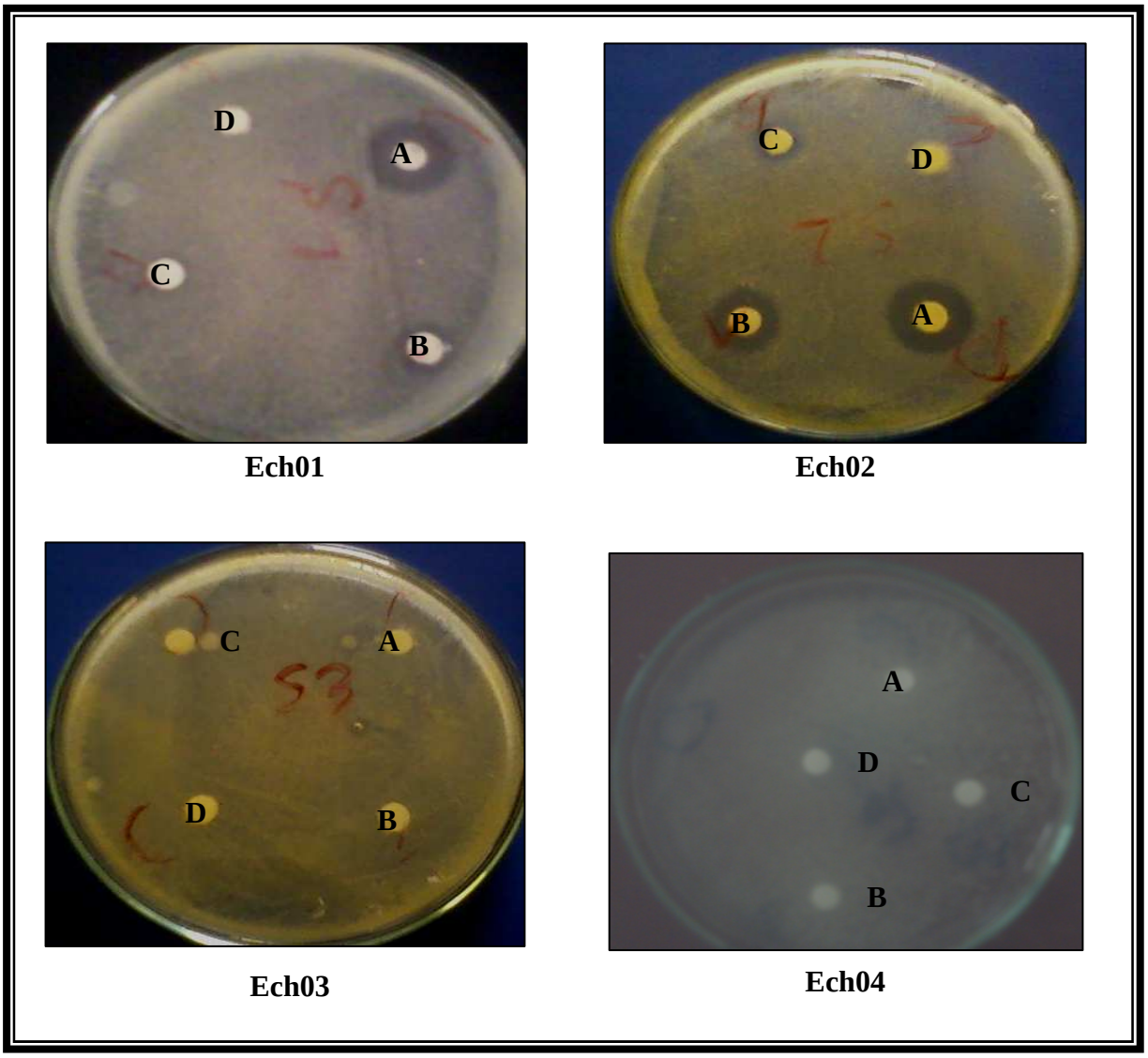


Photo N°13: Effet de miel sur ***Staphylococcus aureus***

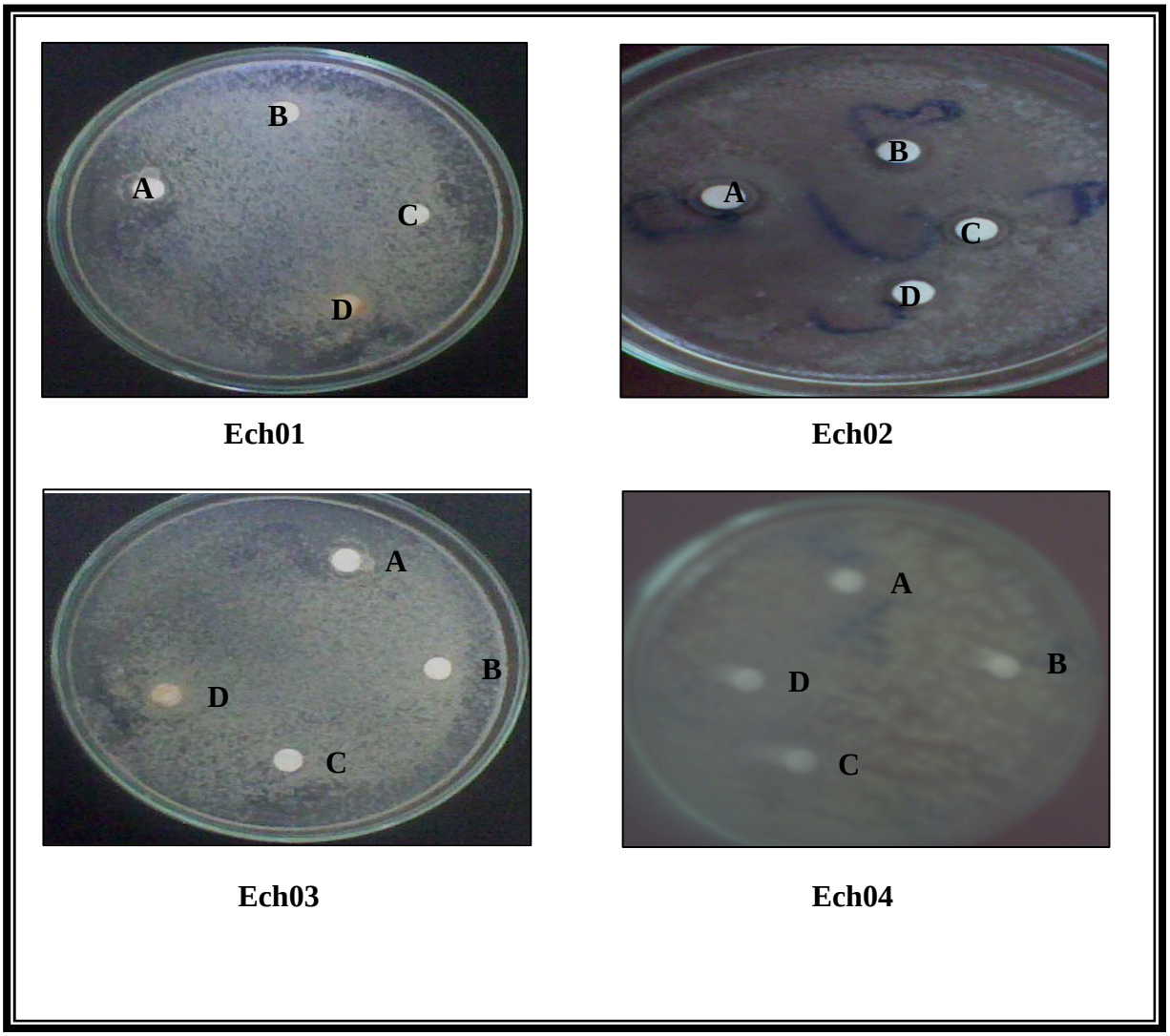


Photo N°14: Effet de miel sur ***Candida albicans***

La lecture des diamètres en mm est mesurée dans le **Tableau N°11**.

Tableau N°11: Résultats des moyennes des diamètres d'inhibition en (mm)

	Echantillon 01				Echantillon 02				Echantillon 03				Echantillon 04			
Dilutions	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
E.coli	24.33	0	0	0	23.33	19	16.33	6.66	23	0	0	0	0	0	0	0
Serratia	9.3	6.33	4	0	15	14.3	10.3	0	12	10	0	0	0	0	0	0
P.aerogisa	27	26	14	11	30	21.33	21	21.33	25.33	23.6	0	0	0	0	0	0
S.aureus	19.33	14.33	10	5	21	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C.albicans	0	0	0	0	12	10	10	09	0	0	0	0	0	0	0	0

.

