

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BETTAHAR KAOUTER

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et Transformation Laitières

THÈME

**Isolement des lactobacilles à partir de
miels**

Soutenu publiquement le 04/10/2021

Devant les membres du jury

Président	M Zabouri. Y	M.C.B	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme Tahalaiti. H	M.C.B	U. Mostaganem
Promotrice	Melle Homrani. M	M.A.B	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales
Année universitaire 2020-2021

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de mémoire, Madame Homrani Mounia. Je la remercie de m'avoir encadrée, orientée, aidée et conseillée.

Je remercie ma mère et mes sœurs Yasmina et Ihssen, qui ont toujours été là pour moi, pour leurs encouragements et soutiens durant les longues années d'études.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma chère maman, pour tous ses sacrifices, son amour, son soutien et ses prières tout au long de mes études,

Mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

Mes neveux Ouwais et Ayham,

Mon beau-frère Mouatez pour son soutien,

A mon ami Karim paix à son âme, tu as toujours offert le soutien et le réconfort, j'exprime envers toi une profonde admiration.

Résumé

Ces dernières années, l'isolement des différentes espèces de lactobacilles à partir de diverses sources naturelles, notamment dans le miel suscite un intérêt croissant. Ces microorganismes sont très recherchés dans le domaine de la biotechnologie en raison de leurs propriétés probiotiques et de leurs caractéristiques technologiques.

Cette étude rapporte l'isolement de lactobacilles à partir de quatre (n=04) miels crus collectés dans différentes régions d'Algérie et l'évaluation de leurs activités antibactériennes contre les bactéries Gram-négatives. L'isolement des lactobacilles a été réalisé en utilisant différents milieux. Les isolats ont d'abord été identifiés par test de catalase, coloration de Gram et morphologie cellulaire, et confirmés par MALDI-TOF/MS. Les activités antibactériennes des cultures bactériennes de lactobacilles sélectionnés et de leurs surnageants ont été testées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Un total de dix-huit (n=18) bactéries isolées ont été présumé faisant partie du genre *Lactobacillus spp* sur la base de leur forme bacillaire, l'absence d'une activité catalasique, et un type Gram positif, L'identification par MALDI-TOF/MS a confirmé leur appartenance au genre *Lactobacillus*, mais n'a pas été concluante concernant l'espèce avec une incertitude entre *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus paraplantarum*. Les isolats présentaient une activité antimicrobienne avec des diamètres de zone d'inhibition allant de $11 \pm 1,41$ mm à $17,5 \pm 0,71$ mm. 6 sur 11 surnageants de lactobacilles ont démontré une activité inhibitrice contre toutes les bactéries cibles. Ainsi, l'étude a révèlè l'existence de lactobacilles dans les miels bruts algériens. Ces lactobacilles possèdent des propriétés antibactériennes contre les bactéries Gram-négatives, souvent responsables d'infections humaines, et peuvent être un substitut favorable aux antibiotiques.

Mots-clés : miel, *Lactobacillus*, effet antibactérien, récolte, technique d'identification, MALDI-TOF

الملخص

في السنوات الأخيرة، كان هناك اهتمام متزايد بعزل أنواع مختلفة من العصيات اللبنية من مصادر طبيعية مختلفة، وخاصة في العسل. هذه الكائنات الحية الدقيقة مطلوبة بشدة في مجال التكنولوجيا الحيوية بسبب خصائصها الحيوية وخصائصها التكنولوجية.

تشير هذه الدراسة إلى عزل العصيات اللبنية من أربعة أنواع من العسل الخام تم جمعها في مناطق مختلفة من الجزائر وتقييم أنشطتها المضادة للبكتيريا ضد البكتيريا سالبة الجرام. تم عزل العصيات اللبنية باستخدام وسائط مختلف. تم التعرف على العزلات لأول مرة عن طريق اختبار الكاتلاز ، وصبغة غرام وتشكل الخلية ، وتم تأكيدها MALDI-TOF /MS. تم اختبار الأنشطة بواسطة المضادة للبكتيريا للمزارع البكتيرية للعصيات اللبنية المختارة والمواد الطاقية الخاصة بها بواسطة طريقة الأجار المتوسطة تم افتراض ما مجموعه ثمانية عشر بكتيريا *Lactobacillus* لانتشار على أساس شكلها العصوي إيجابي الجرام وغياب نشاط الكاتلاز وأكد MALDI-TOF انتمائهم إلى جنس *Lactobacillus* لكنها لم معزولة لتكون تكن قاطعة فيما يتعلق بالأنواع، مع عدم وجود يقين بين *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus paraplantarum* *Lactobacillus pentosus*. أظهرت 6 من أصل 11 من طاف العصيات اللبنية نشاطاً مثبطاً ضد جميع البكتيريا المستهدفة. وهكذا كشفت الدراسة عن وجود العصيات اللبنية في العسل الجزائري الخام. هذه العصيات اللبنية لها خصائص مضادة للجراثيم ضد البكتيريا سالبة الجرام، وغالبًا ما تكون مسؤولة عن العدوى البشرية، ويمكن أن تكون بديلاً مناسباً للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية : التأثيرات التكنولوجية ، عسل النحل ، تأثيرات الكائنات الحية المجهرية، *Lactobacillus plantarum*

Abstract

In recent years there has been a growing interest in the isolation of *Lactobacillus* species from various natural sources, especially from honey. These microorganisms are highly sought after in the field of biotechnology due to their probiotic properties and technological characteristics.

This study reports the isolation of lactobacilli from four (n=04) typical raw honeys of *Apis Mellifeca* collected from different regions of Algeria and the evaluation of their antibacterial activities against Gram-negative bacteria. Isolation of lactobacilli was performed using different media. The isolates were first identified by catalase test, Gram staining and cell morphology, and confirmed by MALDI-TOF MS. The antibacterial activities of the selected *Lactobacillus* bacterial cultures and their supernatants were tested by the agar diffusion method. A total of eighteen (n=18) isolated bacteria were presumptively identified as *Lactobacillus* spp. on the basis of their bacillary form, absence of catalase activity, and Gram-positive type. Identification by MALDI-TOF MS confirmed their membership in the genus *Lactobacillus*, but was inconclusive regarding species with uncertainty between *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus paraplantarum*. The isolates exhibited antimicrobial activity with inhibition zone diameters ranging from 11 ± 1.41 mm to 17.5 ± 0.71 mm. 6 out of 11 lactobacilli supernatants showed inhibitory activity against all target bacteria. Thus, the study revealed the existence of lactobacilli in Algerian raw honeys. These lactobacilli possess antibacterial properties against Gram-negative bacteria, often responsible for human infections, and can be a favourable substitute for antibiotics.

Keywords: honey, *Lactobacillus*, antibacterial effect, harvest, identification technique, MALDI-TOF

Liste des abréviations

A.O.C : Appellation d'origine contrôlée

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

API : Appareil et procédés d'identification

ARN : Acide ribonucléique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FDP : Fructose 1-6 diphosphate aldolase

HMF: Hydroxy méthyls furfural

MRS: Man, Rogosa, Sharpe

PCR : Polymerasechainreaction

PH : potentiel d'hydrogène

RDP : Remote desktop protocol

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition moyenne du miel	3
Tableau 2 : Les différences entre miel de nectar et miel de miellat (teneurs moyennes)	7
Tableau 3 : Recommandations et exigences internationales des critères de qualité du miel (Codex Alimentarius, 2001 ; UE, 2002)	12
Tableau 4: Miels monofloraux, stimulant la croissance et activité des micro-organismes probiotiques	13
Tableau 5 : Micro-organismes répertoriés dans le miel (Olaitan <i>et al.</i> , 2007 ; Sib, 2007)	15
Tableau 6 : Critères différentiels des trois groupes de lactobacilles. FDP : Fructose 1-6 diphosphate.	23
Tableau 7 : Région, Localité, saison de récolte, et la localisation géographique des miels Algériens.	30
Tableau 8 : Isolement de lactobacilles à partir de miels algériens à l'aide de différents milieux	34
Tableau 9 : Identification MALDI-TOF des isolats	35
Tableau 10 : Activité antibactérienne des cultures bactériennes de lactobacilles isolés de miels algériens contre les bactéries Gram-négatives en termes de ZDI en utilisant la méthode des taches d'agar.	36
Tableau 11 : Activité antibactérienne des surnageants d'isolats de <i>Lactobacillus</i> contre les bactéries Gram-négatives, en termes de ZDI en utilisant la méthode de diffusion en puits d'agar.	36

Liste des figures

Figure 1 : Abeilles mellifères (Photo de Ken Walker publiée sur http://www.padil.gov.au).....	2
Figure 2 : Structure d'une fleur.....	5
Figure 3 : Abeille entrain de butiner du nectar	5
Figure 4 : Un psylle secrétant du miellat	5
Figure 5 : Abeille entrain de récolter du miellat	5
Figure 6 : les étapes de fabrication du miel par les abeilles.....	9
Figure 7 : élaboration du miel par l'apiculteur.....	10
Figure 8 : Analyse pollinique des miels par la méthode classique de louveaux <i>et al.</i> , 1978.....	11
Figure 9: sources primaires de microorganismes dans le miel (Silva et al., 2017).....	14
Figure 10 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr16S (Stiles et Holzapfel,1997).....	19
Figure 11 : principales utilisations des bactéries lactiques	20
Figure 12 : Principe de la désorption-ionisation laser assistée par matrice. (Martin, 2020).....	26
Figure 13 : MALDI-TOF Microflex LT/SH Smart (Bruker).....	26
Figure 14 : Carte montrant les zones et les régions de collecte d'échantillons de miel	30
Figure 15 : Isolement de <i>Lactobacillus</i> à partir de miels algériens à l'aide de différents milieux.....	34

Table des matières

Remerciements.....	
Dédicaces	
Résumé.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures	
Introduction.....	1
<i>Partie I : Synthèse bibliographique</i>	
I- Généralités sur le miel	2
I-1- Définition	2
I-2- Composition du miel	2
I-3- Origine des miels.....	4
I-3-1- Le nectar.....	4
I-3-2- Le miellat	5
I-4 Les types des miels	6
I-4-1 Classification des miels selon l'origine florale ou botanique.....	6
I-4-2 Classification des miels selon l'origine géographique	7
I-4-3 Classification des miels selon de la méthode d'extraction du rayon.....	8
I-4-4 Classification selon les modes de présentation.....	8
I-5- Elaboration du miel	8
I-5-1- Travail de l'abeille	8
I-5-2 Travail de l'apiculteur	9
I-6 Critères de qualité du miel.....	11
I-7 Effet prébiotique du miel.....	13
II- caractéristiques microbiologiques des miels.....	14
II-1 Origine des microorganismes présents dans le miel	14
II-2 Flore microbienne du miel	15
II-2-1 Microorganismes pathogènes du miel.....	15
II-2-2 Micro-organismes bénéfiques du miel	16
II-2-2-1 Gluconobacter oxydans.....	16
II-2-2-2 <i>Bacillus spp</i>	17
II-2-2-3 Les bactéries lactiques	17
II-2-2-3-1 description des bactéries lactique.....	17

II-2-2-3-2 Taxonomie des bactéries lactiques	18
II-2-2-3-3 Interet des bactéries lactiques	19
II-2-2-3-4 Bactéries lactiques et miel.....	20
III- Identification de lactobacilles isolés à partir de miels.....	21
III-1 Généralités sur les lactobacilles	22
III-2 Isolement de lactobacilles à partir de miel.....	23
III-3 Techniques d'identification des lactobacilles	24
III-3-1-1 Méthode conventionnel d'identification (caractérisation phénotypiques)	24
III-3-1-2 Méthode moléculaire d'identification (protéomiques et génotypiques).....	24
III-1-2-1 Méthodes d'identification protéomiques	25
III-1-2-2 Méthodes d'identification génotypique.....	27

Partie II : Etude expérimentale

Introduction.....	29
Matériel et méthodes.....	30
I- Échantillonnage.....	30
I- Isolement des lactobacilles à partir de miels.....	30
II- Pré-identification (screening).....	31
II-1 Analyse macroscopique	31
II-2 Test de catalase	31
II-3 Coloration de Gram	31
II-4 Purification et conservation des isolats	32
III- Identification par spectrométrie de Masse de type « MALDI-TOF/MS ».....	32
IV- Evaluation de l'activité antibactérienne des lactobacilles isolés à partir de miel	32
1- Souches bactériennes.....	32
2- Activité antibactérienne des cellules bactériennes de lactobacilles sélectionnés.....	32
3- Activité antibactérienne du surnageant des lactobacilles sélectionnés	33
Résultats et discussion	33
I- Résultats	33
1- Isolement des lactobacilles du miel.....	33
2- MALDI-TOF/MS identification des isolats	34
3- Evaluation de l'activité antibactérienne des lactobacilles isolés à partir de miels.....	35
II- Discussion.....	37
Conclusion	39
Références bibliographiques.....	41

Introduction

Introduction

Le miel est une substance naturelle sucrée, produite par les abeilles « *Apis mellifica* » à partir de nectar et/ou de miellat (Doukani *et al.*, 2014). C'est également une des denrées alimentaire les plus appréciées par l'homme en raison de ses propriétés énergétiques, nutritionnelles et thérapeutiques (Anand *et al.*, 2018).

Le traitement des infections microbiennes avec du miel remonte à l'Antiquité (Mandal et Mandal, 2011). Cependant, contrairement à l'idée générale répandue sur ce produit, il n'est pas stérile. Le microbiote associé aux miels comprend autant d'espèces pathogènes que bénéfiques, notamment les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* (Homrani, 2019). Ces derniers sont des bactéries à Gram positif, asporulées, anaérobies mais aéro-tolérants, catalase négative, de forme bacillaire ou cocobacillaire (Stiles et Holzapfe, 1997). Cette flore lactique du miel est endémique du tube digestif des abeilles domestiques (Olofsson *et al.*, 2014). D'après certains auteurs, certaines caractéristiques du miel tel que la saveur, l'arôme et la texture sont en partie dues aux métabolites produits par les bactéries lactiques présentes dans le jabot de l'abeille (Olofsson et Vasquez 2008).

Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont très recherchées notamment en industrie agroalimentaire où elles permettent de développer certaines caractéristiques organoleptiques, et d'augmenter la durée de conservation, mais également en industrie pharmaceutique où elles sont utilisées comme « probiotique » en raison des effets bénéfiques sur la santé de l'homme qu'elles apportent (Abee, 1995).

Les différentes espèces de lactobacille ne peuvent pas se multiplier dans le miel, en raison des différentes propriétés physicochimique de celui-ci (pH bas, forte concentration en sucre, faible activité de l'eau) et perdent leur viabilité avec le temps (Mounia *et al.*, 2018). Cependant, il est possible que certaines bactéries résistent aux conditions de croissance difficiles intrinsèques au miel et survivent (Aween *et al.*, 2012). Par ailleurs, lors de la fabrication du miel, le microbiote lactique associé au tractus intestinal de l'abeille mellifère, fermente le nectar et produit un spectre de métabolites spécifiques à la souche, participant ainsi au processus de conversion du nectar en miel (Olofsson *et al.*, 2014). Ces substances produites par les bactéries lactiques sont présentes dans le miel frais et stockées dans le miel mûr.

Dans cette optique, La présente étude a pour objectif d'isoler des bactéries du genre *Lactobacillus* et d'évaluer leur pouvoir antibactérien vis-à-vis de souches pathogènes.

Partie I : Synthèse
bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur le miel

I- Généralités sur le miel

I-1- Définition

Selon le Codex alimentarius. (2001) « Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles mellifiques de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des fleurs ou de certaines sécrétions provenant de plantes qu'elles butinent, transforment, combinent avec des matières propres, emmagasinent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. Elle peut être fluide, épaisse ou cristallisée ».

Le miel est un produit 100% naturel c'est-à-dire que l'homme n'intervient absolument pas dans sa fabrication. Le travail de l'apiculteur consiste uniquement à fournir aux abeilles des conditions favorables, puis à récolter le miel, à s'assurer qu'il soit de bonne qualité et qu'il se conserve correctement (Lequet, 2010).

Le terme « miel » ne peut être utilisé pour les produits obtenus en nourrissant les abeilles durant la miellée avec du sucre industriel ou autres substances. De plus, les miels produits par des espèces proches de l'abeille domestique telles qu'*Apis cerana*, *Apis dorsata* ou bien l'abeille *mélipone* (**Fig. 01**) seront obligatoirement identifiés autrement, leur composition étant très différente (Marchenay, 1988).

