

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abd-Elhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de Fin d'Etude

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Option : Exploitation Des Ecosystèmes Microbiens Laitiers

**Miels et lactobacilles du miel :
Caractéristiques et effets inhibiteurs**

Présenté par : MOKHTARI Bachir

Devant le jury :

<i>Mme H.TAHALAITI</i>	<i>Université de Mostaganem</i>	<i>présidente</i>
<i>Mr S. NEMICHE</i>	<i>Université de Mostaganem</i>	<i>examineur</i>
<i>Mme F.DALACHE</i>	<i>Université de Mostaganem</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Melle M. HOMRANI</i>	<i>Université de Mostaganem</i>	<i>Co-promotrice</i>

Structure d'accueil : Laboratoire Des Sciences Et Techniques De Production Animales

Année Universitaire 2015/2016



REMERCIEMENTS

Travail de mémoire a été effectué au Laboratoire de sciences et techniques de production animale LSTPA DE l'université de Mostaganem et le laboratoire de Microbiologie université de Mostaganem.

Tout d'abord, je remercie ALLAH qui m'a donné la force et la patience pour terminer mes étude.

Je remercie également mon encadreur Mme .F DALACHE et Melle M.HOMRANI M'avoir constamment guidé tout long de mon projet et pour les précieux conseils qu'ils m'ont donnés, et pour leurs serviabilités, leurs disponibilités et leurs conseils constructifs.

Je ne saurais oublier d'exprimer toute ma reconnaissance envers ma famille, particulièrement mes parents, pour ses encouragements et ses soutiens durant les longues années d'études Que Dieu bénisse son âme

Je tiens aussi toute ma gratitude envers des enseignants Mme H.TAHALATI et Mr M.MOULAY. D'avoir accepté de participer au jury. Merci





Dédicace

Je remercie dieu tout puissant d'avoir pu achever ce modeste travail que je dédie :

A mon père ; A ma Mère ; A mes frères et ma sœur A toutes la famille Mokhtari Atrhm sur mon père (Dieu bénisse son âme).

A mes très chères amies de la vie :

Abdellah , Ismail ,Mohamed , khaïrdinne , tawfique , hakim ,arous habib ,et tout Mes amis

Atouts les étudiantes de Exploitation des écosystèmes microbiens laitiers et aquaculture et surtout master 2

Mokhtari Bachir



Résumé

Dans le but de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques, différents produits sont explorés. L'un des plus étudiés de nos jours est le miel. Nous avons mené notre étude sur 6 échantillons de miels et 50 lactobacilles isolés à partir de miels frais. L'analyse de l'acidité de nos miels, nous a confirmé qu'il s'agit bien de miels de nectar. Pour les isolats lactiques, nous avons d'abord procédé à une pré-identification par des tests physico-chimiques biochimiques et physiologique. Ensuite par deux méthodes Fleming et Barefoot et klaenhammer nous avons tester l'effet inhibiteur des différents miels et des isolats de lactobacilles contre *E. coli* et *P. aeruginosa*. Par la méthode de Fleming *et* tous les lactobacilles ont montré un effet inhibiteur contre les deux indicatrices. Par la méthode de Barefoot et klaenhammer tous les miels ont montré une inhibition vis-à-vis des deux bactéries indicatrices. Concernant les lactobacilles le nombre d'inhibitions observées était plus réduit qu'avec la précédente méthode, mais *E. coli* était dans la plupart des cas la plus sensible. Le lactobacille ayant donné l'effet inhibiteur le plus grand provient du miel ayant donné à son tour l'inhibition la plus importante.

Mots-clés : miel, bactéries pathogènes, *Lactobacillus*, inhibition, acidité



	Page
Introduction	01
Chapitre I Revue bibliographique	
I-1 Historique	03
I-2 Règlementation	04
I-3 Critères de qualité du miel	04
I-4 Classification des miels	05
I-4-1 Classification des miels d'après leurs origines botaniques	06
I-4-1-1 Miels issus du nectar	06
I-4-1-2 Miels mono-floraux	06
I-4-1-3 Miels multi-floraux	06
I-4-1-4 Miels issus du miellat	06
I-5 Classifications des miels selon leur mode de traitement	07
I-5-1 Miel en rayon	07
I-5-2 Miel centrifugé (coulé)	07
I-5-3 Miel pressé .	07
I-5-4 Miel jeune (non mur)	07
I-6 selon l'origine géographique	07
I-7 Formation et récolte du miel	07
I-7-1 Formation	07
I-7-2 La Récolte	08
I-7-3 L'Extractions	08
I-7-4 la Pasteurisation	09
I-7-5 Emballage et étiquetage	10
I-7-6 Conditionnement et stockag	10
I-8 Composition biochimique du miel	11
I-8-1 Les sucres	12
I-8-2 Eau	12
I-8-3 Les acides	13
I-8-4 Les oligo-éléments.	13
I-8-5 Les protéines	13
I-8-6 Les enzymes	14