D'après les résultats illustrés sur les photos **N° 10**, **11**,**12** et **13** on peut constater ce qui suit :

Les quatre souches bactériennes sont sensibles aux trois types de miel local (échantillons **01**,
02 et **03**) avec des différences d'un type à un autre.

L'effet antibactérien du miel est plus important avec les échantillons non dilués, il diminue avec des dilutions successives.

Concernant les souches ***E. coli, Serratia marcescens et Staphylococcus aureus*** :
l'échantillon **02** a l'effet le plus important, alors que l'échantillon **03** a l'effet le plus faible.
Les souches ***Pseudoonas aeroginosa*** est plus sensible à l'effet des trois échantillons.

Le miel local à deux types d'effet sur les bactéries (E***. coli, Serratia marcescens et Pseudoonas aeroginosa***):
-un effet bactériciode sur les zones les plus proches des disques imprégnés de miel (destruction totale des bactéries).

-un effet bactériostatique sur les zones relativement loin des disques (inhibition partielle de la croissance des bactéries)

L'effet de miel ***Staphylococcus aureus*** est uniquement bactériocide.

Les souches ***E. coli*** et ***Serratia marcescens*** et ***Pseudomonas aeroginosa*** sont moyennement sensible à l'effet du miel alors que la souche ***Serratia*** qui peut être considérer relativement résistant selon les échantillons (l'échantillon **01** et **03** sont uniquement bactériocide sur cette souche que l'échantillon **02** a deux effets l'un est bactériocide et l'autre est bactériostatique).

L échantillon **02** est le seul échantillon qui a un effet sur le ***Candida albicans*** tous les échantillons de cet échantillon manifeste un effet fongistatique.

Le miel importé n'a aucun effet sur les (5) souches microbiennes étudiées.

4- Discussion des résultats d'étude qualitative sur l'activité de miel

Les résultats d'étude qualitatives montrent que tous les souches testées sont sensibles à l'action inhibitrice du miel, ce qui indique leur large spectre d'action antibactérienne et antifongique.

Le miel présent donc une forte bioactivité, les enzymes de miel assurent un effet antimicrobien grâce à l'acide gluconique qu'il contient et leur faible pH, de 3.0 environ. Beaucoup des bactéries sont inhibées à ce pH. (CREEMERERS ET AL. 2005). Plus que les flavonoïdes originaires du nectar et du pollen .Ces flavonoïdes ont un fort effet antioxydant et emprisonnent donc les radicaux oxygénés néfastes. (SIESS ET AL., 1996).

La différence de l'activité antimicrobienne selon les échantillons et les germes testés peut être interpréter par :

* l'origines de miel : en effet l'environnement de l'élevage influe sur la nature de miel .

- ✓ l'origines florale : la nature de fleur de nutrition influe également . : la composition de miel leurs particularités dépendent l'alimentation de l'abeille

* Concernant l'abeille:

- ✓ La variété: la nature du miel peut varie selon le type de l'abeille.
- ✓ L'âge: le miel de l'abeille jeune est particulièrement clair et moins concentré par apport du plus âgée.

* Saison de production: selon le saison le miel prend un aspect et une composition particulière.

* Les conditions de conservation: la température et la lumière conditionnent l'activité des enzymes de miel alors leur efficacité.

D'après ces résultats on constate que les échantillons de miels locaux ont une activité variable selon la souche microbienne et le type de miel. Le miel présent:

- Un effet bactéricide sur les Gram **(+)**.
- Un effet bactériostatique et un effet bactériocide sur les bactéries Gram **(-)**.

Donc la composition de paroi des bactéries influe sur leur sensibilité au miel. Pour les levures le type d'inhibition est fongistatique.

Par comparaison entre les meilleurs résultats de l'activité antimicrobienne de miel et les résultats d'antibiogramme de chaque germe, on trouve que:

- Entérobacteries

Le miel a une activité inhibitrice sur ***E. coli*** semblable à celles d'antibiotiques les plus actifs, mais ***Serratia marcescens*** **,** l'effet de miels locaux est faible sur cette souche.

- Pseudomonas aeroginosa

Ce germe a une sensibilité plus fort aux miels locaux par différentes concentrations préparés .Cette sensibilité est plus ou moins par apport les résultats d'antibiogramme.