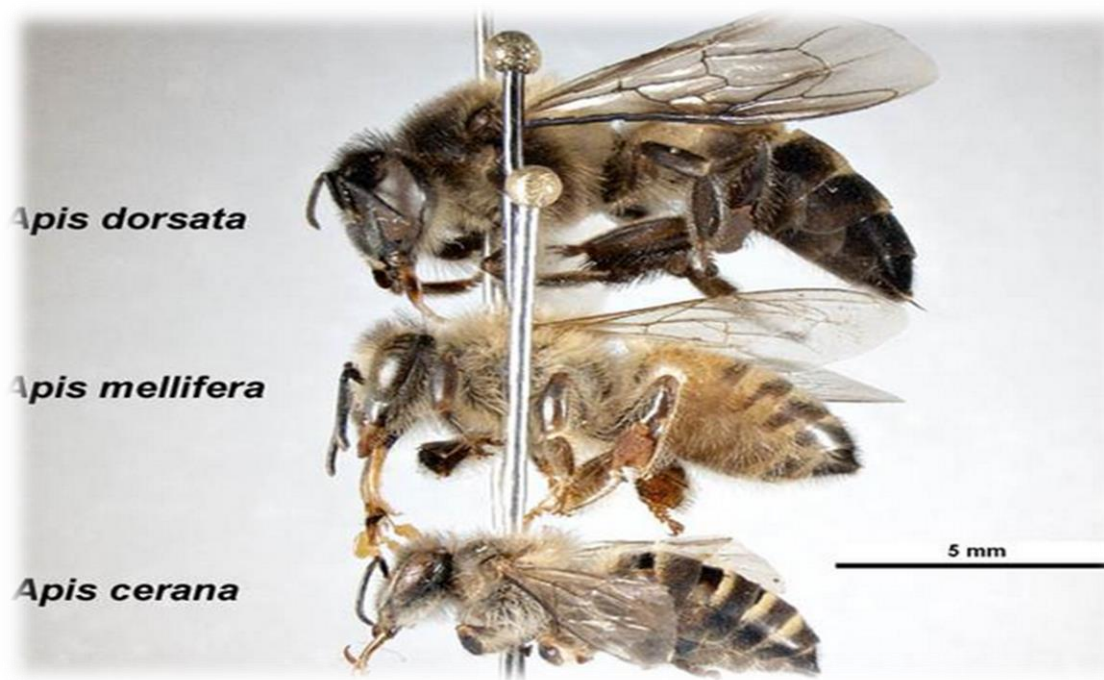


Figure 1 : Abeilles mellifères (Photo de Ken Walker publiée sur <http://www.padil.gov.au>)

I-2- Composition du miel

Le miel est un produit très complexe. En effet, des facteurs très variables interviennent dans la composition chimique finale du miel tels que : la nature de la flore visitée et celle du sol sur lequel pousse ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles, l'état

Chapitre I : Généralités sur le miel

physiologique intervient sur la composition du miel (Guerriat, 2000 ; Makhloufi, 2010). Plus de 200 substances ont été identifiées dans le miel (Raessi *et al.*, 2013) dont les principaux composants sont illustrés dans le tableau 01.

Tableau 1 : composition moyenne du miel

Constitution	Teneur et commentaire	Références
Eau	L'eau présente en quantité non négligeable puisque sa teneur moyenne est de 17,2%. Cette teneur peut être variée.	Huchet <i>et al.</i> , (1996)
Glucides	Représente de 95 à plus de 99% de la matière sèche du miel qui sont: le glucose : 31%, lévulose : 38%, maltose : 7,5%, saccharose : 1,5% et une dizaine d'autres sucres.	Louveaux, (1968) Post et Cont, (2005)
Acides organiques	Les analyses effectuées sur le miel ont montré que l'acide formique existe à l'état de traces dans le miel et que l'acide principal est l'acide gluconique qui	Louveaux, (1968)
Protides	Sont présente en faible quantité (0,26%). La teneur en azote est négligeable (de l'ordre de 0,041%).	Huchet <i>et al.</i> , (1996)
Matière minérale	Représente de 0,1 à 0,2% tant que les miels de miellat situent entre 0,5 à 1%. Groupe des éléments majeurs : N, P, Na, K, Ca, Mg et Si. Groupe des éléments mineurs : Fe, Al, Zn, Cu, Pb, Co, Ni et Cd.	Gonnet, (1982)
Enzymes	Les α -amylases et les β -amylases, diastases ou enzymes de la digestion de l'amidon.	Philippe, (1999)
Lipides	Le miel est pauvre en lipides : ceux qu'on y trouve sont préalablement des microparticules de cire qui échappent à la filtration.	Huchet <i>et al.</i> , (1996)
Vitamines	Le miel en est très pauvre, il s'agit principalement des vitamines B (BR1,R BR2R, BR3R, BR4R, BR5R, BR6R, BR7R, BR8, RBR9R) qui seraient apportées par le pollen ; de la vitamine C et quelquefois les vitamines A, D et K. Ainsi, le contenu moyen d'un miel en vitamine C (vitamine la plus constante et la plus abondante dans le miel) est de l'ordre de 2 mg dans 1Kg de produit frais.	Gonnet, (1982)
Substances aromatiques	Sont toujours à l'état de traces. Les constituants principaux découverts sont des alcools aliphatiques, des aldéhydes et des cétones. Ils interviennent en proportion variables dans les miels de différentes origines.	Louveaux, (1968)
Pigments	Les pigment caroténoïdes (rouges) et flavonoïdes (jaunes).	Post et Cont, (2005)

Les composants majeurs du miel sont les sucres (Les Hydrates de carbones) et l'eau. D'après Louveaux, 1968 les glucides représentent de 95 à plus de 99% de la matière sèche des miels. Une quinzaine de sucres différents ont été identifiés dans les miels par chromatographie, mais ils ne sont jamais tous présents simultanément. Parmi eux, on retrouve des monosaccharides avec en moyenne

31% de glucose et 38% de fructose (ou lévulose), des disaccharides comme le maltose (7,3%) et le saccharose (1,3%) et des tri et polysaccharides qui représentent 1,5 à 8% du total. On peut citer parmi eux : l'erlose (glucosylsucrose), la raffinose, le mélézitoze, le kojibiose (diholoside constitué de deux unités de glucose reliées par une liaison osidique $\alpha 1 \rightarrow 2$), le dextrantriose (isomaltotriose), le mélibiose...etc. La teneur en eau des miels varie entre 14 et 25%. L'optimum se situe autour de 17%, car un miel trop épais est difficile à extraire et à conditionner, tandis qu'un miel trop liquide riche en eau risque de fermenter (Huchet *et al.*, 1996).

Le miel contient également des composants mineurs notamment des acides, protéines et aminoacides, vitamines ou encore les bactéries lactiques. Bien que ces composants soient présents en faible concentration dans le miel, ils sont cependant en grande partie responsables des différentes propriétés thérapeutiques qui lui sont attribuées (Anand *et al.*, 2018).

I-3- Origine des miels

Les miels peuvent être classés selon l'origine botanique, l'origine géographique ou bien le mode d'extraction du miel.

I-3-1- Le nectar

Le nectar est une exsudation sucrée plus ou moins visqueuse formée à partir de la sève de la plante au niveau des cellules des glandes nectarifères où siègent des transformations biochimiques complexes, conférant au précieux liquide une composition très variée. C'est une solution acide et sucrée destinée à attirer les insectes pollinisateurs tels que les abeilles. La production nectarifère peut varier selon la taille de la fleur, sa durée de floraison, ou encore selon la structure de l'inflorescence. L'environnement (température, humidité du sol, moment de la journée, situation géographique ou altitude et latitude) influe également sur la quantité de nectar produite par les plantes. Dans des conditions optimales, une colonie peut récolter jusqu'à 5 kilogrammes de nectar par jour (Apimondia, 2001 ; Rossant, 2011).

Le nectar est composé essentiellement d'eau (80%) et de sucres (20%) à des concentrations pouvant être variables. Les sucres principalement retrouvés sont le saccharose, le glucose ou le fructose, dépendant de l'origine florale (Darrigol, 2007). En outre, le nectar contient en quantité infime des acides organiques, des protéines (enzymes et acides aminés libres), des composés inorganiques, des vitamines et des pigments phénoliques issus des pollens et exprimant un arôme et une couleur propre à chaque espèce végétale. Dans certains nectars, peuvent se retrouver des composés huileux, des alcaloïdes ou des substances bactéricides. Ces substances attribueront au miel une véritable « carte d'identité » phytosociologique (Koechler, 2015).

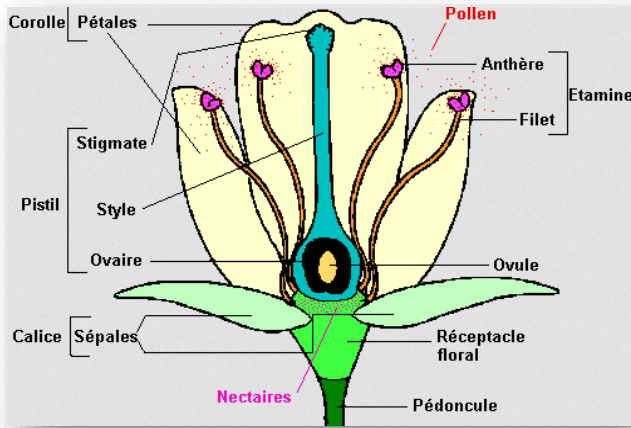


Figure 2 : Structure d'une fleur



Figure 3 : Abeille entrain de butiner du nectar

1-3-2- Le miellat

Le miellat constitue les excréments de certains insectes suceurs de sève (hémiptères et des homoptères comme les pucerons, les cochenilles, les cigales et les psylles), laissées sur les végétaux (Gharbi, 2011). Ce liquide épais, dense et visqueux est composé de sucres plus complexes que le nectar, comme le mélézitose ou l'erlose. Cependant, le mélézitose peut représenter un réel danger s'il est présent en grande quantité dans les ruches car il peut durcir comme de la pierre. On y retrouve également plus d'acides organiques, de minéraux et d'azote, sa composition se rapproche donc d'avantage de celle de la sève végétale que de celle du nectar (UNAF, 2011).

Les abeilles récoltent le miellat en complément ou en remplacement du nectar. Les plantes hôtes de ces producteurs de miellat sont le plus souvent des arbres forestiers ou d'ornementation comme le sapin, l'épicéa, le pin sylvestre, le chêne ou le mélèze (Jean-Prost et Le Conte, 2005).

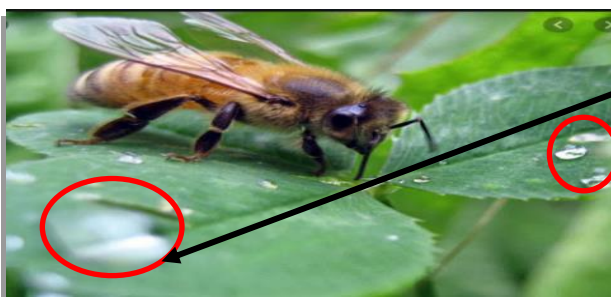


Figure 5 : Abeille entrain de récolter du miellat

Miellat



Figure 4 : Un psylle secrétant du miellat

I-4 Les types des miels

Les miels peuvent être selon l'origine botanique, l'origine géographique, le mode d'extraction ou bien le mode de présentation.

I-4-1 Classification des miels selon l'origine florale ou botanique

Au cours de leur récolte du nectar pour l'élaboration du miel, les abeilles butineuses sont en contact direct avec les étamines, lesquelles perdent une partie de leur pollen qui est capturé par la pilosité de l'abeille et qui finalement se retrouvera dans le miel extrait (Braun *et al.*, 2012). Ces grains de pollen associés au nectar constituent un marqueur de l'origine botanique du miel. En effet, à chaque espèce végétale correspond un type de pollen qui sera déterminé après observation au microscope optique ou au microscope électronique (Reille et Pons, 1990).

Dans la catégorie des miels produits à partir de nectars deux groupes se distinguent ; les miels monofloraux et les miels polyfloraux :

- **Un miel monofloral** : est essentiellement produits à partir du nectar d'une seule espèce végétale, ce qui nécessite d'installer les ruches à proximité de la plante recherchée (Clément, 2002). Ce type de miels présente des caractéristiques palynologiques, organoleptiques et physicochimiques spécifiques. (Bogdanov *et al.*, 2003). Les miels monofloraux les plus abondant en Algérie sont les miels d'eucalyptus et d'agrumes que l'on trouve surtout dans les zones littorales, les miels de jujubier ou sedra produit dans les hauts plateaux (Homrani, 2020). En outre il y a également les miels de fenouil sauvage, de grenadiers, de colza, de bruyère, de câprier, de chardon, de *Genista*, de tamarix, de coriandre, de Sulla ou sainfoin d'Italie, de romarin, de néflier, mélilot, d'euphorbe, de lavande, de romarin, d'arbousier, de thym, de carotte sauvage, de caroubier, de harmel, de sainfoin, de luzerne, de chardon, de sulla, de bruyère, d'asphodèle, de ravenelle, d'atractylis, de *Retama*, de moutarde, de carvi, de *Tamarix*, de trèfle, d'anis vert, de vipérine, d'arbousier, de bourrache, de néflier, de *férule*, de *thapsia*, de vesce, de chêne vert (PAP-ENPARD-Algérie, 2019 ; Homrani, 2020). La grande diversité des miels monofloraux, démontre le potentiel mellifère dont le pays dispose. Cependant, le secteur apicole en Algérie reste mal exploité, la majorité des apiculteurs ne sont pas des professionnels mais plutôt des amateurs, le plus souvent des « Fellah », avec des connaissances réduites en apiculture et des moyens artisanaux donnant ainsi de faibles productions.

- **Un miel polyfloral** : aussi appelé « *miels toutes fleurs* » est élaboré à partir du nectar provenant de plusieurs espèces végétales sans prédominance particulière : ils résultent d'un butinage dans un environnement où plusieurs variétés de plantes donnent simultanément du nectar. Ils représentent la majorité de la production algérienne (Homrani, 2020).

Dans la catégorie des miels produits à partir de miellat la dénomination est généralement en fonction de l'origine botanique de la plante ou a été récolté le miellat. Le plus souvent ce miel est appelé miel de forêt. À ce jour, un seul miel de miellat est commercialisé sous le nom d'un insecte : *Metcalfa pruinosa*. (Persano *et al.*, 2004). La période de récolte du miellat, par les abeilles s'étend du fin printemps à la fin de l'été voir jusqu'à octobre. Mais c'est une récolte aléatoire. Les facteurs climatiques sont très importants. Une forte pluie peut éliminer en quelques heures les pucerons et le miellat. Un miel peut cependant être un mélange de miel de miellat et de nectar. **Le tableau 2** montre les principales différences entre le miel de miellat et le miel de nectar. Le miel de miellat est un miel méconnu par le consommateur algérien. Il est plutôt sombre et moins humide que le miel de nectar.

Tableau 2 : Les différences entre miel de nectar et miel de miellat (teneurs moyennes)

	MIEL DE MIELLAT	MIEL DE NECTAR
Acidité	33 méq/kg	22,4 méq/kg ⁽¹⁾
pH	4,5	3,9
Minéraux (cendres)	0,58%	0,26%
Fructose + glucose	61,6%	74%
Autres sucres (en % des sucres totaux)		
Mélézitose	8,6	0,2
Raffinose	0,84	0,03
Maltose + isomaltose	9,6	7,8

(1) Méq = milli-équivalent

I-4-2 Classification des miels selon l'origine géographique

Afin de valoriser la spécificité des miels polyfloraux et permettre au consommateur de reconnaître leur caractère dominant, les apiculteurs indiquent l'origine géographique. Celle-ci indique soit l'aire de production (région, département, massif...), ou bien un type de paysage faisant référence à une flore identifiée (montagne, maquis, forêt...etc). L'indication des miels polyfloraux peut être aussi suivant les saisons (miel de printemps ou d'été) comme le préconise (Donadieu, 1984).

Cependant, la désignation d'un miel par une région géographique topographique, exige que ce dernier soit exclusivement produit dans la zone indiquée dans la désignation. Ce type de miel doit être certifié par des signes distinctifs de qualité « AOP » et « IGP ». La melissopalynologie qui est l'étude du pollen dans le miel demeure un outil indispensable pour caractériser la typicité d'un miel selon son origine géographique Ces certifications ont pour objectif de valoriser et de protéger les

produits de terroir et les produits locaux. L'appellation d'origine protégée (AOP) désigne la dénomination d'un produit dont la production, la transformation et l'élaboration doivent avoir lieu dans une aire géographique déterminée, avec un savoir-faire reconnu et constaté. Dans le cas de l'indication géographique protégée (IGP), le lien avec le terroir demeure, à un des trois stades au moins de celui de la production, de la transformation ou de l'élaboration, et le produit peut jouir d'une grande réputation (Homrani, 2020). Le Maroc par exemple dispose de trois miels labellisés IGP à ce jour qui sont le « miel d'Euphorbe Tadla-Azilal », le « miel d'arbousier Jbal Moulay Abdessalam » et le « miel d'Euphorbe du Sahara » (Homrani, 2020). L'Algérie ne possède à ce jour aucun miel AOP ou IGP malgré les capacités dont le pays dispose.

I-4-3 Classification des miels selon de la méthode d'extraction du rayon.

- Le miel extrait est le miel obtenu par centrifugation de rayons désoperculés ne contenant pas de couvain.
- Le miel pressé est le miel obtenu par pressage de rayons ne contenant pas de couvain.
- Le miel égoutté est le miel obtenu en égouttant des rayons désoperculés ne contenant pas de couvain.

I-4-4 Classification selon les modes de présentation

- Le miel proprement dit est un miel sous forme liquide ou cristallisée ou un mélange des deux formes
- Le miel en rayons est le miel emmagasiné par les abeilles dans les alvéoles de rayons fraîchement construits ne contenant pas de couvain, et vendu en rayons operculés entiers ou en sections de rayons operculés
- Les rayons découpés présentés dans du miel ou le miel avec morceaux de rayons, c'est-à-dire du miel renfermant un ou plusieurs morceaux de miel en rayons

Le miel qui a été filtré d'une manière aboutissant à l'élimination de quantités importantes de pollen sera désigné par le nom de « miel filtré ».