I-8-6-1 Diastases	14
I-8-6-2 la glucose-oxydase	15
I-8-7 Les vitamines	15
I-8-8 Les composés phénoliques	15
I-8-9 Flavonoïdes	16
I-9 Micro-organismes dans le miel	17
I-9-1 Le genre <i>Lactobacillus</i>	18
I-10 Caractéristiques du miel	19
I-10-1 Caractéristiques physico-chimiques	19
I-10-1-1 Densité	19
I-10-1-2 Viscosité	19
I-10-1-3 Activité de l'eau	19
I-10-1-4 PH	19
I-10-1-5 Abaissement du point de congélation	20
I-10-1-6 Conductivité électrique	20
I-10-1-7 Indice de réfraction	20
I-10-1-8 Hygroscopicité	20
I-10-1-9 Caractéristiques nutritionnelles	21
I-10-1-10 Caractéristiques organoleptiques	21
I-10-1-10-1 Cristallisation	21
I-10-1-10-2 Couleur	22
I-10-1-10-3 Odeur et goût	22
I-11 Propriétés du miel	22
I-11-1 Propriétés antioxydantes	22
I-11-2 Propriétés antimicrobiennes	23
I-11-2-1 Activité antibactérienne du miel	23
I-11-2-1-1 Le pH acide	23
I-11-2-1-2 Osmolarité	24
I-11-2-1-3 Le système peroxyde d'hydrogène	24
I-11-2-1-4 Facteurs photochimiques	25
I-11-2-1-5 La défensine -1	26
I-11-2-1-6 La méthylglyoxa	26



Chapitre II Matériels et méthodes

II Matériels et méthodes	28
II-1 Lieu de l'étude	28
II-2 Technique et méthodes expérimentales	28
II-3 Le matériel biologique utilisé	29
II-3-1 Le miel	29
II-3-2 Les Bactéries lactiques	29
II-3-3 Les bactéries indicatrices	29
II-4 Milieux de culture	29
II-5 Analyse physico-chimique du miel	29
II-5-1 Détermination du pH	29
II-5-1-1 Mode opératoire	30
II-6 Purification des bactéries lactiques	30
II-7 Identification	30
II-7-1 Caractères morphologiques	30
II-7-2 Caractères biochimiques et physiologiques	30
II-7-2 -1 L'activité catalasique	30
II-7-2 - 2 Croissance dans les conditions hostiles	30
II-7-2 -2-1 Croissance à différentes températures (10 et 45°C)	30
II-7-2 -2-2 Croissance à pH 4,5 et 9,6	31
II-7-2 -2-3 Croissance en présence de 6,5% de NaCl	31
II-7-2-3 La thermorésistante	31
II-7-2 -4 Le type fermentaire .	31
II-7-2 -5 Production d'acétoïne	31
II-8 Confirmation de l'identité des souches pathogènes .	32
II-8-1 Etude du pouvoir antibactérien	32
II-8-1-1 Méthode de double couche	32
II-8-1-2 Méthode de méthode de Barefoot et Klaenhammer	32



Chapitre III Résultats

III-1 Le pH des échantillons de miel	33
III-2 Caractérisation des bactéries lactiques	33
III-3 la coloration de Gram et le test de la catalase	35
III-3 -1 Coloration de Gram	35
III-3 -2 Test de la catalase	35
III-4 Croissance dans les conditions hostiles .	36
III-4-1 Croissance à différentes températures 10 ,30 et à 45°C	36
III-4-2 Test de croissance à pH 9.6 et 4,5	37
III-4-3 Croissance en milieu hyper Salé à 6.5% NaCl	38
III-5 Test de la thermo-résistance	39
III-6 Test du type fermentaire	39
III-7 Production d'acétoïne	40
III-8 Les activités antibactériennes	40
III-8 -1 Caractérisation des souches pathogènes	40
III-8 -1-1 Test macroscopique	40
III-8 -1-2 Test microscopique des souches pathogènes	41
III-8 -2 Mise en évidence des inhibitions	41
III-8 -2-1 Méthode de Fleming	41
III-8 -2-2 Méthode de Barefoot et Klaenhammer	44
III-8 -2-2-1 Le miel	44
III-8 -2-2- Culture bactérienne et surnageant de culture	45