- Staphylococcus aureus

Malgré que ce germe est polyrésistant à des antibiotiques, les résultats obtenus confirme que l'échantillon (03) n'a pas d'effet sur cette souche, et l'échantillon (01),(02) ont une excellant activité sur ce microbe et même avec concentrations.

- Candida albicans

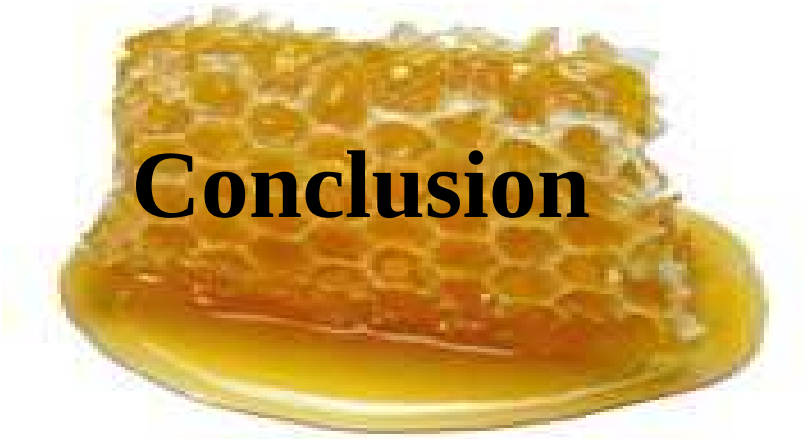
Il y a une sensibilité pour cette levure à l'effet de miel mais elle est non évaluée à cause de manque de disques antifongiques .On constate que leur sensibilité est faible.

Le miel importé a des résultats négatifs pour tous les tests, on peut dire que les produits ajoutés au cour de leur transformation peuvent influer sur leur activité.

On remarque pour chaque teste que l'efficacité de miel sur les germe est proportionnelle avec la dilution c'est pose le question quel est le responsable de cette variation ?

La taux d'eau qui fait partie de miel au cour des dilutions n‘ influe pas sur la variation de l'activité de miel alors la concentration du miel est le responsable, D'après KERKVLIET (1996) : L'effet antimicrobien du miel peut partiellement être expliqué par de leur contenu en enzyme important , la glucose oxydase (**GOX**) , qui active la transformation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène , L'enzyme reste active tous le temps du transformation de nectar en miel . Dans le miel mur, l'enzyme n'est plus active mais reste intacte. Si le miel est dilué avec un peu d'humidité, l'enzyme est réactivée. Cette aidé est présenté par notre prophète qui insiste sur "boire du miel " qu’il s'agit faire la dilution.

Au cours d’observations concernant les dilutions minimales inhibitrices de développement de chaque microbe pour tous les échantillons de miel on ne peut pas déterminer la concentration minimale d'inhibition (**CMI**) qui demande une étude quantitative par d’autres méthodes, mais on peut indiquer leurs limites par les résultats de l'étude qualitatives, en commençant par la dilution la moins active et faire des dilutions jusqu'à la dilution non active. Malheureusement le manque de milieu Muller Hinton dans le laboratoire cesse ce projet.



Conclusion

Aussi bien l'étude *in vitro* que la recherche scientifique ont prouvé particulièrement l'efficacité du miel.

Le miel possède un pouvoir antimicrobien très fort vis-à-vis des souches bactériennes du Gram (+) et Gram (-) ainsi que les souches fongique, ces résultats montre clairement que le miel est doté d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les microorganismes testés.

Les résultats obtenus démontrent clairement l'impact du miel sur la sensibilité microbienne, cet effet inhibiteur à été constaté pour la plupart des échantillons testés avec une certaine variabilité d'un échantillon à autre et d'une souche à une autre.

Nous avons retenu trois catégories de germes selon leur degré de sensibilité à savoir :
*Souches très sensibles***: *Staphyloccocus aureus***.
*Souches moyennement sensible:***Echirichia coli** et ***Peudomonas aeroginosa .***
Souches faiblement sensibles : ***Serratia multicins*** et ***Candida albicans.****

Cette étude a confirmé la propriété antimicrobienne du ces, c'est résultat pourraient trouver une application possible dans le traitement des déférentes maladies causés par les germes pathogènes.