I-5- Elaboration du miel

I-5-1- Travail de l'abeille

L'élaboration du miel commence lorsque les abeilles butineuses recueillent le nectar par aspiration avec leurs trompes et le miellat par léchage puis qu'elles les emmagasinent dans le jabot en y ajoutant de la salive ce qui les rendront fluide et surtout les enrichiront en enzyme (la gluco-invertase) qui transforme les polysaccharides en sucres simples. A son retour à la ruche, la butineuse régurgite la solution sucrée prédigérée (miellat/nectar), la passe aux ouvrières, qui elles-mêmes la

communiquent à d'autres et ainsi de suite. Grâce à ce phénomène appelé « trophallaxie » la teneur en eau s'abaisse en même temps que le liquide s'enrichit de sucres gastriques et de substances salivaires : invertase, diastase, et gluco-oxydase. Par la suite la solution sucrée transformée (contenant 50% d'eau) va subir une nouvelle concentration par évaporation, qui se fait sous double influence, d'abord de la chaleur régnant dans la ruche qui est d'environ 36 °C, Ensuite de la ventilation par le travail des ventileuses qui entretiennent un puissant courant d'air ascendant par un mouvement très rapide de leurs ailes (Boucif, 2017). Cette solution représente le miel stocké dans les alvéoles. Ces dernières seront operculées par les abeilles cirières, une fois que la teneur en eau est aux environs de 20%, à l'aide d'une fine couche de cire, imperméable à l'air, ce qui permet une longue conservation du miel.

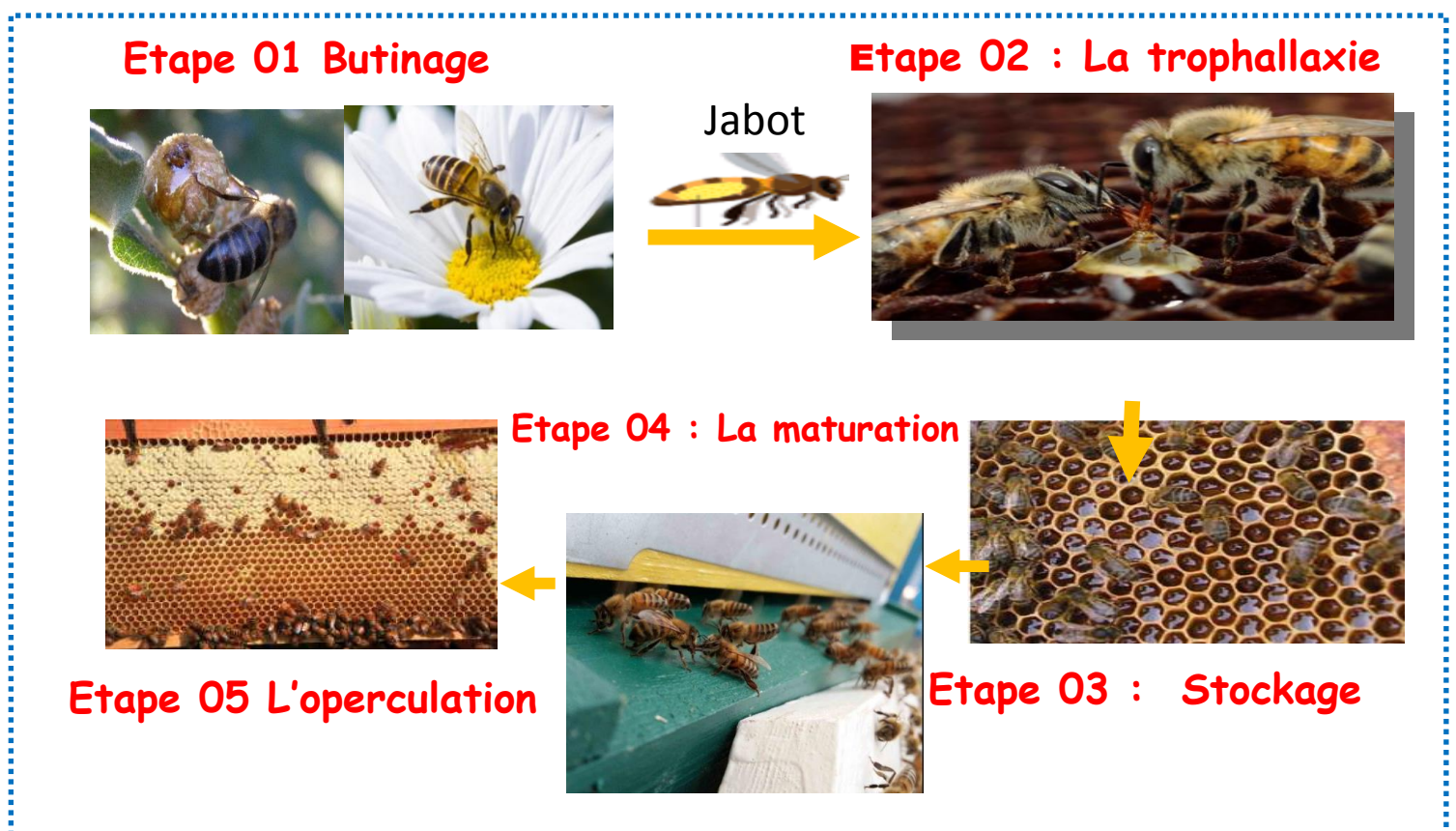


Figure 6 : les étapes de fabrication du miel par les abeilles

I-5-2 Travail de l'apiculteur

L'apiculteur récolte le miel fabriqué par les abeilles. Cette procédure a lieu en général après une miellée (qui correspond à la période de production du nectar par la flore susceptible d'en fournir) et lorsque les 3/4 des alvéoles des rayons de cire sont operculés (Figure 7). Les différentes étapes de la récolte sont l'enfumage des abeilles (Figure 7), le décollage, brossage des cadres et le transport dans un véhicule étanche jusqu'à la miellerie.

Chapitre I : Généralités sur le miel

Une fois ramenés à la miellerie, l'apiculteur commence par retirer la fine pellicule de cire qui obstrue les alvéoles remplies de miel grâce à un couteau ou à une griffe à désoperculer en acier inoxydable (Figure 7) puis procède à l'extraction du miel par un extracteur. L'extraction peut se faire soit par pressage ou bien par centrifugation. Cette dernière est la méthode la plus utilisée puisqu'elle permet de maintenir les cadres en bon état et donc de les réutiliser. L'extracteur utilisé pour cette technique est une sorte de centrifugeuse manuelle ou automatisée où ils vont tourner très rapidement. La force centrifuge fait alors sortir le miel des alvéoles. Le miel glisse le long des parois, s'accumule au fond de l'extracteur et est récupéré par l'apiculteur après ouverture de la vanne. Il est également possible d'extraire le miel de façon artisanale par l'utilisation d'un filet.

Une fois que tous les cadres sont vides, le miel contenu dans la cuve contient de nombreuses impuretés et est alors filtré dans une sorte de grand tamis pour l'épurer, qui va retirer diverses particules de propolis, de cire, d'opercules, de pattes d'abeilles ou de pollen. Une fois filtré, le miel doit encore reposer 4 à 5 jours à une température de 20 °C minimum pour faire remonter en écume l'ensemble des dernières impuretés. Cette écume est ensuite enlevée avant l'étape suivante. Enfin prêt, le miel peut être conditionné en pots avec des capsules qui assurent leur étanchéité et munis d'un étiquetage conforme avec toutes les mentions légales y afférentes.



Figure 7 : élaboration du miel par l'apiculteur. A : Enfumage des abeilles ; B : Miel operculé à 100% ; c : Désoperculation des cadres ; d : Extraction du miel

1-6- Critères de qualité du miel

Le miel est classé comme le 6ème produit qui risque le plus de faire l'objet de fraude alimentaire après l'huile d'olive, les poissons, les aliments biologiques, le lait et les céréales (Comenvi, 2013). Afin de protéger le consommateur des différentes fraudes, des normes internationales ont été établis. Par ailleurs ces normes permettent également aux apiculteurs de confirmer la qualité de leurs produits qui peuvent ainsi le valoriser.

L'évaluation de la qualité du miel comprend la vérification de son authenticité ainsi que l'estimation de sa maturité et sa fraîcheur.

L'authenticité des miels passe tout d'abord par la confirmation de leurs origines botaniques. En Algérie par exemple, en raison de l'absence de réglementation sur le miel, l'appellation sur le marché de ce dernier correspond généralement à des observations effectuées par des apiculteurs sur le terrain sans aucune confirmation par des analyses en laboratoire et peuvent donc être fallacieuse ce qui constitue une fraude, mais elle constitue surtout une tromperie vis-à-vis du consommateur algérien (Homrani, 2020). L'analyse pollinique ou Méliissopalynologie est préconisé pour déterminer ou pour confirmer l'origine florale d'un miel. La méthode classique de (Louveaux *et al.*, 1978) est le plus souvent utilisé. Elle est basée sur l'observation au microscope d'un sédiment obtenu après centrifugation d'une solution de miel (Figure 8).

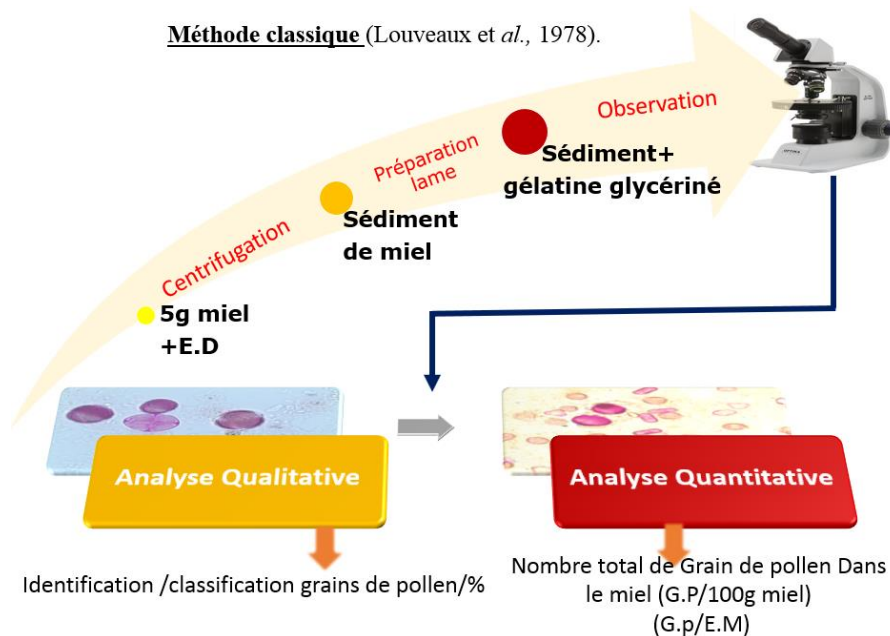


Figure 8 : Analyse pollinique des miels par la méthode classique de louveaux *et al.*, 1978.

Par ailleurs, certaines analyses physicochimiques sur le miel permettent également de déterminer sa qualité (Tableau 3).

Chapitre I : Généralités sur le miel

Le pH et la conductivité électrique permettent de différencier les miels de miellats de ceux de fleurs. Le paramètre du pH influence la stabilité du miel et ses conditions de conservation.

La mesure **du taux d'humidité** des miels permet l'estimation du degré de leur maturité. Les teneurs en eau élevées sont l'indicateur d'une récolte trop précoce et/ou d'un climat humide (Bogdanov *et al.*, 2004). Ce paramètre renseigne également sur sa stabilité contre la fermentation et la cristallisation au cours du stockage (De Rodriguez *et al.*, 2004 ; Küçük *et al.*, 2007). A l'exception de certains miels, les normes légales admettent une teneur en eau maximale de 20%, mais seuls les miels dont l'humidité est inférieure à 18% se conservent correctement.

Le taux de H.M.F et l'indice diastasique constituent un bon indicateur pour la fraîcheur et le sur-chauffage du miel. L'H.M.F provient de la décomposition du fructose en présence d'acide lorsque le miel est conservé longtemps à température ambiante élevée. Un taux maximum admissible est de 40 mg/ kg. L'activité enzymatique est représentative de l'activité enzymatique de l'amylase, dont la valeur, malgré une variabilité naturelle, traduit la dégradation des enzymes naturelles du miel. Avec le vieillissement du miel, la teneur en diastases diminue progressivement et tend vers zéro (Louveaux, 1968). La destruction des diastases est fortement accélérée par l'élévation de la température.

Tableau 3 : Recommandations et exigences internationales des critères de qualité du miel (Codex Alimentarius, 2001 ; UE, 2002)

Caractéristique qualitative	Exigences de UE	Recommandations du Codex
Eau (g/100g)		
Miel, en général	max. 21	max. 21
Miel de bruyère, miel de trèfle	max. 23	max. 23
Teneur apparente en sucres réducteurs (g/100 g)		
Miel de fleurs	min. 65	min. 65
Miel de miellat, ou mélanges avec miel de fleurs	min. 60	min. 60
Teneur apparente en saccharose (g/100 g)		
Miel en général	max. 5	max. 5
Miel de miellat, ou mélanges avec miel de fleurs (miel d'acacias, de lavande, de Banksia, d'Eucryphia)	max. 10	max. 10
Substances non hydrosolubles (g/100 g)	0.1	0.1
Sels minéraux (g/100g)		
Miel en général	max. 0,6	max. 1
Miel de miellat ou mélanges de miel de fleurs	max. 1	pas d'indication
Acides libres (milliéquivalent/kg)	40	40
Indice d'amylase (en unités de Schade)		
Miel en général	min. 8	min. 3
Miels pauvres en enzymes, comme le miel d'acacias, de fleurs d'oranger	min. 3	pas d'indication
Hydroxyméthylfurfurol (mg/kg)	max. 40	max. 80

I-7 Effets prébiotiques du miel

Des études *in vitro* et *in vivo* démontrent un effet stimulant du miel et de ses composants glucidiques sur les micro-organismes bénéfiques habitant les parties inférieures du tube digestif humain et animal (**tableau 4**).

Les bifidobactéries sont des organismes assez exigeants. De nombreux chercheurs ont rapporté que les bifidobactéries se développent mal dans le lait et nécessitent donc l'ajout de facteurs de croissance spécifiques (Rybka et Fleet, 1997 ; Dave et Shah, 1998 ; Chick *et al.*, 2001). On suppose que les substrats les plus préférés pour les bifidobactéries sont les polysaccharides à faible degré de polymérisation qui sont présents dans le miel (Chick *et al.*, 2001 ; Kajiwara *et al.*, 2000). Deux types de miel monofloral, le miel de châtaignier foncé et le miel d'acacia clair, ont augmenté l'activité enzymatique et le nombre de cellules viables de *B. lactis* (Bb-12) et *B. longum* (Bb-46) dans le lait de soja (Slacanac *et al.*, 2012). De plus, l'ajout de miel, notamment de miel de châtaignier, a augmenté le potentiel inhibiteur du lait de soja fermenté contre *Listeria monocytogenes*. Les miels australiens ont contribué à la croissance de *B. lactis* et *Lb. plantarum* plus que le saccharose et l'inuline (Conway *et al.*, 2010).

Tableau 4: Miels monofloraux, stimulant la croissance et activité des micro-organismes probiotiques

Microorganismes	Origines botaniques	References
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Eucalyptus sideroxylon</i> , <i>Eucryphia lucida</i>	Conway <i>et al.</i> , 2010
<i>Lb. delbrueckii subsp.bulgaricus</i>	<i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i>	Popa and Ustunol, 2011
<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. sideroxylon</i> , <i>Banksia sp.</i> , <i>E. melliadora</i> , <i>E. paniculata</i> , <i>E. longifolia</i> , <i>E. triantha</i>	Conway <i>et al.</i> , 2010
<i>Lb. ramnosus</i>	<i>E. sideroxylon</i> , <i>E.lucida</i>	Conway <i>et al.</i> , 2010
<i>Lb. paracase</i>	<i>Medicago sp.</i>	Popa and Ustunol, 2011
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>O. arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i> <i>Salvia sp.</i> ,	Popa and Ustunol, 2011;
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Trifolium sp.</i>	Chick <i>et al.</i> , 2001
<i>B. adolescentis</i>	<i>O. arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i> <i>Salvia sp.</i>	Popa and Ustunol, 2011
<i>B. infantis</i>	<i>O. arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i> <i>Salvia sp.</i>	Popa and Ustunol, 2011
<i>B. longum</i>	<i>O. arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i> <i>Salvia sp.</i> , <i>Castanea sp.</i> , <i>Acacia sp.</i> ,	Popa and Ustunol, 2011;
<i>B. breve</i>	<i>O. arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i> <i>Salvia sp.</i>	Slacanac <i>et al.</i> , 2012
<i>B. lactis</i>	<i>O. arboreum</i> , <i>Medicago sp.</i> <i>Salvia sp.</i> <i>Castanea sp.</i> , <i>Acacia sp.</i> , <i>E.</i> <i>sideroxylon</i> , <i>E. melliadora</i> , <i>E. paniculata</i> , <i>E. longifolia</i> , <i>E. triantha</i>	Popa and Ustunol, 2011; Slacanac <i>et al.</i> , 2012

Chapitre II :
Caractéristiques
microbiologiques des
miels

II-1 Origine des microorganismes présents dans le miel

Les microorganismes associés aux miels sont issus de contaminations primaires ou secondaires (Silva *et al.*, 2017).

Les sources primaires de contamination du miel sont essentiellement, les poussières, l'air, les fleurs. Les micro-organismes associés aux plantes qui résident sur les surfaces des fleurs, dans le nectar, le pollen, le sol et l'eau sont les bactéries les plus prédominantes dans le miel. En outre, le tube digestif des abeilles mellifères s'est révélé être une source importante de contamination microbienne du miel (**Figure 11**). En effet, au cours du processus de production du miel, les abeilles introduisent dans le nectar certaines bactéries de leur microbiote intestinal. Il convient de noter que la composition du microbiote intestinal des abeilles varie en fonction de la saison et de la période de floraison (Wang *et al.*, 2015).