Chapitre IV discussion

IV-1 pH	47
IV -2 Identification des bactéries lactiques	47
IV-3 Pouvoir antibactérien des échantillons de miels	48
IV-4 Pouvoir antibactérien des bactéries lactiques isolées à partir de miels	49
Conclusion	51
Références bibliographiques	
annexe	





Le miel a constitué pendant des millénaires en occident, la seule source abondante de matières sucrées dont on pouvait disposer (CANINI *et al.*, 2005). Toute fois, le miel est caractérisé par certains groupes de substances qui sont toujours présentes mais en quantité variable, plus de 180 substances ont été identifiées.

Le miel est également précieux comme produit à valeur marchande tant sur les marchés nationaux qu'internationaux et joue un rôle important dans certaines traditions culturelles (CANINI *et al.*, 2005). Il constitue de ce fait une source potentielle non négligeable de revenus pour la population rurale, en même temps qu'il peut contribuer à l'amélioration de l'alimentation humaine (NIJA, 1998). La production africaine du miel est en nette progression, elle est passée de 109.000 t en 1991 à 145.000 t en 2001 (APAN, 2002). En Algérie la production nationale du miel a atteint environ 30.000 tonnes en 2014, selon (FNAP ; 2015). Cependant il demeure une denrée rare, onéreuse et peu accessible pour l'algérien moyen mais très recherché pour son rôle bénéfique dans diverses pathologies. L'apiculture est pré-dominante dans les Zone du littoral (les miels d'agrumes et d'eucalyptus), la Zone montagneuse de Kabylie (miels de toutes fleurs, lavande, carotte sauvage et bruyère), la zone des hauts plateaux (miel de sainfoin, romarin et jujubier) et des forêts (miel toutes fleurs et miellat).

Par sa composition très variée ses applications sont innombrables. Les miels ont une action thérapeutique variable, selon leur origine florale, sur tous les systèmes du corps humain. En plus, de son action énergétique qui profite aux cellules jeunes, en favorisant notamment la multiplication cellulaire, Le miel est précieux pour le traitement des maladies cardiovasculaires, le cancer, la cataracte, et plusieurs maladies inflammatoires ainsi que la cicatrisation des plaies. Les actions thérapeutiques du miel sont dues à des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Martos *et al.*, 2000) . L'activité antimicrobienne du miel est due à sa forte osmolarité de par sa sursaturation en sucres, à son acide, à sa faible teneur en eau, à sa richesses en peroxyde d'hydrogène, en composés phénoliques ainsi qu'à d'autres composants dits "inhibines" non peroxydes. Des chercheurs suédois de l'Université de Lund ont identifié un groupe unique de 13 espèces de bactéries lactiques présentes dans le jabot des abeilles et que l'on retrouve dans le miel frais. Ces bactéries appartenant au genre **Lactobacillus** et **Bifidobacterium** produisent une importante quantité de composés antimicrobiens qui peuvent inhiber le développement des bactéries indésirables ou pathogènes. Le miel connaît un regain d'intérêt de la part des chercheurs, en effet face au problème de l'antibiorésistance le miel demeure une alternative Naturel aux antibiotiques.

Dans la démarche globale de cette étude, En premier lieu nous allons essayer d'identifier des bactéries lactiques isolées à partir de différents échantillons de miels crus. En second lieu nous allons étudier l'effet antimicrobien de ces échantillons ainsi que les bactéries isolées à partir de ces derniers contre des souches pathogènes. .



Figure n° 01 : Les différentes méthodes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antibactérien.	34
Figure n°02 : Observations macroscopiques de certaines colonies après incubation à 30 C° pendant 24h	37
Figure n°03 : aspect morphologie de certains isolats après la coloration de Gram	38
Figure n° 04 : Test de croissance à 30C° sur MRS bouillon après 24h d'incubation	39
Figure n° 05 : Test de croissance' à 45°C sur MRS bouillon après 48 heures. d'incubation	39
Figure n° 06: Test de croissance à pH 9.6 sur MRS bouillon après une incubation à 30°C pendant à 48 h	40
Figure n° 07 : Test de croissance à pH 4,5 sur MRS bouillon après une incubation à 30°C Pendant à 48 h	40
Figure n° 08 : Test de croissance en présence de 6.5% NaCl sur milieu MRS bouillon après incubation à 30°C pendant 48h.	41
Figure n° 09 : Résultat du test de Thermo-résistance	41
Figure n° 10 : résultat du test de type fermentaire sur bouillon MRS sans citrate après incubation à 30°C pendant 48 h	42
Figure n° 11 : observation macroscopique de bactéries pathogènes après d'incubation 37°C Pendant à 24 h. A(<i>E.Coli</i>) B (<i>P.aeruginosa</i>)	43
Figure n°12 : aspect morphologique des souches pathogènes après la coloration de Gram. A (<i>E. coli</i>) B (<i>P. aeruginosa</i>)	43
Figure n°13 : Inhibition obtenues par la méthode de Fleming des souches de bactéries lactiques, contre A (<i>E. coli</i>) et B (<i>P.aeruginosa</i>)	44