L'évaluation d'activité antimicrobienne du miel conduit à l'évaluation de leur valeur thérapeutique comme antibiotique naturel. La valeur médicinale du miel est de plus en plus démontrée scientifiquement ce qui constitue l'importance de son utilisation en médecine. Ainsi, le secteur de l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

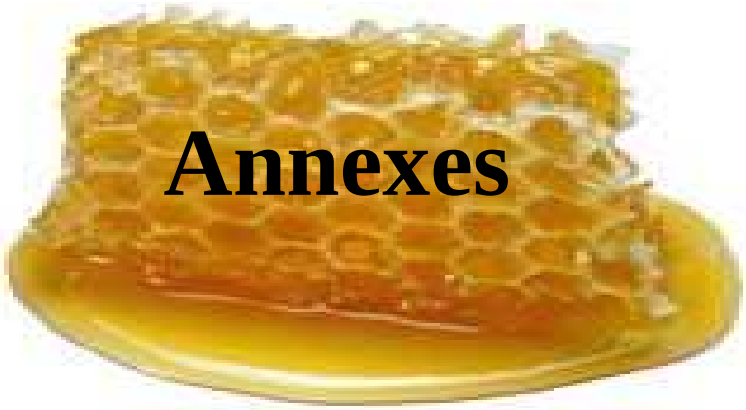
Références bibliographiques

- **Les ouvrages**

- **BIRI M.** l'élevage moderne des abeilles. Manuel pratique. Paris Edition DEVECCHI SA-1986 : p91-321.
- **BIRI M.** Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Paris Edition DEVECCH1-1999 : p 75.
- **BOGDANOV S, BLUMER P.** Propriétés antibiotiques naturelles du miel : centre suisse de recherches apicoles. Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld. CH-3003 Berne -2001 :p1
- **BONIMOND JP.** La fleur et l'abeille. Union Nationale de l'Apiculture Française. Paris-1983 p76-7.
- **BADAWY O, SHASII S. THARWAT E, KAMAL M .** Antibacterial actïvity of bee honey and its thcrapeutic usefulness against Escherichia coli o157:H7 and Salmonella typhimurium infection.Rcv.sci.tech.off.int.epiz; 2004, 23(3),1011-1022 page 1018.
- **BALTRUSAITYTE V, VENSKUTONIS P, CEKSTERYTE V.** Antibacterial Activity of honcy and beebread of différent origin against S.aureus and D.epidermidis.Food teehnology, Lithuania.45(2)201 -208 (2007).
- **BRUDZYNSKI K.** Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys.Canadian Journal of Microbiology, Volume 52. Number 12. 1 Decembcr 2006, pp. 1228-1237(10).
- **CAILLAS A.** Le rucher de rapport, les produits de la ruche. Traité pratique d'apiculture moderne. Edition .syndicat national d'apiculture.Paris-1974 : p 497.
- **CREEMERS T, BOSMA WJ, BOON ME**. Enzymrijke honing: een natuurlijke remedie voor vaginale dysbalans. Jaarverslag van het Leids Cytologisch en Pathologisch laboratorium, 2005.
- **CHAUVIN R.** L'abeille et la fleur in traite de biologie de l'abeille (T3).Edition Masson et Cie,Pans-1968 : p95,286-7,293-4-9,304-6-7.
- **CLEMENT H.** Crée son ruche.Paris.2eme édition Restiea fLER-2003 : p91.
- **CODEX ALIMKNATRIUS**. Commission du Codex Alimentarius.Edition FAO.O.M.S.
- **CODEX STAN.** Norme Codex pour le miel-1981 : p 1-6.