Les micro-organismes provenant de sources post-récolte, y compris l'homme, le matériel et même les poussières, sont considérés comme contamination de seconde source et peuvent être divisés en trois catégories (Naseer *et al.*, 2015) :

- Les micro-organismes sporifères qui se trouvent couramment dans le miel ;
- Les micro-organismes généralement utilisés comme indicateurs de qualité hygiénique ;
- Les micro-organismes dont la présence pourrait déduire des conditions spécifiques, telles que la germination (Snowdon et Cliver, 1996).

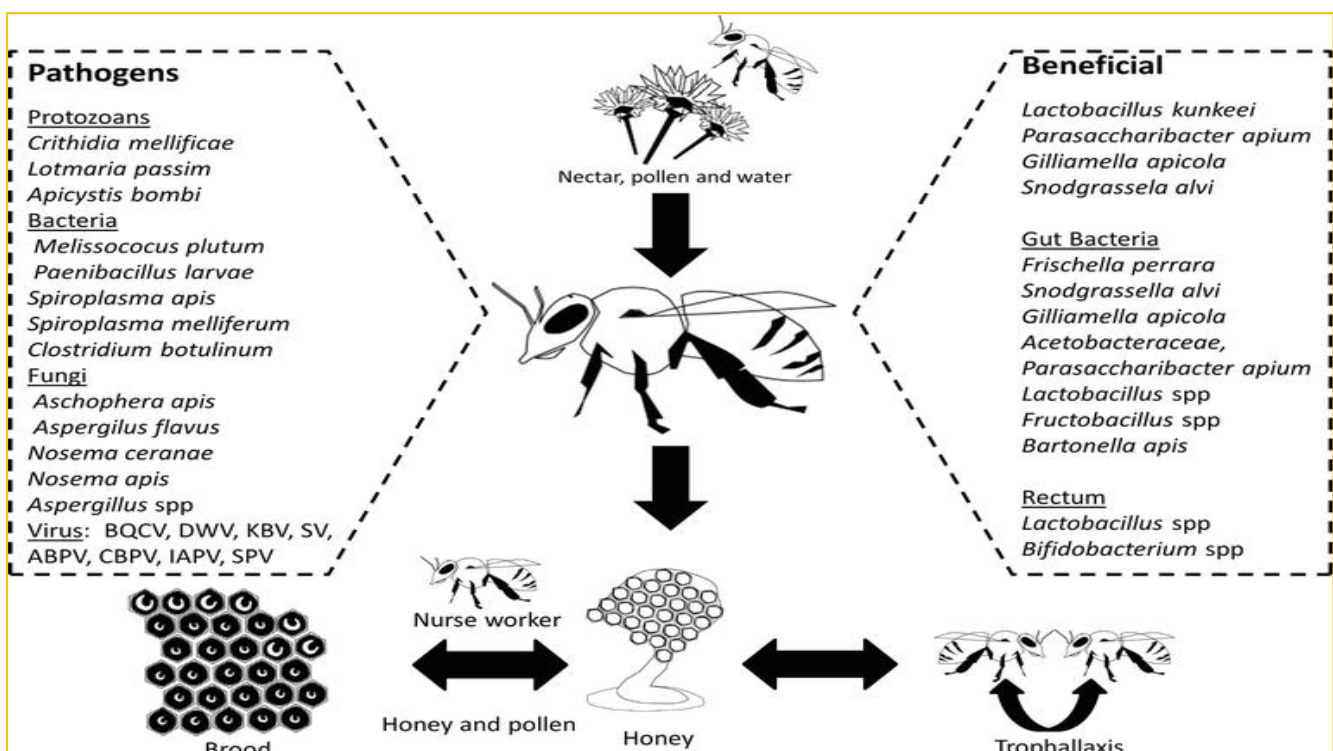


Figure 9: sources primaires de microorganismes dans le miel (Silva *et al.*, 2017)

Chapitre II : Caractéristiques microbiologiques des miels

II-2 Flore microbienne du miel

La communauté de micro-organismes résidant dans le miel est une combinaison de bactéries, de levures et de moisissures pouvant varier dans certaines conditions (Carvalho *et al.*, 2006 ; Rozanska, 2011). Selon Snowdon et Cliver (1996), les différentes espèces microbiennes présentes dans le miel peuvent atteindre une concentration de quelques milliers d'unités formant colonie (UFC) par gramme. Selon les normes Les germes mésophiles dans le miel doivent être inférieur à 30 UFC/ g tandis qu'une absence totale des germes coliformes fécaux et de micro-organismes pathogènes pour l'homme est exigée. Le tableau résume les principaux microorganismes détectés dans le miel.

Tableau 5 : Micro-organismes répertoriés dans le miel (Olaitan *et al.*, 2007 ; Sib, 2007)

Bactéries	Levures	Champignons
<i>Alcaligenes</i>		
<i>Achromobacter</i>		
<i>Bacillus</i>		
<i>Bacteridium</i>	<i>Ascophaera</i>	<i>Asperhillus</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Debaromyces</i>	<i>Alihia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettsia alvei</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronsporaceae</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Scizosaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Trichosporium</i>	<i>Tripooorium</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Torula</i>	<i>Uredianceae</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Ustilaginaceae</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Zygasaccharomyces</i>	
<i>Enterococcus</i>		
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Bifidobacterium</i>		

II-2-1 Microorganismes pathogènes du miel

Les principales espèces fongiques isolés des miels sont : *Iternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus proliferans*, *Aspergillus spelunceus*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Daldinella concentrica*, *Emeric discophora*, *Emericella qinqixianii*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium polonicum* et *Penicillium echinulatum*. Ces microorganismes sont présents à de faible concentration dans le miel indiquant la capacité de ces

Chapitre II : Caractéristiques microbiologiques des miels

derniers à contenir leur multiplication (Sinacori *et al.*, 2014). La pathogénicité des champignons réside dans la production de mycotoxines, qui sont des métabolites secondaires des champignons filamenteux et toxiques pour l'homme ainsi que les animaux même à faible concentration. Les champignons du genre *Aspergillus spp.* Et *Penicillium* sont les producteurs de mycotoxines les plus répondeurs dans le miel. La présence de champignons peut également provoquer des maladies de différentes manières, comme l'induction de réactions allergiques et d'infections. Ils sont également liés dans les maladies acquises chez les patients immunodéprimés hospitalisés notamment, *Aspergillus fumigatus* qui est le plus pathogène suivi par *A. flavus*, *Aspergillus terreus* et *A. niger* (Silva *et al.*, 2017).

En ce qui concerne les levures, ce sont généralement des levures osmophile qui peuvent se multiplier dans une solution de sucre à haute concentration. Seules les espèces *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Aureobasidium pullulans* et *Cryptococcus uzbekistanensis* ont été isolées du miel (Sinacori *et al.*, 2014). Parmi elles, seule l'espèce *Cryptococcus neoformans* est caractérisée comme pathogène humain opportuniste capable d'infecter le système nerveux central (shbee et Bignell ; 2010)

Parmi les bactéries associées au microbiote du miel, *Bacillus sp.* Et *Clostridium botulinum* ont été décrits comme pathogènes. Le genre *Bacillus* comprend des bactéries Gram-positives en forme de bâtonnet avec la capacité de former des spores. La plupart des *Bacillus sp* ne sont pas pathogènes ; la pathogénicité associée aux autres est sous forme opportuniste. *Bacillus cereus* est un agent pathogène important dans le miel ; c'est un producteur d'entérotoxines à un pH de 6,0 à 8,0 et à une température allant de 6°C à 21°C, mais il est nécessaire d'ingérer 10⁷ cellules/mL pour atteindre un effet toxique (Jay *et al.*, 2005). Par ailleurs, de nombreuses études ont été, principalement, consacrées à la présence de *Clostridium botulinum* (Saraiva *et al.*, 2012). Ce microorganisme pénètre dans la ruche par l'eau contaminée ou encore par contact du produit avec le sol. Il ne cause pas de dommages aux abeilles, mais il est responsable du développement du botulisme chez l'homme, en particulier chez les enfants ou les personnes dont le système immunitaire est affaibli et peut entraîner la mort (Poormontaseri *et al.*, 2014). C'est pour cela qu'il est déconseillé de donner du miel aux enfants de moins d'un an.

II-2-2 Micro-organismes bénéfiques du miel

II-2-2-1 *Gluconobacter oxydans* : Cette bactérie a été isolée du miel récolté directement dans la ruche. Elle a montré une capacité à résister à un pH bas et aux sels biliaires ainsi qu'à assimiler le cholestérol en réduisant l'absorption de ce composant par l'organisme ce qui suggère

Chapitre II : Caractéristiques microbiologiques des miels

la possibilité de les utiliser comme probiotique (Silva *et al.*, 2017). Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, affectent positivement la santé de l'hôte (Guarner *et al.*, 2011).

II-2-2-2 *Bacillus spp* : le miel contient des spores de bactéries aérobies sporulées du genre *Bacillus spp*. Qui sont collectés par les abeilles sur les plantes pendant la recherche de nourriture (Madras-Majewska *et al.*, 2016). Les propriétés physico-chimiques du miel ne permettent pas à ces spores de bactéries de passer sous la forme végétative. Cependant leur mise en culture dans des conditions optimales permettra leur développement. Diverses souches de *Bacillus spp*. Isolés de miels présentent une activité antagoniste contre les agents pathogènes de l'homme et des vertébrés, et stimulent également le système immunitaire des mammifères, en relation avec laquelle trouver des applications comme probiotiques en médecine et vétérinaire (Lazovskaya *et al.*, 2013). Des chercheurs ont isolé des bactéries dans des échantillons de miel de différentes origines géographiques et botaniques. Ils ont trouvé « *B. pumilus (ML374)*, *B. licheniformis (ML103A et ML104B)*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium et B. pumilus* » (Sinacori *et al.*, 2014). Les bactéries de l'espèce *B. cereus* sont productrices d'entérotoxines ; les autres espèces de *Bacillus* sont considérées comme sûres. En raison de leur capacité à produire des bactériocines, ils sont prometteurs dans l'étude de nouveaux antimicrobiens (Zhao *et al.*, 2013). En 2013, une étude a été menée avec une nouvelle souche bactérienne isolée du miel, capable de produire des fongicides bactériocines appelés *Bacillus BH072*. Ces bactériocines ont été testées et ont montré un caractère inhibiteur contre *A. niger* CGMCC3.03928, *Fusarium oxy-sporum* CGMCC3.2830, *Pythium* et *Botrytis cinerea* CGMCC3.4584 (Zhao *et al.*, 2013).

II-2-2-3 Les bactéries lactiques : Ce groupe de bactérie fait partie des principaux microorganismes bénéfiques détecté dans différentes variétés de miels.

II-2-2-3-1 description des bactéries lactique

Les bactéries lactiques sont des microorganismes susceptibles d'être retrouvées dans tous les types d'habitat. Elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire. Ce sont des micro-organismes microaérophiles Gram-positifs fonctionnellement associés par leur capacité à fermenter les glucides dans un métabolisme homo ou hétérofermentaire avec formation d'acide lactique (Salminen *et al.*,

Chapitre II : Caractéristiques microbiologiques des miels

2004). Traditionnellement, les bactéries lactiques comprennent des représentants immobiles, catalase négative, asporés, de forme de bâtonnet ou de cocci des *Lactobacillales*.

Les *Bifidobacterium* sont des parents éloignés des *Lactobacillales*. C'est le genre de bactéries Gram-positives, anaérobies, catalase négatives, asporogènes, en forme de bâtonnet, par définition, n'est pas un « vrai » membre des bactéries lactiques. Cependant, les *Bifidobacterium* sont généralement considérés comme appartenant au groupe des bactéries lactiques en raison de leur production d'acide lactique, de leur utilisation dans la fabrication de produits laitiers et de leurs effets bénéfiques bien connus sur la flore du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux (Coenye et Vandamme, 2003).

Les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzapfe, 1997), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) selon Klaenhammer et al., (2005).

II-2-2-3-2 Taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par une constellation de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des *Fimicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales* (Garrity et al., 2004). Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* des bactéries Gram positif (G+C < 50 mol%). Les bactéries lactiques englobent les genres suivants : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactosphaera*, *Vagococcus* et *Weisella*. Néanmoins, c'est surtout *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weisella* et à grande échelle *Lactobacillus*, qui ont une certaine importance dans les aliments (Vandamme et Pote, 1996). La relation phylogénétique entre les différents genres des bactéries lactiques est représentée sur la **figure 12** et est basée sur la comparaison des séquences d'ARN16S. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Lactosphaera* sont étroitement apparentés les uns aux autres. *Lactococcus* et *Streptococcus* apparaissent comme relativement apparentés, alors que *Lactobacillus* est phylogénétiquement distinct. Récemment 15 genres lactiques ont été décrits (*Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Ermecoccus*, *Facklamia*, *Ignavigranum*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Desemzia*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *MariniLactobacillus*, *Trichococcus*, *Atopobacter*, *ParaLactobacillus*, *Oscillospira*). Parmi ces 15 nouveaux genres, seul *ParaLactobacillus* est d'origine alimentaire (Bahloul et al., 2012).

Chapitre II : Caractéristiques microbiologiques des miels

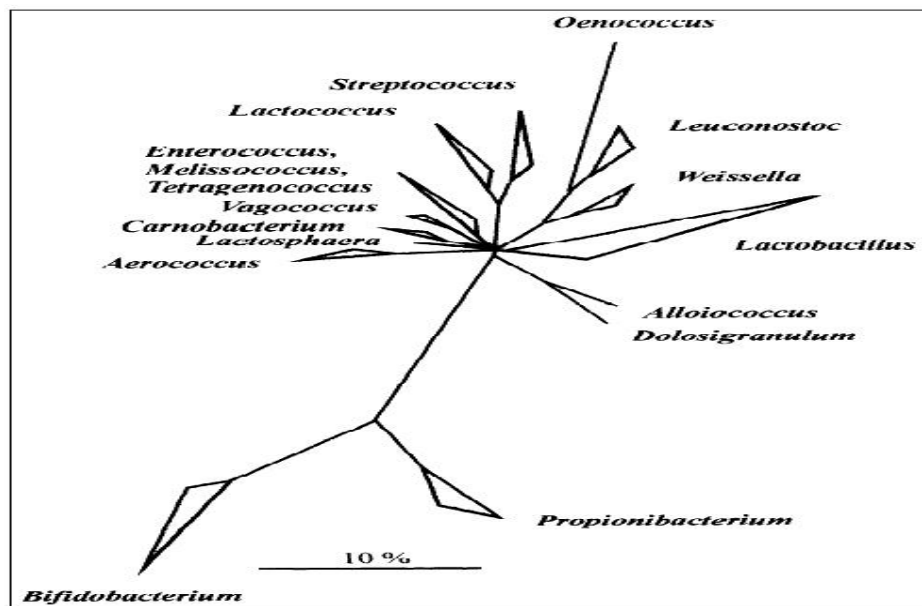


Figure 10 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres associés, obtenu par analyse des ARNr16S (Stiles et Holzapfel,1997).

II-2-2-3-3 Intérêt des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques, sont utilisées en agroalimentaire principalement en tant que starter dans les produits (Abee, 1995 ; Hugenholtz et Kleerebezem, 1999). Par ailleurs, Certaines bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, la reutérine, le di-acétyle et les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens inhibant la croissance de bactéries altérantes ou pathogènes. Les souches productrices de bactériocines peuvent donc être, également, utilisées dans des produits non fermentés en tant que culture protectrice. De plus, face à l'émergence de la résistance des bactéries pathogènes à l'antibiothérapie l'industrie pharmaceutique s'est orientée vers la recherche de nouvelles molécules naturelle antimicrobiennes. Grâce à leur mode d'action différent des antibiotiques conventionnels, les bactériocines comme pourraient être considérées comme une alternative au contrôle de la prolifération et à l'inhibition des souches bactériennes pathogènes devenues résistantes aux traitements usuels. D'autre part, Les bactéries lactiques, peuvent être exploité comme probiotiques en raison des preuves croissantes de leurs bienfaits pour la santé (Tropcheva *et al.*, 2014 ; Feng *et al.*, 2015). **La figure 10** Résume les principales utilisations des bactéries lactiques.

Chapitre II : Caractéristiques microbiologiques des miels

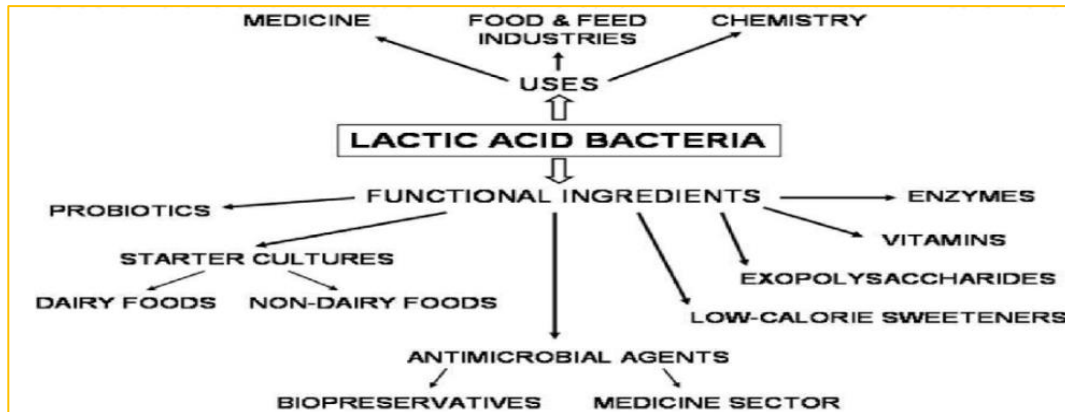


Figure 11 : principales utilisations des bactéries lactiques

II-2-2-3-4 Bactéries lactiques et miel

Lactobacillus, *Bifidobacterium*, et *Enterococcus* font parties des genres de bactéries lactiques les plus répondeurs dans le miel. Environ 40 souches de bactéries lactiques avec 13 espèces taxonomiquement identifiées de *Lactobacillus* (9 spp.) et *Bifidobacterium* (4 spp.) ont été trouvées dans le miel frais dont plupart sont des espèces décrites pour la première fois : *L. kunkeei* Fhon2, *L. apinorum* Fhon13, *L. mellis* Hon2, *L. mellifer* Bin4, *L. kullabergensis* Biut2, *L. kimbladii* Hma2, *L. helsingborgensis* Bma5, *L. melliventris* Hma8, *L. apis* Hma11, *B. coryneforme* Bma6, *B. asteroides* Bin2, *B. sp* Bin7 et *B. sp* Hma3 (Butler et al., 2014). Des études ont démontré que la synergie entre ces microorganismes a permis d'inhiber la croissance des bactéries responsables de mammite bovine, même celles qui étaient résistantes à d'autres antibiotiques (Piccart et al., 2016). En plus de la flore lactique unique des abeilles mellifères, le miel peut également contenir d'autres souches de bactéries lactiques qui sont beaucoup plus répondeurs, par exemple *Enterococcus faecium*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis*, *lb. fermentum*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus*, *Lb.paracasei* (Aween et al., 2012., Hasali et al., 2015 ; Bulgasem et al., 2016, Olofsson et al., 2016 ; Homrani et al., 2019). D'après Aween et al. (2012) ces bactéries contribuent à l'activité antibactérienne du miel. Selon d'autres auteurs, certaines caractéristiques du miel tel que la saveur, l'arôme et la texture sont en partie dues aux métabolites produits par les bactéries lactiques présentes dans le jabot de l'abeille (Mato et al 2006 ; Olofsson et Vasquez, 2008).

Chapitre III :

Identification de lactobacilles isolés à partir de miels

Chapitre III : Identification de lactobacilles isolés à parti de miels

III-1 Inforamations sur les lactobacilles

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ils appartiennent au groupe des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* (De Vos *et al.*, 2009). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques avec au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, phénotypique et écologique extrême (Corrieu et Luquet, 2008 ; Barinov *et al.*, 2011). Cette diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 % selon les espèces (De Vos *et al.*, 2009).

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles, où la formation de chaînes de cellules est courante (De Vos *et al.*, 2009).

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudo-catalase. Ils sont dépourvus de cytochrome généralement, nitrate réductase négative, gélatinase négative et ils sont micro-aérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire (Prescott *et al.*, 2003). Les lactobacilles sont subdivisés, selon leur type fermentaire, en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (Sutra *et al.*, 1998) :

- **Groupe I** : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires. Elles sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C), dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*.
- **Groupe II** : Ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces, dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles.
- **Groupe III** : Il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*.

La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Adams et Moss, 2000 ; Tailliez, 2004). De plus, les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête, lorsque le pH avoisine 3,5. Quant au milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS), où les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (De Vos *et al.*, 2009). Bien qu'elles aient besoin de milieux riches pour croître, elles sont omniprésentes et peuvent survivre partout où il y a des hydrates de carbone.

Chapitre III : Identification de lactobacilles isolés à partir de miels

Tableau 6 : critères différentiels des trois groupes de lactobacilles. FDP : Fructose 1-6 diphosphate.

Caractéristiques	Group 1, homofermentaires obligatoires	Group 2, Hétérofermentaires facultatifs	Group 3, hétérofermentaires obligatoires
Fermentation des pentoses	-	+	-
CO ₂ à partir du glucose	-	-	+
CO ₂ à partir du gluconate	-	+	+
FDP aldolase	+	+	-
Phosphokétolase	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>

III-2 Isolement de lactobacilles à partir de miel

Les bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* font parties des microorganismes bénéfiques les plus étudiés dans le miel. La détection de ces lactobacilles dans des échantillons de miel prouve leur capacité à survivre dans des produits à forte teneur en sucre, à faible activité de l'eau et à pH bas (Aween *et al.*, 2012). Cependant, plus le miel vieillit plus leur nombre diminue. En effet, lorsque l'on inocule différentes bactéries dans un miel stérilisé à 20°C, les bactéries ne résistent pas plus d'une quinzaine de jours (Harris, 1994). Seules les spores produites par les microorganismes peuvent survivre jusqu'à 4 mois après. En revanche, lorsque ce miel est mis dans de l'eau, alors ces microorganismes peuvent croître et survivent plus longtemps. Leur viabilité est toutefois minimale lorsque l'on sait qu'en associant du miel et de l'eau à hauteur de 50% chacun, la présence bactérienne n'excède pas 40 jours (Olaitan et Adeleke, 2007).

La non détection de certaines espèces peut être due soit à leur absence dans les miels étudiés ou bien à la méthode et les milieux d'isolement utilisés qui n'ont pas permis leur détection. En effet, le choix du milieu de culture utilisé pour l'isolement de lactobacilles à partir de miel est important. Un milieu de culture est un milieu qui permet d'empêcher la culture de certains micro-organismes et de favoriser la croissance des microorganismes souhaités. Ces milieux sont utilisés pour la séparation des bactéries dans une variété de produits microbiens. Le milieu MRS (Demman *et al.*, 1960), est recommandé pour la séparation, le comptage et la culture de *Lactobacillus*. Ce milieu favorise la croissance massive de toutes les bactéries lactiques provenant de différentes sources. Il est couramment utilisé pour la plupart des produits alimentaires (fermentés). Cependant l'isolement des lactobacilles des miels par des milieux classiques, tels que le MRS, est difficile à réaliser en raison

Chapitre III : Identification de lactobacilles isolés à parti de miels

de sa concentration élevée de sucres, limitant ainsi la détection de ces bactéries. Pour cela il est important d'utiliser des milieux plus riches dans le cas du miel. D'après Mounia *et al.*, 2018 les milieux MRS supplémenté de 0,8% de carbonate de calcium (CaCO₃) et le milieu Rogosa sont plus efficaces pour la détection et l'isolement des lactobacilles dans le miel. Des observations similaires ont également été signalé par Aween *et al.*, 2012 qui a souligné que le milieu MRS supplémenté de 0,8% de CaCO₃ a permis la détection de *Lactobacillus acidophilus* dans le miel. D'autres études ont démontré la possibilité de détecter et d'isoler les bactéries différentes espèces de lactobacilles à partir de miels par l'utilisation des milieux MRS supplémenté de 0,1% de cystéine et 2% de fructose, MRS supplémenté de 1% de glucose, milieu de jus de tomate additionné de 1% glucose, jus de tomate à 0.8 % de CaCO₃ (Aween *et al.*, 2012; Olofsson *et al.*, 2014 ; Mounia *et al.*, 2018 ; Homrani *et al.*, 2019). Les milieux MSS ; TDY sont également connu pour la culture et l'isolement des lactobacilles.

III-3 Techniques d'identification des lactobacilles

III-3-1-1 Méthode conventionnel d'identification (caractérisation phénotypiques)

L'identification phénotypique repose sur des méthodes traditionnelles de microbiologie, dites pasteurienne. L'identification et le dénombrement des micro-organismes se font sur des critères morphologiques des colonies (forme, taille, pigmentation) et la morphologie observée au microscope (forme, réaction de Gram, disposition en L et flagelles) (Payet, 2017). De plus, il comprend également des tests physiologiques (croissance à différentes températures, différentes valeurs de pH et concentrations en sel), des tests métaboliques/biochimiques (recherche de la catalase, courbe de fermentation du sucre, recherche d'enzymes spécifiques, etc.) après isolement et culture sur boîtes de Pétri ou en milieux liquides (Juzan *et al.*, 2012). La technique consiste en la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis à vis de ceux d'une souche de référence. Ces méthodes donnent seulement une identification au niveau du genre pour les lactobacilles et sont souvent difficile à réaliser au niveau de l'espèce, en raison du très grand nombre d'espèces existantes. L'identification au niveau de l'espèce repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres, dont la galerie API 50 CH avec l'utilisation du milieu pour lactobacilles, est la méthode biochimique la plus utilisée et probablement la plus fiable (Roissart et Luquet, 1994 ; Ozgun et Vural, 2011).

III-1-2 Méthode moléculaire d'identification (protéomiques et génotypiques)

Les méthodes moléculaires sont basées sur l'identification protéomique ou génotypique.

Chapitre III : Identification de lactobacilles isolés à parti de miels

III-1-2-1 Méthodes d'identification protéomiques

La protéomique consiste à étudier (identifier, caractériser et quantifier) l'ensemble des protéines « protéome » d'un organisme, d'un fluide biologique, d'un organe, d'une cellule ou même d'un compartiment cellulaire (Payet ; 2017). La bactérie est constituée à 55% de protéines et donc possède un protéome. L'analyse protéomique se compose de trois étapes :

- 1) Séparation des protéines contenues dans l'échantillon biologique étudié par électrophorèse bidimensionnelle (E-2D).
- 2) Traitement et mise en image de la séparation protéique permettant l'établissement d'une carte protéique.
- 3) Spectrométrie de masse, notamment la technique MALDI-TOF.

III-1-2-2 Méthode de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physique et chimique utilisée pour détecter, identifier et quantifier des molécules d'intérêt en mesurant la masse. Le principe est que les molécules chargées (ions) subissent une séparation en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z).

Le spectromètre de masse se compose d'une chambre d'ionisation, d'un analyseur pour séparer les ions et d'un détecteur d'ions. Il est nécessaire pour cette méthode de choisir la variété de procédés d'ionisation et de séparation en fonction de divers facteurs (la volatilité, la stabilité thermique, la capacité d'ionisation, la taille, la quantité et l'état physique (gaz, solide, liquide) de la molécule à étudier). L'identification MALDI-TOF est réalisée sur les colonies d'intérêt isolées du milieu de culture. Pour commencer, des cônes doivent être utilisés pour retirer les colonies à identifier et placés sur une plaque en métal ou en plastique (y compris à plusieurs endroits, appelés spots). Le dépôt est ensuite séché finement et régulièrement. La première étape critique du processus d'identification est la désorption/ionisation douce de la protéine dans l'échantillon. Cette étape est réalisée à l'aide d'une matrice et d'un laser, et est appelée MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). La matrice photosensible (par exemple l'acide -cyano-4-hydroxycinnamique) est reconstituée dans un mélange généralement composé d'eau, de solvant organique (acétonitrile) et d'acide trifluoroacétique. Il est ensuite déposé sur place et co-cristallisé avec l'échantillon sous évaporation. La plaque est introduite dans le spectromètre, où un laser (généralement un laser à azote avec une longueur d'onde de 337 nm) va exciter les molécules de la matrice photosensible, généralement par transfert de protons de la matrice à l'échantillon et désorption (passage en phase gazeuse) de l'échantillon (Martin ; 2020).

Chapitre III : Identification de lactobacilles isolés à parti de miels

Les principaux spectromètres de masse actuellement utilisés sont les automates Microflex (Bruker, Allemagne) et Vitek-MS (BioMérieux, France). (Martin ; 2020)

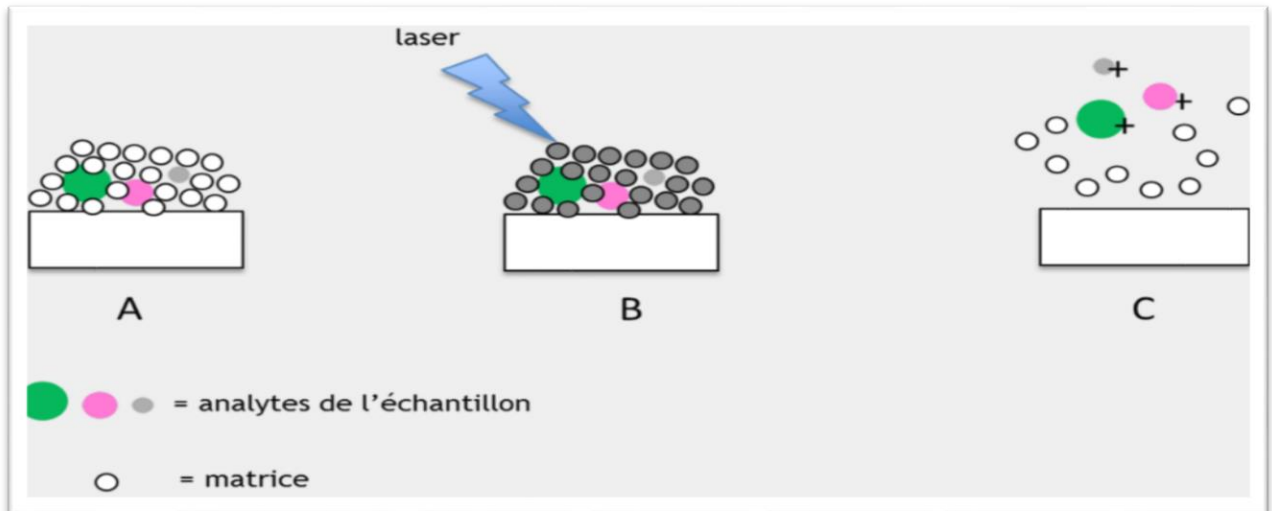


Figure 12 : Principe de la désorption-ionisation laser assistée par matrice. A. Cocrystallisation de l'échantillon et d'une matrice photosensible sur la plaque MALDI ; B. Excitation des molécules photosensibles de la matrice par un laser ; C. Ionisation et désorption de l'échantillon (Martin, 2020).

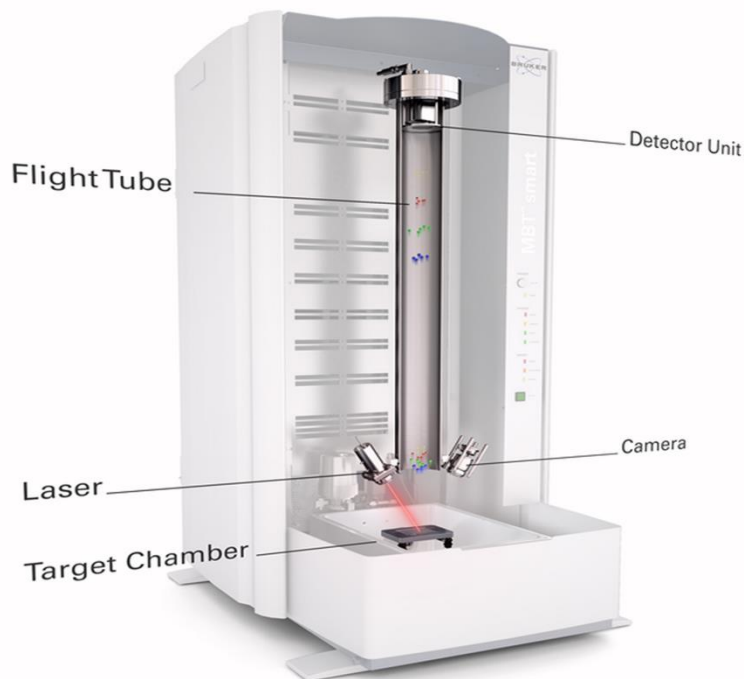


Figure 13 : MALDI-TOF Microflex LT/SH Smart (Bruker)

Chapitre III : Identification de lactobacilles isolés à parti de miels

III-1-2-2 Méthodes d'identification génotypique

Chaque espèce possède dans son génome au moins une séquence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) qui lui est propre et qui la distingue des autres espèces. L'identification génotypique fait appel à des techniques fondées sur l'étude, la détection et la modification de ces séquences. En microbiologie, ces techniques permettent d'étudier, de classer et d'identifier les micro-organismes. Ainsi, l'identification génotypique présentent un bénéfice lié à un gain de sensibilité, de spécificité, de temps et une détection d'organismes morts ou difficilement cultivables (Chardin ; 2006).

Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S et l'hybridation quantitative ADN/ADN sont les méthodes les plus utilisées pour l'identification des lactobacilles. Les méthodes de typage des souches deviennent de plus en plus importantes dans l'étude des bactéries. Les méthodes génotypiques utilisées pour le typage comprennent le ribotypage, le profil plasmidique et les méthodes de typage (empreintes digitales) basées sur PCR telles que les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic- Polymerase Chain Reaction) (Prescott et al., 1995). Il existe également d'autres techniques comme composition en base de l'ADN : G+C%, l'analyse des fragments de restriction de l'ADN par l'électrophorèse en champ pulsé (R-ECP).

Partie II

Etude

expérimentale

Article: Antibacterial activity of Lactobacilli detected in Algerian raw honeys against gram-negative bacteria

Homrani Mounia¹, Dalache Fatiha^{1,2}, Bouzouina Mohammed³, Nemmiche Said¹, Homrani AbdelKader¹

Corresponding Author: Email: mounia-homrani@hotmail.fr Telephone : +213 5 59 18 51 96

Résumé :

Cette étude rapporte l'isolement de lactobacilles à partir de quatre (n=04) miels crus typiques d'*Apis Mellifeca* collectés dans différentes régions d'Algérie et l'évaluation de leurs activités antibactériennes contre les bactéries Gram-négatives. L'isolement des lactobacilles a été réalisé en utilisant différents milieux. Les isolats ont d'abord été identifiés par test de catalase, coloration de Gram et morphologie cellulaire, et confirmés par MALDI-TOF-MS. Les activités antibactériennes des cultures bactériennes de lactobacilles sélectionnés et de leurs surnageants ont été testées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Un total de dix-huit (n=18) bactéries isolées d'échantillons de miel ont été présumément identifiées comme étant des *Lactobacillus spp.* Sur la base de leurs réactions Gram positives, de l'absence de catalase et de leur forme de bâtonnet. L'identification MALDI-TOF MS a confirmé que tous les isolats étaient classés dans le genre *Lactobacillus*, mais les résultats pour leur espèce n'étaient pas concluants avec une incertitude entre *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus paraplantarum*. Les isolats présentaient une activité antimicrobienne avec des diamètres de zone d'inhibition allant de $11 \pm 1,41$ mm à $17,5 \pm 0,71$ mm. 6 sur 11 surnageants de lactobacilles ont démontré une activité inhibitrice contre toutes les bactéries cibles. Cette étude révèle l'existence de lactobacilles dans les Miels bruts algériens. Ces lactobacilles possèdent des propriétés antibactériennes contre les bactéries Gram-négatives, souvent responsables d'infections humaines, et peuvent être un substitut favorable aux antibiotiques.