- **DESCOTTCS B.** Le miel comme agent cicatrisant. Thèse de doctorat en médecine, université Toulouse III-Paul SABAT1ER, Limoges-2004 : p 24-6-7-8-9, 32-3, 42-8 ,52.
- **DONADIEU Y ET MARCHISET** C. La cire. Paris.Edition MALOINE, S.A-1984 :p28.
- DONADIEU Y. Les thérapeutiques naturelles, la gelée royale .Paris. 5eme édition 1981 : p75
- **DONADIEU Y.** Les thérapeutiques naturelles, produits de la ruche, miel-2006 :p 6.
- **DONADIEU Y**. Le miel, thérapeutique naturelle. Paris. 2ème édition MALOINE-1978 : p17 -8 ,20-5.
- **GOUT J.** Le monde du miel et des abeilles. Paris .Edition Delachaux et Nïestlé.S.A.Lanssanne (Suitgerrland)-1989 A; p58.
- **HUCHET E, COUSTEL J, GUINOT L**. Les constituants chimiques du miel : méthodes d'analyses chimiques ; département science de l'aliment-1996 : p5.
- **JOLY R.** L'abeille et les produits de la ruches .Edition .RULLIER ZIRECCIO-1984 : p33.
- **KHENFER A, FETTAL M**. Le miel ; Institue technique des élevages-2001 :p!9.
- **KERKVLIET JD.** Screening method for thedetermination of peroxide accumulation in honey and relation with HMF content. J. Apicult Res 1996; 35: 110-117
- **LAFFONTG** .Les bienfaits du miel. Edition Michel Laffont-2000 : p 212.
- **LAMBALLAIS C.** Les aliments. Paris Edition.MALOINE-1989 : pI36.
- **LIBIS E.** L'apiculture pour tous. Paris. Edition Flammarion.-1971 : pl20-l-7,130-3,141.
- **LOUVEAUX J**. Les abeilles et leur élevage .2cme Edition OPIDA-1985 :p237
- **MARCHENAY P.** L'homme et l'abeille. Paris. Edition Territoires, Berger, Levrault.-1984 :p209
- **SIESS MH, LE BON AM, CANIVENC-LAVIER MC, AMIOT MJ, SABATIER S, AUBERT SY**, **SUSCHETET M**. Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo[a]pyrene-DNA Binding in Rats. J. Agric. Food Chem. 1996; 44 (8): 2297 - 2301
- **PHILIPPE M**. Le guide de l'apiculture. Edition .EDISUD-1993 : p 206.
- **PROST P.** Apiculture. Paris .Edition J-B.Baillière-1979 : P140-1,270-2-3,303-15.

- **PROST P.** Connaître l'abeille, conduire le rucher. Paris Edition J.P.Baillière -1987 : pl46, 310-1-4-5-6-, 356.
- **VANNIER P**: Au pays du miel. Edition Flammarion-1998 : p 119.
- **VERDAN J.** Projet de charte qualité miel du parc naturel régional de verdan-2002 : p4.
- **VIERLING E.** Aliments et boissons, filières et produits. 2eme édition -2004
- White J.R, Donner L. Honey composition and properties. Beekeeping in the United States.Agricultures handbook number-1980: p335.
- **Les sites et pages Web:**
- **WEBMASTER. 1 :** http://www.servicevie.com/01alimentation/alimentvedette/AVfHTML/HTML 800a/809h.htmi Page consultée le 23/09/2008.
- **WEBMASTER.2 :**
- http://www.iacques-paltz.org/ALBUM PHOTOS-13-54-1 .html Page consultée le 19 /10/ 2008.
- **WEBMASTER.3 :** http://www.01 santé.com/xoops/modules/icontent/index.php?page::::::532 Page consultée le 21/09/2008.
- **WEBMASTER.4 :** http://www.Ql santé. comyxoops/modules/icontent/index.php?page:::r:862 Page consulté le 22/09/2008.
- **WEBMASTER.5:** http://www.lapi.fr/miellerie/venin/venin.html Page consultée le 25/09/2008.



Annexes

-Matériels utilisés

- **Appareillage**

❖ Agitateur magnétique
❖ Appareil photo numérique
❖ Autoclave
❖ Bain marie
❖ Balance électrique
❖ Etuve
❖ Four pasteur
❖ Microscope optique
❖ Plaque chauffante
❖ Réfrigérateur

- **Verreries**

❖ Becher
❖ Boite de Pétrie
❖ Entonnoirs
❖ Erlen-Meyer
❖ Fiole
❖ Flacons
❖ Lame et lamelles ;
❖ Pipettes graduées (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml)
❖ Pipettes pasteur ;
❖ Tubes à essais munis de bouchant en métal
❖ Verre de montre

- **Autres matériels**

❖ Anses de platine
❖ Bac de coloration
❖ Boite de Petrie
❖ Disques de papier filtre
❖ Papier absorbant
❖ Papier aluminium
❖ Papier filtre;
❖ Pince en bois
❖ Pissettes
❖ Portoirs
❖ Spatules