Mots clés : Miels bruts algériens ; Activité antibactérienne ; Lactobacilles ; MALDI-TOF/MS

Introduction

Produit par les abeilles à partir de nectars de fleurs ou d'exsudats d'arbres et de plantes, le miel est considéré comme une substance naturelle, saine et propre. Le traitement des infections microbiennes avec du miel remonte à l'Antiquité. Les propriétés antimicrobiennes du miel sont multiples, principalement liées à la capacité de générer du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme glucose oxydase, un pH naturellement bas et une osmolarité élevée due à la forte teneur en sucre, principalement en fructose et glucose (Rani *et al.*, 2017). Malgré les nombreux facteurs inhibiteurs, le miel n'est pas stérile (Róžańska ; 2011). Les principales communautés microbiennes associées au miel sont liées au tube digestif des abeilles, qui possèdent des micro-organismes naturels et des sources de collecte de matières telles que le nectar, le pollen et la propolis, l'air, les fleurs et l'environnement à l'intérieur de la ruche (Silva *et al.*, 2017) . Plusieurs souches de bactéries lactiques (LAB) ont été isolées à partir d'échantillons de miel et d'abeilles mellifères (Lee *et al.*, 2008 ; Iburguren *et al.*, 2010 ; Tajabadi *et al.*, 2013 ; Sinacori *et al.*, 2014). Ils sont généralement reconnus et leur confèrent le statut GRAS « Généralement reconnus comme sûrs » et exploités comme probiotiques conférant des bienfaits pour la santé de l'hôte (Yang *et al.*, 2012). Le genre *Lactobacillus* est le plus grand groupe parmi le groupe des bactéries lactiques, qui comprend plus de 110 espèces répertoriées (Darsanaki *et al.*, 2012). Ils sont caractérisés par des bâtonnets à Gram positif, anaérobies mais aéro-tolérants, non sporulants et catalase négatifs (Agaliya et Jeevaratnam, 2013).

Actuellement, l'étude des espèces de lactobacilles provenant de diverses sources naturelles suscite un intérêt croissant. Les lactobacilles jouent un rôle important dans le tractus gastro-intestinal humain et animal. De plus, ils représentent l'un des principaux groupes impliqués dans la fermentation souhaitable et contribuent à la conservation des aliments (Pisano *et al.*, 2014). De nombreuses recherches ont démontré les propriétés antimicrobiennes de *Lactobacillus* spp contre un large éventail de micro-organismes, y compris les aérobies et les anaérobies, les Gram-positifs et les Gram-négatifs (Chowdhury *et al.*, 2013 ; Dasari *et al.* 2014 ; Davoodabadi *et al.*, 2015 ; Xing *et al.*, 2017). L'augmentation des agents pathogènes multirésistants, due à la surutilisation des antibiotiques en médecine humaine et à son utilisation intensive dans l'industrie animale, nécessite la recherche de nouvelles alternatives aux antibiotiques (Tang *et al.*, 2017). En raison de leur capacité à produire des bactériocines, les lactobacilles ont suscité un intérêt substantiel en tant que médicaments naturels et nouveaux antimicrobiens (Prestinaci *et al.*, 2015).

Par conséquent, le but de cette étude est d'isoler des bactéries du genre *Lactobacillus* à partir de quatre (n=4) divers miels algériens. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne de ces isolats a été évaluée contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Matériel et méthodes

I- Échantillonnage

Entre avril et août 2015, quatre (n=4) échantillons de miel brut typiques d'*Apis Mellifera*, ont été collectés dans des conditions aseptiques, dans différentes régions d'Algérie (Figure 1), (Tableau 7). Tous les échantillons de miel ont été prélevés dans des bouteilles stériles et conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

Tableau 7 : Région, Localité, saison de récolte, et la localisation géographique des miels Algériens.

Sampls n°	Region	Locality	Harvesting Season	Geographic location
01	Medea	Moudjbar	Summer	34°28'0" North, 3°25'0" Est
02	Mostaganem	Sirat	Spring	35° 46' 48" North, 0° 11' 31" Est
03	Souk-Ahras	Ouled-Driss	Summer	36°21'0" North, 8°1'0" Est
04	M'Sila	Bou-Saâda	Summer	35° 13' 09" North, 4° 10' 54" Est

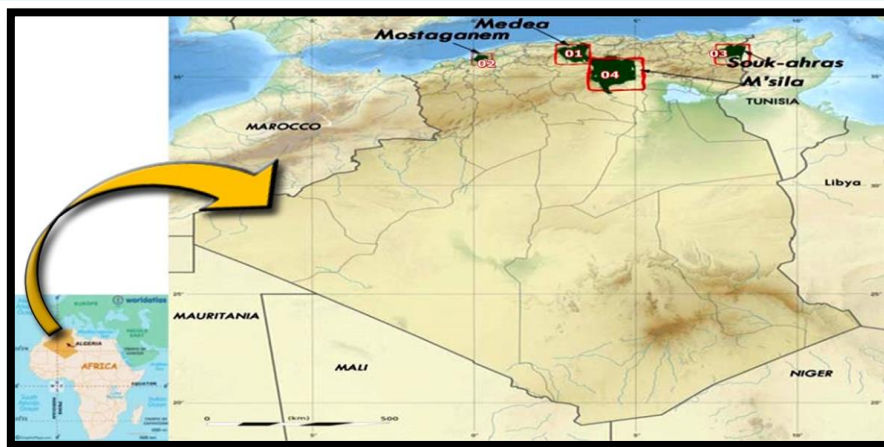


Figure 14 : Carte montrant les zones et les régions de collecte d'échantillons de miel

I- Isolement des lactobacilles à partir de miels

Un aliquote de 10 g de chaque échantillon, pesé aseptiquement, a été mis en suspension dans un sac stérile contenant 90 ml de solution saline peptonée stérile à 0,1 % additionnée de Tween 80 (0,9 % p/v NaCl, 0,1 % p/v Tween 80, 0,1 % p/v de peptone), puis homogénéisé pendant 3 minutes à l'aide d'un broyeur homogénéisateur (Stomacher). Un pré-enrichissement a été réalisé par incubation à 30°C un tube à essai, contenant chacun 9 ml de bouillon MRS et 1 ml de la solution de miel, préalablement préparé. Après croissance, une série de dilution avec de l'eau peptonée (0,1% p/v), allant de 10^{-1} - 10^{-5} , a été réalisée. Chaque suspension (0,1ml) a été, ensuite, prélevée et étalée à

l'aide d'un râtelier sur différents Milieux : MRS Agar (De Man *et al.*, 1960), MRS Agar supplémenté de CaCO₃ 0,8%, MRS Agar supplémenté de L-cystéine 0,1% et Fructose 2% et le milieu Rogosa. Toutes les boîtes de Pétri ont été incubées dans des conditions d'anaérobies à 37°C, pendant 48 heures. L'isolement a été entrepris à partir de miel frais dont la date de récolte est comprise entre 7 et 15 jours.

II- Pré-identification (screening)

Après incubation, des colonies de différentes morphologies ont été sélectionnées selon des critères phénotypiques à savoir, examen de l'aspect macroscopique des colonies, coloration de Gram et l'activité de la catalase. En se référant aux caractéristiques connues du manuel de Bergey de Bactériologie systématique (Hensyl, 1994), Seules les bactéries présentant un aspect typique des colonies de bactéries lactiques, négative pour la catalase, positive pour la coloration de Gram et de forme bâtonnet ont été retenues pour la suite de notre travail. Ces bactéries ont été présumées faisant partie du genre *Lactobacillus*.

II-1 Analyse macroscopique

Il s'agit d'une observation à l'œil nu des colonies sur la surface des milieux MRS agar ; caractérisation de la forme, la taille, le contour et la couleur (Badis *et al.*, 2005). Seules les colonies présentant un aspect typique des bactéries lactiques ont été sélectionnées.

II-2 Test de catalase

Il consiste à mettre sur une lame stérile une goutte d'eau oxygénée (3%), dans laquelle sera dissociée une colonie d'une souche définie. Cette dernière est dite catalase positive (possède l'enzyme catalase) s'il y a formation de bulles d'air, alors que le contraire indique qu'elle est catalase négative (Marchal *et al.*, 1991).

II-3 Coloration de Gram

Elle permet de différencier les bactéries à Gram⁺ de celle à Gram⁻, et d'apporter des renseignements sur leurs formes et leur mode d'association. Sur chacune des lames, sur lesquelles les souches sont fixées, quelques gouttes de violet de gentiane ont été déposées et laissées agir pendant 1min. Après rinçage à l'eau, du Lugol a été déposé pendant 1mn pour le mordantage, suivi d'une décoloration par l'alcool 95° pendant 30s et rinçage. Enfin, un deuxième colorant (fushine de Ziehl) a été déposé pendant 30s (Larpent et Larpent, 1990). Après le dernier lavage et séchage des lames, l'observation a été réalisée au microscope optique (x 100) avec l'utilisation de l'huile d'immersion.

II-4 Purification et conservation des isolats

Les isolats obtenus après sélection ont été purifiés par des repiquages successifs sur milieu MRS agar jusqu'à l'obtention de colonies homogènes, pur et bien distinctes, puis conservés dans du lait écrémé reconstitué stérile (12,5 % W/V) additionné de 30 % de glycérol pour une analyse plus approfondie.

III- Identification par spectrométrie de Masse de type « MALDI-TOF/MS »

Les isolats sélectionnés ont été identifiés par MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time Of Flight, Mass Spectrometry), en utilisant le système Vitek MS (Biomérieux, la Balme, France). La procédure a été effectuée selon les instructions du fabricant. En bref, une partie fraîche de la colonie cultivée sur gélose au sang a été étalée sur une lame cible Vitek MS-DS et immédiatement recouverte de 1 L de solution matricielle. Les spectres de suspension bactérienne ont été réalisés à l'aide du spectromètre de masse Vitek-MS et les résultats d'identification microbienne ont été réalisés par le logiciel MYLA (Biomérieux, France).

IV- Evaluation de l'activité antibactérienne des lactobacilles isolés à partir de miel

1- Souches bactériennes

Deux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), fournies par le laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem, ont été utilisées comme micro-organismes indicateurs pour les tests d'activité antibactérienne.

2- Activité antibactérienne des cellules bactériennes de lactobacilles sélectionnés

La méthode de double couche décrit par Fleming et al. (1975) a été utilisée pour déterminer l'activité antibactérienne des isolats de *Lactobacillus*. Ce test consiste à ensemencer en touche un volume de 20 µl de la culture fraîche, de 18 heures de chaque bactérie lactique, sur une gélose MRS. Les boîtes ont été laissées à la température ambiante pour permettre aux spots de se dessécher, avant de les incuber à 37°C pendant 24 heures. En parallèle, une culture fraîche de bactérie pathogène à tester a été préparée dans 9 ml du bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 18 heures. Après incubation, 8 ml de gélose molle nutritive (1% Agar) ont été inoculés par 100 µl de la souche pathogène. Puis, le mélange a été ensuite coulé dans les boîtes pré-incubées. Les boîtes ont été incubées à 37°C / 24 heures une deuxième fois. L'activité antibactérienne est révélée par l'apparition de zones claires autour des spots. Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré en millimètre.

3- Activité antibactérienne du surnageant des lactobacilles sélectionnés

La méthode des puits a été utilisée pour déterminer l'activité antibactérienne des surnageants d'isolats de *Lactobacillus* selon Barefoot et Kaenhammer (1983). Les isolats, de bactéries lactiques précédemment, sélectionnés ont été cultivés dans le milieu MRS liquide et incubés pendant 18 heures. Après incubation, la culture bactérienne a été centrifugée (6000 rpm/20 mn) et le surnageant a été récupéré. Dans une boîte de Pétri contenant du MRS solide etensemencée en masse par la souche test (pathogène), des puits ont été creusés avec un emporte pièces et sellés par 10 µl de gélose MRS. Les puits recevront 100 µl de surnageant de la souche lactique et les boîtes ont été incubées pendant 24 à 48 heures. Les puits entourés d'une zone claire dans la nappe de culture de la souche test ont été considérées comme comportant des substances antimicrobiennes. La taille des zones d'inhibition produites a été mesurée en millimètres.

Résultats et discussion

I- Résultats

1- Isolement des lactobacilles du miel

Plus de 100 colonies ont été prélevées et testées pour la coloration de Gram, la morphologie cellulaire et la réaction de catalase. Un total de 18 (n = 18) bactéries isolées à partir d'échantillons de miel, détecté dans trois milieux différents MRS-CaCO₃, MRS-Fructose+Cystéine agar et Rogosa agar ont été présumé appartenant au genre *Lactobacillus* sur la base de leurs réactions de Gram positives, de l'absence de catalase et de leur forme bacillaire (tableau 8).

Après un pré-enrichissement d'échantillons de miel dans du bouillon MRS suivi d'un ensemencement en masse sur quatre milieux sélectifs (MRS, MRS-CaCO₃, MRS-Fructose+ cystéine et Rogosa) une croissance des colonies a été observée (Figure 15).

Tableau 8 : Isolement de lactobacilles à partir de miels algériens à l'aide de différents milieux

Samples n°	<i>Lactobacillus</i> code	Gram stain	Catalase test	Cell morphology	Media
01	Lb92	+	-	Rods	MRS-CaCO ₃
02	Lb47	+	-	Rods	MRS-CaCO ₃
	Lb3	+	-	Rods	MRS- CaCO ₃
	Lb35	+	-	Rods	Rogosa
	Lb38	+	-	Rods	Rogosa
	Lb40	+	-	Rods	Rogosa
	Lb44	+	-	Rods	MRS-CaCO ₃
03	Lb49	+	-	Rods	MRS- Fructose+Cysteine
	Lb119	+	-	Rods	Rogosa
	37r07	+	-	Rods	Rogosa
	Lb12	+	-	Rods	Rogosa
	Lb29	+	-	Rods	Rogosa
	Lb65	+	-	Rods	MRS-CaCO ₃
	Lb66	+	-	Rods	MRS-CaCO ₃
	Lb67	+	-	Rods	Rogosa
04	L84	+	-	Rods	Mrs-CaCO ₃
	Lb116	+	-	Rods	Mrs-CaCO ₃
	Lb32	+	-	Rods	Rogosa

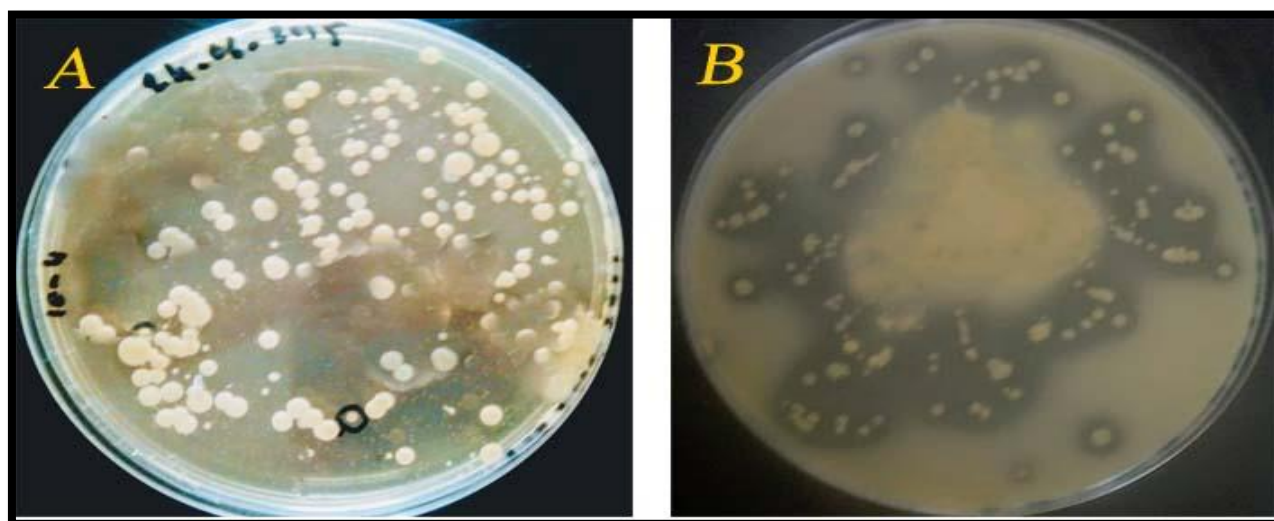


Figure 15 : Isolement de *Lactobacillus* à partir de miels algériens à l'aide de différents milieux

A : croissance des colonies, après pré-enrichissement du miel 1 en bouillon MRS suivi d'un étalement sur gélose MRS et incubation à 37 °cf ou 48 h, B : croissance des colonies, après pré-enrichissement du miel 2 en bouillon MRS suivi d'un étalement sur Gélose MRS-CaCO₃ et incubation à 37°C pendant 48 h.

2- MALDI-TOF MS identification des isolats

Les présumés lactobacilles ont été identifié par MALDI-TOF MS en utilisant le système VITEK MS. Les résultats ont confirmé que tous les isolats appartiennent au genre *Lactobacillus*, mais l'identification des espèces n'a pas été concluante avec une incertitude de 99.9% entre les trois

espèces suivantes : *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus paraplantarum*, (tableau 9). Les identifications Vitek MS (c'est-à-dire au niveau de l'espèce, au niveau du genre ou aucun résultat) étaient basées sur le niveau de confiance. Chaque fois que le logiciel fournit une identification avec un seul choix, une valeur de confiance acceptable peut aller de 60 à 99,99%. Deux résultats ou plus avec le même genre mais plusieurs espèces ont été considérés comme acceptables pour l'identification du genre uniquement.

Tableau 9 : Identification MALDI-TOF des isolats

Code LB	Maldi-tof identification	confidence value (%)
Lb92	<i>Lb. Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb47	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb3	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb35	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb38	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb40	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb44	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb49	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb119	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
37r07	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb12	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb29	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb65	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb66	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb67	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
L84	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb116	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9
Lb32	<i>Lb.Pentoses-Lb.plantarum-Lb.paraplantarum</i>	99.9

Lb.Pentoses: *Lactobacillus pentosus*., *Lb.plantarum*: *Lactobacillus plantarum*.,; *Lactobacillus paraplantarum* : *Lb. paraplantarum*.

3- Evaluation de l'activité antibactérienne des lactobacilles isolés à partir de miels.

L'activité antimicrobienne *in vitro* de 11 lactobacilles sélectionnés isolés à partir de quatre miels algériens sur des souches à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) a été testée et comparée. Pour cela, nous avons utilisé la méthode des touches sur milieu gélosé et les résultats exprimés en taille (mm) de la zone d'inhibition autour des touches sont présentés dans le tableau 10. Les données obtenues ont démontré que toutes les cultures bactériennes présentent un effet antimicrobien. Ils ont produit des zones d'inhibition de différents diamètres allant de $12,5 \pm 0,71$ - $17,5 \pm 0,71$ mm (*E. coli*) et $11 \pm 1,41$ - $15 \pm 0,82$ mm (*P. aeruginosa*).

Tableau 10 : Activité antibactérienne des cultures bactériennes de lactobacilles isolés de miels algériens contre les bactéries Gram-négatives en termes de ZDI en utilisant la méthode des taches d'agar.

<i>Isolats de Lactobacillus</i>	Zone diameter of inhibition (mm)	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Lb92	13.67 ± 1.15	12 ± 1.73
Lb47	17.5 ± 0.71	0.58 ±
Lb3	13 ± 1	14.67 ± 1,73
Lb35	16 ± 1.41	14 ± 1.41
Lb38	12.5 ± 0.71	15 ± 0.82
Lb44	17 ± 1.41	13 ± 1.41
Lb12	14 ± 1	14 ± 1.41
Lb29	14.67 ± 0,58	13.33 ± 1.53
Lb65	14 ± 1	11 ± 1.41
Lb66	13.67 ± 0.58	13 ± 1.73
Lb67	13 ± 1.41	14.67 ± 0.58

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions ± écart type ZDI : diamètre de la zone d'inhibition ; (-) : pas d'inhibition ; ATCC : Collection de culture type américaine

Les surnageants cellulaires de lactobacilles sélectionnés ont été testés contre les bactéries Gram-négatives en utilisant la méthode de gélose à diffusion de puits et les résultats ont été résumés dans le tableau 11. Six (n=6) sur 11 surnageants de lactobacilles testés (Lb92, Lb47, Lb03, Lb38, Lb12, Lb67) a démontré une activité inhibitrice contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les diamètres moyens des zones d'inhibition allaient de 6 ± 1,73 à 11 ± 1,41 mm (*E. coli*) et de 5,5 ± 0,71 à 11 ± 1,41 mm (*P. aeruginosa*).

Tableau 11 : Activité antibactérienne des surnageants d'isolats de *Lactobacillus* contre les bactéries Gram-négatives, en termes de ZDI en utilisant la méthode de diffusion en puits d'agar.

<i>Surnageant de Lactobacillus</i>	Diamètre de Zone d'inhibition (mm)	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Lb92	11 ± 1,41	7 ± 1.41
Lb47	6 ± 1.73	7 ± 1,41
Lb3	8.33 ± 0,58	08.67 ± 1.15
Lb38	9.33 ± 1.15	09.67 ± 0.58
Lb44	-	-
Lb12	10.67 ± 1.15	11 ± 1.41
Lb29	-	-
Lb65	-	-
Lb66	-	-
Lb67	06 ± 1.41	5.5 ± 0.71

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions ± écart type. ZDI : diamètre de la zone d'inhibition ; (-) : pas d'inhibition ; ATCC : Collection de culture type américaine

II- Discussion

La présente étude confirme la présence des bactéries du genre *Lactobacillus* dans les miels algériens et la possibilité de les isoler. Ceci est en accord avec l'étude de Ruiz et Rodriguez, (1975) qui ont signalé la présence de *Lactobacillus spp* dans le miel.

Les bactéries présentes dans le miel brut ne sont pas capables de se multiplier et de perdre leur viabilité avec le temps. Un pré-enrichissement en bouillon MRS pendant 24 heures permet de régénérer les lactobacilles présents dans les échantillons de miels et favorise leur croissance. La détection de ces lactobacilles dans des échantillons de miel prouve leur capacité à survivre dans des produits à forte teneur en sucre, à faible activité de l'eau et à faible pH.

La majorité des lactobacilles isolés ont été détectés dans le miel de la région du souk ahras dont cinq isolés sur le milieu Rogosa ; deux sur MRS-Fructose + Cysteine, un sur MRS-CaCO₃ et miel de la région de M'sila dont quatre isolés sur MRS-CaCO₃ et quatre sur Rogosa. Un seul lactobacille a été détecté et isolé sur milieu MRS-CaCO₃ dans chacun des deux miels de la région de Mostaganem (6 %) et de Médéa (6 %). Aucune croissance de lactobacille n'a été détectée sur MRS.

La variation des nombres de lactobacilles détectés dans différents types de miels pourrait être attribuée à la source et à la quantité de nectar, à l'utilisation d'antibiotiques en apiculture, à la qualité du miel (propriétés du miel), à la durée de stockage, aux abeilles et à leur environnement. (Tajabadi *et al.*, 2013 ; Kňazovická *et al.*, 2015 ; Olofsson *et al.*, 2016 ; Mathialagan., 2018). Selon (Kňazovická *et al.*, 2015) la quantité de micro-organismes dans le miel est variable et unique à l'échantillon de miel analysé. L'isolement des lactobacilles des miels par des milieux conventionnels, comme le MRS, couramment utilisé pour la plupart des produits alimentaires (fermentés), est difficile à réaliser en raison de la forte concentration en sucres limitant ainsi la détection de ces bactéries. L'utilisation de MRS supplémenté en CaCO₃, fructose et L-cystéine et milieu Rogosa permet la détection et l'isolement des lactobacilles. Le nombre élevé de *Lactobacillus sp* détectés à partir du milieu MRS-caco₃ et Rogosa lors de ces expériences, démontre leur capacité, à isoler les lactobacilles des miels.

L'identification microbienne par la méthode MALDI-TOF MS repose sur la génération d'un spectre de masse spécifique à un organisme ou « empreinte protéique » examiné par rapport à une base de données de référence pour permettre l'identification de l'organisme (Ghotbi *et al.*, 2011). Dans cette étude, l'identification MALDI-TOF MS des isolats n'a pas permis de différencier les spectres de *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, et *Lb. paraplantarum*, indiquant la nécessité de tests supplémentaires ou l'utilisation d'une autre méthode, comme le séquençage du gène de l'ARNr 16S,

Etude expérimentale

pour une différenciation définitive. Hasali *et al.*, 2015 ont signalé la présence de *Lb. brevis* dans le miel de méliponine, tandis que Aween *et al.*, 2012 ont détecté *Lb. acidophilus* dans les miels malaisien, libyen et saoudien. Dans des études précédentes, (Bulgasem *et al.*, 2016) a détecté *Lb. plantarum*, *Lb. Cuvatus*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* dans 10 des 15 échantillons de miel. Les différentes espèces de *Lactobacillus*, détectées dans le miel, peuvent provenir de l'estomac des abeilles mellifères et varient en fonction de la source de nectar, de la santé des abeilles et de la présence d'autres micro-organismes (Olofsson *et al.*, 2016).

P. aeruginosa et *E. coli* font partie des principales bactéries multirésistantes et font partie de la catégorie des agents pathogènes communautaires et hospitaliers (Matta *et al.*, 2018). L'inefficacité des traitements médicaux existants a nécessité la recherche de nouvelles alternatives naturelles efficaces pour s'attaquer à ce problème.

Dans cette étude, toutes les cultures bactériennes de lactobacilles sélectionnés, isolés de quatre miels algériens ont montré un effet inhibiteur contre les espèces à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). La zone d'inhibition la plus élevée a été enregistrée par lb47 isolé du miel de Mostaganem ($17,5 \pm 0,71$ mm) et lb44 isolé du miel de Souk-ahras ($17 \pm 1,4$ mm), contre *E. coli*. Des activités minimales ont été observées contre *E. coli* et *P. aeruginosa* dans lb38 ($12,5 \pm 0,71$ mm) et lb65 ($11 \pm 1,41$ mm), respectivement (Lashani *et al.*, 2018) ont rapporté que *Lb. plantarum* et *Lb. paracasei* isolé de miels iraniens a eu de merveilleux effets inhibiteurs contre *S. aureus*. (Hasali *et al.*, 2015) ont découvert que des souches de lactobacilles isolées du miel de méliponine de *Heterotrigona itama* présentaient une activité antibactérienne significative contre *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* et pouvaient être appliquées dans les industries alimentaire et pharmaceutique. Piccart *et al.*, (2016) ont testé 13 bactéries lactiques (espèces *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) isolées du miel et des abeilles mellifères contre la mammite bovine et ont observé que la synergie entre les bactéries lactiques et le miel était capable d'inhiber la croissance des bactéries qui causent la mammite inflammatoire ; même ceux qui étaient résistants à d'autres antibiotiques.

En outre, dans les résultats de la présente étude il a également été établi que le surnageant de six lactobacilles montre une activité inhibitrice lorsqu'il est évalué par la méthode des puits. L'activité antibactérienne la plus élevée a été obtenue avec le surnageant de Lb92 ($11 \pm 1,41$ mm) et lb12 ($11 \pm 1,15$ mm) contre *E. coli*. Le surnageant de lb12 montre une plus grande inhibition contre *P. aeruginosa* avec une zone d'inhibition de $11 \pm 1,4$ mm. Les résultats ont montré que six cellules de lactobacilles isolées de miels algériens lb 92 (Médéa), lb47 (Mostaganem), lb3 et lb67 (Souk-ahras),

Etude expérimentale

lb12 et lb67 (M'sila) et leur surnageant inhibent la croissance des bactéries à Gram négatif (*E. Coli* et *P. aeruginosa*). Les résultats de cette étude sont en accord avec les études précédentes d'Aween et al. (2010), qui ont démontré que les surnageants de *Lb. acidophilus* isolés de différentes sources de miels étaient efficaces contre les bactéries pathogènes à Gram négatif. Ils suggèrent le rôle possible des bactéries lactiques dans l'amélioration de l'activité antibactérienne du miel. Les propriétés antimicrobiennes du surnageant sont apportées par les métabolites tels que les acides organiques (acide lactique et acétique), le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol, le diacétyl, l'acétaldéhyde, l'acétoïne, le dioxyde de carbone, la reutéline, la reutéricycline et les bactériocines produites par les microorganismes LAB hydrogène (Adeniyi *et al.*, 2015, Abubakr, 2018).

Conclusion

La présente étude a révélé la présence de lactobacilles dans des échantillons de miel brut collectés dans différentes régions d'Algérie. L'identification par MALDI-TOF n'a pas été concluante. Elle a permis de confirmer l'appartenance de ces bactéries au genre *Lactobacillus* mais avec une incertitude entre trois espèces (*Lb. pentosus* - *Lb.plantarum* - *Lb.paraplantarum*). Six cultures de bactéries et leur surnageant ont une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-négatives. Ces lactobacilles pourraient produire des métabolites pouvant être utilisés pour inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, souvent responsables d'infections humaines et pouvant être un substitut favorable aux antibiotiques. Ce résultat est d'autant plus intéressant que les lactobacilles peuvent être utilisés comme probiotiques.

Conclusion

Conclusion

Le miel est une substance naturelle, très prisée en raison de ses propriétés nutritionnelles, énergétiques et curatives. Cependant, Ce produit pourrait également être utilisé comme source de microorganisme à effet bénéfique pour la santé. En effet ces dernières années plusieurs chercheurs se sont intéressés aux microorganismes bénéfiques du miel et notamment les bactéries du genre *Lactobacillus*. Des études ont démontré le pouvoir inhibiteur et probiotique de différentes espèces de lactobacilles détectées dans le miel. Ces microorganismes présents dans le miel frais, perdent leur viabilité avec le temps, mais certaines d'entre elles peuvent résister aux conditions de croissance difficiles intrinsèques du miel et survivre. Par ailleurs, l'effet inhibiteur du miel pourrait également être attribué en parti aux substances secrété par les lactobacilles associés à son microbiote.

L'article confirme la présence des bactéries du genre *Lactobacillus* dans les miels algériens frais collectés dans différentes régions d'Algérie, dont la date de récolte ne dépasse pas 15 jours. Ces lactobacilles pourraient produire des métabolites pouvant être utilisés pour inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, souvent responsables d'infections humaines et pouvant être un substitut favorable aux antibiotiques. Ce résultat est d'autant plus intéressant que les lactobacilles peuvent être utilisés comme probiotiques.

Références
bibliographiques

Références Bibliographiques

Abee, T., 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram+ bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129:1-9.

Abubakr M.A. S.2018. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Human Breast Milk Against Human Pathogenic Strains. *International Journal of Clinical and Developmental Anatomy.*, 4(1): 27-31.

Adams, M.R., Moss, M.O. 2000. Microbiology of primary food commodities. In *Food Microbiology* (pp. 121-160).

Adeniyi, B.A, Adetoye, A., Ayeni, F.A. 2015. Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *Afri Health Sci.*, 15 (3):888-895.

Agaliya, P.J., Jeevaratnam, K. 2013. Molecular characterization of *lactobacilli* isolated from fermented *idli* batter. *Braz J Microbiol.*; 44:1199–1206.

Anand, S., Pang, E., Livanos, G., & Mantri, N. 2018. Characterization of physico-chemical properties and antioxidant capacities of bioactive honey produced from Australian grown *Agastache rugosa* and its correlation with colour and poly-phenol content. *Molecules*, 23(1), 108.

Angela, R. N. C. P. 2012. *L. acidophilus* contributes to antimicrobial properties of honey. *J. Food Sci.*, 77, 364-371.

Apimondia-standing commission of apitherapy., 2001. *Traité d'Apithérapie, La médecine par les abeilles [cédérom]* v.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R Brussels. 2001 ISBN : 2-9600270-0-0.

Aween, M.M., Hassan Z., Muhialdin B.J., Eljamel Y.A., Al-Mabrok A.S., Lani M.N. 2012. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) gram-positive bacteria. *J Food Sci.* 77(7):M364–M371.

Axelsson, L., Salminen, vonwright, a., ouwehand, a.c.2004.(ed.) *Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects. 3rd edition.*: marceldekkerinc; new york.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. 2005. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DEDEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES" ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.

- Bahloul, H., Hadadji, M., Guessas, B., Saidi, N., Kihal, M. 2012.** Characterization and Technological Properties of Bifidobacterium Strains Isolated from Breast-fed Infants, *Journal of Food Science and Engineering* 2 (2012) 576-582.
- Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer.1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Applied Microbiol.*, 45(6): 1808-1815.
- Barinov, A., Bolotin, A., Langella, P., Maguin, E., Van De Guchte, M. 2011.** Genomics of the genus *Lactobacillus*, p 3–32. In Sonomoto K, Yokota A (ed), *Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research*, vol 1 Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Begum, SB., Roobia, RR., Karthikeyan, M., Murugappan, RM. 2015.** Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora. *LWT – Food Sci Technol*;60:743–750.doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.024. (7) (PDF) *Microorganisms in Honey*.
- Bogdanov, S., Bieri, K., Gremaud, G., Iff D., Kanzig, A., Seiler, K., Stockli, H., Zurcher K., 2003** - Produits Apicoles. 23 A Miel, 1-37.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persno-Oddo, L. 2004.** Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys : a review. *Apidologie*. 35 : 4-17.
- Boucif, O. 2017.** Etude comparative de la diversité floristique de trois stations de Remchi (Wilaya de Tlemcen) et estimation de la qualité du miel récolté. UNI de Tlemcen. Thèse de Master.pp52.
- Braun, M., Dotterl, S., Schlindwein, C., Gottsberger, G. 2012.** Can nectar be a disadvantage ? Contrasting pollination natural histories of two woody Violaceae from the Neotropics. *International Journal of Plant Sciences*. 173(2) : 161-171.
- Brooijmans, R. J. W., De Vos, W. M., & Hugenholtz, J. 2009.** *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3580-3585.
- Bulgasem, B.Y., Lani, M.N., Hassan, Z.,Wan Yusoff, W.M., Fnaish, S.G., 2016.** Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Natural Honey against Pathogenic Candida Species. *Mycobiology*. 44 (4): 302–309.
- Butler, E., Oien, R. F., Lindholm, C., Olofsson, T. C., Nilson, B. & Vasquez, A. 2014.** A pilot study investigating lactic acid bacterial symbionts from the honeybee in inhibiting human chronic wound pathogens. *Int. Wound J.*, 7-9.