❖ Bouillon nutritif
❖ Chapman
❖ Desoxycholat de Ne(DCLS)
❖ Drigalski;
❖ Galerie API
❖ Gélose nutritive
❖ Mueller Hinton
❖ Sabouraud+chloramphénicol
❖ Hektoen

- **Produit utilisé**

❖ Agar
❖ Alcool
❖ Amidon
❖ Disques d'antibiotiques
❖ Eau de javel
❖ Eau distillée stérile et non stérile
❖ Eau oxygénée
❖ Eau physiologique stérile
❖ Extrait de levure
❖ Glucose
❖ Huile d'immersion
❖ Indole
❖ Lugol
❖ Manitol
❖ Na Cl (Chlorure de sodium)
❖ Nitrate
❖ Oxytetracycline
❖ Peptone
❖ Saccharose
❖ TDA
❖ VP (Voges Proskauer)

- **Colorant**

❖ Bleu de méthylène
❖ Fuschine basique
❖ Violet de gentiane

Milieux de culture

Chapman

Peptone ……. 10g
Extrait de viande …….. 10g
Chlorure de sodium (NaCl) …….. 75.0g
Mannitol…… 10.0g
Agar……... 15g
Rouge de phénol ……... 0.025g
Eau distillée……... 1L
pH=7.4

Gélose au cétrimide

Peptone …… 20g
K2so4 …… 10g
Mgcl2……. 3g
K2hpo4…… . 0.3 g
Cétrimide……... 0.2g
Acide nalidixique …….. 0.015g
Agar …….. 13g
pH=7.1

Gélose Sabouraud plus chloramphénicol

Peptone pepsique de viande …… 10g.
glucose……..... 20g.
chloramphénicol……... 0,5g.
agar…….. 15g.
PH= 7,0

HekToen

Peptone de viande ou de gélatine …… 10g.
Extrait de levure ……03g.
Chlorure de sodium …… 05g.
Thiosulfate de sodium……05g.
Sels biliaires …… 09g.
Citrate de fer ammoniacal …… 01,5g.
Salicine …… 02g.
Lactose …… 12g.
Saccharose…… 12g.
Fushine acide …… 0,1g.
Bleu de bromothymol…… 0,065g.
Agar (gélose)…… 14g.
Eau distillé …… qsp1L
pH 7,5

Mueller Hinton (MH)

Infusion de viande de bœuf ……	3,00g.
Hydrolysat de caséine ……	17,5g.
Amidon ……	01,5g.
Agar ……	17,0g.
Eau distillé……	qsp1L.

pH=7,4

Tableau N°12: Mesures des diamètres en (mm) des zones d'inhibition pour les trois répétions de l'expérience

	Echantillon 01				Echantillon 02				Echantillon 03				Echantillon 04			
Dilutions	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
E coli	25	0	0	0	23	20	17	8	23	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	22	19	17	6	23	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	23	18	16	6	23	0	0	0	0	0	0	0
Moyenne	**24.33**	**0**	**0**	**0**	**23.33**	**19**	**16.33**	**6.66**	**23**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Serratia	6	7	7	0	13	11	10	0	13	10	0		0	0	0	0
	9	5	0	0	15	16	10	0	10	11	0	0	0	0	0	0
	8	7	5	0	12	16	11	0	11	09	0	0	0	0	0	0
Moyenne	**7.33**	**6.33**	**4**	**0**	**15**	**14.3**	**10.3**	**0**	**12**	**10**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
P.aeroginosa	27	26	15	12	30	22	23	22	26	23	14	0	0	0	0	0
	26	26	14	10	31	23	21	22	25	19	0	0	0	00	0	0
	28	26	14	12	29	19	19	20	25	20	0	0	0	0	0	0
Moyenne	**27**	**26**	**14**	**11**	**30**	**21.33**	**21**	**21.33**	**25.33**	**23.6**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
S.aureus	19	15	9	5	21	17	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	14	11	5	19	16	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	14	10	5	22	18	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moyenne	**19.33**	**14.33**	**10**	**5**	**21**	**17**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
C. albicans	0	0	0	0	12	10	11	9	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	11	10	11	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	13	10	8	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Moyenne	**0**	**0**	**0**	**0**	**12**	**10**	**10**	**09**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**