- Butler, E., Oien, R. F., Lindholm, C., Olofsson, T. C., Nilson, B., Vasquez, A. 2014.** A pilot study investigating lactic acid bacterial symbionts from the honeybee in inhibiting human chronic wound pathogens. *Int. Wound J.*, 7-9.
- Carvalho, M.C., Rocha, A., Estevinho, L., Choupina, A.B. 2006.** Identification of honey yeast species based on RFLP analyses of the ITS region. *Cienc. Tecnol. Alimentos.* 5 (1), 11e17
- Chardin, H., Barsotti, O., Bonnaure-Mallet M. 2006.** Microbiologie en odontostomatologie. Paris : éditions Maloine
- Chick, H., Shin, H., & Ustunol, Z. 2001.** Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. *J. Food Sci.*, 66, 478-481.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., Grosch, R. 2013.** Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. *PLoS ONE* 8(7): e68818. doi.org/10.1371/journal.pone.0068818
- Clément, H. 2002.** *Guide des miels*. Paris, Rustica, 2002, 64 p.
- Codex Alimentarius, 2001.** Commission Standards, Codex Standards for Honey, (1981/ revised1987/revised 2001), FAO– Rome, 2001, 1-7.
- Coenye, T., Vandamme, P. 2003.** Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic bacteria as a test case. *Microbiol.*, 149, 3507-3517.
- Comenvi (Commission de l'environnement, de la sante publique et de la sécurité alimentaire). Décembre 2013.** RAPPORT sur la crise alimentaire, la fraude dans la chaine alimentaire et son contrôle (2013/2091(INI)) – 26 p.
- Conway, P. L., Stern, R. & Tran, L. 2010.** The Value-adding Potential of Prebiotic Components of Australian Honey. Barton, Australia: RIRDC Publication No. 09/0179.
- Corrieu, G. et Luquet, F. M. 2008.** *Bactéries lactiques*. Paris:éditiontecet Doc, 2008,p. 849.
- Darrigol, J.L.** Apithérapie : Miel, Pollen, Propolis, Gelée Royale. Dangles Ed. 2007, 271 P.
- Darsanaki, R.K., Laleh rokhi, M., Aliabadi, M.A., Issazadeh, K. 2012.** Antimicrobial Activities of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fresh Vegetables. *Middle-East Journal of Scientific Research*; 11 (9): 1216-1219.
- Dasari S, Shouri RND, Wudayagiri R, Valluru, L. 2014.** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* against microbial flora of cervicovaginal infections. *Asian Pac J Trop Dis.* 4: 18–24.

Références bibliographiques

- Dave, R., I. & Shah, N., P. 1998.** Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.*, 81, 2804-2816.
- Davoodabadi, A., Dallal, M.M.S., Foroushani, A.R., Douraghi, M., Yazdi, M.K.S., Harati, F.A. 2015.** Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe* 34:53–58
- De Rodriguez G.P., De Ferrer B.S., Ferrer and Rodriguez B.(2004).** Characterization of honey produced in Venezuela . *Food Chemistry*, 84 : 599-502
- De Roissard, H et Luquet, F.M. 1994.** Bactéries lactiques., *Lorica Uriage*.1, 25-116
- DeMan, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960.** A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 23, 130–135.
- Donadieu, y. 1984.** Toutes les thérapeutiques de ma pharmacie naturelle : les produits de la ruche. Lavoisier ed, p : 12.
- Doukani. K., Tabak. S., Derriche. A., Hacini. Z . 2014.** Étude physico-chimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement* 10: 37-49.
- Feng, J., Liu, P., Yang, X., Zhao, X. 2015.** Screening of immunomodulatory and adhesive *Lactobacillus* with antagonistic activities against *Salmonella* from fermented vegetables. *World J. Microbio. Biotechnol.* 31 : 1947-1954.
- Garrity, G.M., Holtj, G. 2004.** *Taxonomic outline of the archaea and bacteria bergey's manual of systematic bacteriology*. 2emeed. *Taxonomic outline of the archaea and bacteria bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. Vol.:springer, 2004.
- GHARBI, M. 2011.** Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles – Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d’emploi en médecine vétérinaire. Thèse. Vétérinaire. Univ. Claude Bernard. Lyon I. 247 p
- Ghotbi, M., Soleimani-Zad, S., Sheikh-Zeinoddin, M. 2011.** Identification of *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus plantarum* in Lighvan cheese with 4 month ripening period by means of *recA* gene sequence analysis. *Afr J Biotechnol* 10:1902-1906.
- GUARNER, Francisco, KHAN, Aamir G., GARISCH, James, et al.,** World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics october 2011. *Journal of clinical gastroenterology*, 2012, vol. 46, no 6, p. 468-481
- Guerriat, H. (2000).** « Etre performant en Apiculture ». Édition Rucher du Tilleul. 415p.

- Harris, S. 1994.** *Honey for the treatment of superficial wounds : acase report and review.*primary intention;p18-23.
- Hasali, N.H.M., Zamri, A.I., Lani, M.N., Mubarak, A., Suhaili, Z. 2015.** Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *AEJSA*. 9(6): 1-6.
- Hensyl, W.R., 1994.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich.
- Homrani M. 2020.** Caractérisation physico-chimique, spectre pollinique et propriétés biologiques de miels algériens crus de différentes origines florales. Thèse de doctorat. Univ abdelhamid ben badis Mostaganem. 253p.
- Homrani, M., Dalache, F., Bouzouina, M., Nemmiche, S., Homrani, AEK. 2019.** Antibacterial Activities of Algerian raw Honeys and Isolated *Lactobacillus* against Gram- negative Bacteria. : *Advances in bioreasearch*, 1(10). 31-39.
https://www.researchgate.net/publication/315374793_Microorganisms_in_Honey [accessed Oct 31 2021].
- Huchet, E., Coustel, J., Guinot, L. 1996.** *Les constituants chimiques du Miel- Méthodes d'analyses chimiques - Département Science de l'Aliment - Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.1, Avenue des Olympiades, 91744 Massy CEDEX – France*
- Hughenoltz, J., Kleerebezem, M., 1999.** Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(5), 492-497.
- Ibarguren, C., R.R. Raya, M.C. Apella and M.C. Audisio. 2010.** Enterococcus faecium isolated from honey synthesized bacteriocin-like substances active against different listeria monocytogenes strains. *J. Microbiol.*, 48(1): 44-52
- Jay, JM., Loessner MJ., Golden, DA. 2005.** Food poisoning caused by gram-positive spore-forming bacteria. *Mod Food Microbiol*, Boston, MA: Springer US; 2005, pp. 567–590. doi:10.1007/0-387-23413-6_24
- Jean-Prost P., Medori PA. 2005.** Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher : Editions Tec & Doc. Paris - 7e édition revue et complétée, par Yves Le Conte, 698 p.

- Juzan, L., Pernelle, J.J, Dabert, P. 2012.** Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées. Sciences Eaux & Territoires. (9)
- Kajiwara, K., Byrnes, A.P., Ohmoto, Y., Charlton, H.M., Wood, M.J, Wood, K.J. 2000.** Humoral immune responses to adenovirus vectors in the brain. *J Neuroimmunol* 103:8–15
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. 2005.** Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29 : 393–409.
- Kňazovická, V., Mederiová, B., Haščík, P., Trnková, M., Kačániová. 2015.** Quality evaluation of unifloral and multifloral honeys from slovakia and other countries.
- Koechler, S. 2015.** Le miel dans la cicatrisation des plaies : un nouveau médicament ? thèse en pharmacie, faculté de pharmacie université de lorraine, 2015, p67.
- Küçük M., Kolayli S., Karaolu S., Ulusoy E., Baltaci C, Candan F. (2007).** Biological activities and chemical composition of three honyes of different types of Anatolia. *Food Chemistry*, 100 :526-534.
- Larpent J.P. And Larpent G.M. 1990.** Mémento technique de microbiologie 2ème ed.technique et documentaire lavoisier, paris, p: 417.
- Lashani, E., Davoodabadi, A., Soltan Dallal, M.M. 2018.** Antimicrobial Effects of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Paracasei* Isolated from Honey against *Staphylococcus Aureus*. *J Babol Univ Med Sc.*, 20 (3): 44-49.
- Lazovskaya, A. L., Vorobyeva, Z. G., Slinina, K. N. & Kul'chitskaya, M. A. 2013.** Spore Probiotics in Agriculture. *Biol. Bull. Rev.*, 133, 133-140.
- Lee, H., Churey, J.J., Worobo, RW. 2008.** Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int J Food Microbiol.*, 126 (1-2):240–244.
- Lequet, L. 2010.** Du nectar a un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur. Thèse Med. Vét. Université Claude Bernard, Lyon, 195p.
- Louveaux, J. 1968.** L'analyse pollinique des miels, in *Traité biologique de l'abeille*, Tome 3. Édition Masson de Cie, Paris. Pp 324-361.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. 1978.** Methods of melissopalynology. *Bee World*.59(4) : 139-157
- Madras-Majewska, B., Halko, N. V., Rosiak, E., Ochnio, L., Ochnio, M., Halko, A. & Kuczyńska, B. 2016.** Assessment of microbiological quality of belorusian nectar honeys. *Biomics.*, 8, 40-47.

- Makhloufi, C., Jacob, D.K., Giancarlo, R.D, Ali, C., Riad, S. 2010.** Characterization of Algerian honeys by palynological and physico chemical methods, *Apidologie* 41 : 509-521.
- Mandal. MD., Mandal, S . 2011.**Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(2): 154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Marchal, N., Bourdon, J.L.et Richard, C.L. 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 3ème Ed., Doin éditeurs, Paris.
- Marchenay, P.H. 1988.** Miels, miellats, miellées. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 35^e année. p 121-146.
- Martin, E.C. 2020.** Identification des micro-organismes pathogènes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie médicale. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/identification-des-micro-organismes-pathogenes-par>
- Mathialagan,M., Edward, Y.J.T., David, P., Senthilkumar, M., Srinivasan M., S, Mohankumar. 2018,** Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees, *International journal of current microbiology and applied sciences*, 7: 894-906.
- Matta, R., Hallit, S., Hallit, R., Bawab, W., Rogues, A.M., Salameh, P. 2018.** Epidemiology and microbiological profile comparison between community and hospital acquired infections: A multicenter retrospective study in Lebanon; *J Infect Public Health*. 11(3): 405-411
- Mounia H, Dalache F, Bouzouina M, Nemmiche S, Homrani AEK. 2018.** Antibacterial activity of Lactobacilli detected in Algerian raw honeys against gram-negative bacteria. *SAJEB*, 3(8).
- Naseer, S, Khan, S.A., Azim, M.K. 2015.** Identification of cultivable bacteria from natural honey of different botanical origin. *Pak J Biochem Mol Biol*. 48 : 53–56.
- Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersenl., Kocha, G., Arneborg, N. 2008.** Occurrence and growth of yeasts in processed meat products -Implications for potential spoilage. *Meat Science*, vol. 80,p.919-926.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E.2007.** *Reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes*. *African health sciences*, p159-165.
- Olofsson, T.C, Vásquez, A. 2008.** Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honey bee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol*. 57:356–363.

Références bibliographiques

Olofsson, T.C., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, E., Vasquez, A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifera* sp. nov., *Lactobacillus mellissp.* nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera* *Int J Syst Evol Microbiol.* 64(9) : 3109-3119.

Olofsson, T.C., Butler, E., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L. & Vasquez, A. 2016. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal*, 13(5): 668-679.

Ozgun, D., Vural, H.C. 2011. Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *J.M.G.G.3* (3): 46-49.

Pajor, M., Worobo, R.W., Milewski, S., Szweda, P. 2018. The Antimicrobial Potential of Bacteria Isolated from Honey Samples Produced in the Apiaries Located in Pomeranian Voivodeship in Northern Poland. *International journal of environmental research and public health.* 15(9), 2002. doi:10.3390/ijerph15092002.

PAP-ENPARD-Algérie. 2019. Rapport final : mise en valeur des produits de l'apiculture locaux dans les wilayas Aïn Temouchent, Laghouat, Sétif et Tlemcen. Pp : 1-87.
<http://papenpardalgerie.com/>

Payet, S. 2017. Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique. *Chirurgie.* dumas-01694351.

Persano, Oddo L., Piana, L., Bogdanov, S., Bentabol, A., Gotsiou, P., Kerkvliet, J., Martin, P., Morlot, M., Ortiz, Valbuena A., Ruoff, K., Von Der Ohe, K. 2004a. Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie.* 35 : S82-S93.

Piccart, K., Vásquez, A., Piepers, S., De Vliegher, S., Olofsson T.C. 2016. Short communication: Lactic acid bacteria from the honeybee inhibit the in vitro growth of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 99(4) : 2940-2944.

Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., Deiana, M., Cosentino, S. 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. *Biomed Res. Int.* 286390: 1-9.

Poormontaseri, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, SS. 2014. Characterization of *Clostridium botulinum* spores and its toxin in honey. *Iran J Vet Res* 2014;15:36-39 (7) (PDF) *Microorganisms in Honey.* Available from:

Références bibliographiques

- Prescott, Harley et Klein.** 1995. Les microorganismes et l'environnement. Dixième partie. In : Microbiologie. Second edition. DeBoeck Wesmael S.A. Bruxelles. pp : 804-845.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C-M., Dusart. J.** 2003. Microbiologie. Deboeck.
- Prestinaci, F., Pezzotti P., Pantosti, A.** 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health.*; 109(7):309-318
- Raessi, A.M., Aslani, J., Raessi N., Gharaie H., Karimi, Z.A.A., Raessi, F.** 2013. Honey plus coffee versus systemic steroid in the treatment of persistent post-infectious cough : A randomised controlled trial. *Primary Care Respiratory Journal.* 22 : 325–330
- Rani, G.N., Budumuru, R., Bandaru, N.R.** 2017. Antimicrobial Activity of Honey with Special Reference to Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and MethiCillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). *J Clin Diagn Res.*, 11(8), DC05–DC08.
- Reille, M., Pons, A.** 1990. Leçons de palynologie et d'analyse pollinique. *Ecologia mediterranea.* 16 : 169-193.
- Rossant, A., Desmouliere, A.** 2011. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes, 132 p. Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges.
- Rozanska H.** 2011. Microbiological quality of polish honey. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 55 443–445.
- Rybka, S., & Flee, G., H.** 1997. Populations of *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *S. thermophilus* *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium* species in Australian yogurts. *Food Australia.*, 49, 471-479.
- Saraiva, M., Cunha, I.C., Conito, C.C., Pena, C., Toscano, M.M., Lopes, T.T., Sousa, I., Calhau, M.A.** 2012. First case of infant botulism in Portugal. *Food Control.* 26 :71–90.
- Shbee, R., Bignell, EM.** 2010. Pathogenic Yeasts. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-03150-2
- Silva, M.S., Rabadzhiev, Y., Eller, M.R., Iliev, I., Ivanova, I., Santana, W.C.** 2017. Microorganisms in Honey. In: Intech, editor. Honey Analysis: Toledo VA. p. 233-258
- Sinacori, M., Francesca, N., Alfonzo, A., Cruciatà, M., Sannino, C., Settanni, L., et al.** 2014. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiol*; 38:284–294. doi:10.1016/j.fm.2013.07.013.

Références bibliographiques

- Slacanac, V., Lucan, M., Hardi, J., Krstanovic, V. & Koceva Komlenic, D. 2012.** Fermentation of Honey-Sweetened Soymilk with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Bifidobacterium longum* Bb-46: Fermentation Activity of Bifidobacteria and *in vitro* Antagonistic Effect against *Listeria monocytogenes* FSL N1-017. *Czech J. Food Sci.*, 30, 321-329.
- Snowdon JA, Cliver DO. 1996.** Microorganisms in honey. *Int J Food Microbiol*; 31:1–26. doi:10.1016/0168-1605(96)00970-1
- Stiles, M.E., Holzapfel, W. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36(1) : 1-29
- Sutra, L., Federghi, C., Jouve, J.L, 1998.** Bactéries lactiques In : «Manuel de bactériologie alimentaire», éd polytechnica, Paris, 235-241.
- Tailliez, P. 2004.** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Actualités microbiologiques.* pp. 35-41.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, A.M. and Shuhaimi, M. 2013.** Molecular identification of *Lactobacillus spp.* isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52(5): 235-241.
- Tang, K.L., Caffrey, N.P., Nóbrega, D.B., Cork, S.C., Ronksley, P.E., Barkema, H.W., Polachek, A.J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J.D. and Ghali, W.A., 2017.** Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Planet Health*, 1, e316–27
- Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Danova, S. 2014.** Antifungal activity and identification of lactobacilli isolated from traditional dairy product Katak. *Anaerobe.* 28 : 78-84.
- UNAF. 2011.** L'abeille, l'arbre et la forêt. *Abeilles et Fleurs*, 2011, hors-série Spécial, pp.6-7
- Vandamme, P., Pot, B. 1996.** Polyphasic taxonom, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiolrev.*,1996, p407-438.
- Wang, M., Zhao, W.Z., Xu, H., Wang, Z.W., He, S.Y. 2015.** Bacillus in the guts of honeybees (*Apis mellifera*;Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. *Eur. J. Entomol.* 112: 619–624.00

Références bibliographiques

Xing, Z., Tang, W., Geng, W., Zheng, Y., Wang, Y. 2017. In vitro and in vivo evaluation of the probiotic attributes of *Lactobacillus kefirifaciens* XL10 isolated from Tibetan kefir grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (6): 2467–2477.

Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* 2:48–59

Zhao X, Zhou Z, Han Y, Wang Z, Fan J, Xiao H. Isolation and identification of anti-fungal peptides from Bacillus BH072, a novel bacterium isolated from honey. Microbiol Res 2013;168:598–606.doi:10.1016/j.micres.2013.03.001 (7) (PDF) *Microorganisms in Honey*.