- Figure n°14** : Proportion des inhibitions de diamètre supérieur à 10 mm des bactéries lactiques contre les bactéries indicatrices. 45
- Figure n°15** : Proportion des inhibitions de diamètre supérieur à 15 mm des bactéries lactiques contre les bactéries indicatrices. 45
- Figure n°16**: zone d'inhibition des différents échantillons de miels obtenus par la méthode de Barefoot et klaenhammer (1983) Contre A (*E. coli*) et B (*P.aeruginosa*) 46
- Figure n°17** : Inhibitions obtenues par la méthode de Barefoot et klaenhammer de cul tures bactériennes et miel contre A (*E. coli*) et B (*p.aeruginosa*) 47
- Figure n°18** : Inhibitions obtenues par la méthode de Barefoot et kleanhammer de *suragent de culture* contre A (*E. coli*) et B (*p. aeruginosa.*) 48

Liste des tableaux

TABLEAU n°01 : Norme concernant la qualité du miel	3
Tableau n° 02 : composition moyenne du miel	11
Tableau n°03 : Effet de la teneur en eau sur le risque de fermentation dans miel	12
Tableau n°04 : Composés phénoliques identifiés dans le miel (DAVID <i>et al.</i> , 2011)	16
Tableau 05 : Micro-organismes répertoriés dans le miel (PIEPER B. - Honey-Based	17
Tableau n°06 : renseignement général sur les échantillons de miels	29
Tableau n°07 : valeur du pH des miels étudiés	36
Tableau n°08 : Résultats de l'effet inhibiteur des différents échantillons de miels	47
Tableau n°09 : Spectre d'activité antibactérienne des bactéries lactiques par la Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983)	48
Tableau n°10 : Tests d'identification des souches	annexe 1
Tableau n°11 : Résultats des tests de mise en évidence des effets inhibiteurs des lactobacilles	annexe 1

Liste des abréviations

- ❖ PH : potentiel d'hydrogène
- ❖ Ul : microlitre
- ❖ MRS : man, Rog osa ,Sharp
- ❖ BL : bactéries lactiques
- ❖ GN : Gélose nutritif
- ❖ h : heure
- ❖ G : gramme
- ❖ H₂O : Eau
- ❖ T : Température
- ❖ T : temps
- ❖ ml : millilitre
- ❖ Mn : minute
- ❖ C° : Degrés Celsius
- ❖ Cat : catalase
- ❖ V: volume

I-1 Historique

La connaissance et l'utilisation du miel remontent aux temps les plus reculés de l'histoire de l'Homme. On sait que le miel est un aliment connu depuis fort longtemps: sur les parois de la Grotte de l'Araignée (cueva de aralia) près de Valence en Espagne, on a retrouvé des peintures préhistoriques montrant que l'homme pratiquait la cueillette d'essaims. On y voit un homme suspendu à des lianes, portant un panier pour recueillir sa récolte, la main plongée dans un tronc d'arbre à la recherche de rayons de miel.

On lui reconnaît aussi depuis la plus haute Antiquité des propriétés médicinales Préventives et curatives qui ont été longtemps utilisées empiriquement.

Dès 2700 ans avant J.c., des tablettes d'argile mésopotamiennes mentionnent le miel non pas comme un aliment, mais comme un médicament.

Mille ans plus tard, le papyrus d'Ebers écrit à Thèbes, donne la formule d'un mélange de miel et de pain de Saint Jean indiqué comme médicament propre à la diurèse. Les égyptiens connaissaient bien le miel dont ils se servaient mélangé à de la propolis pour embaumer leurs morts et les empêcher de se putréfier. Ils l'utilisaient également pour panser les blessures et pour soigner les yeux.

A Babylone, des textes médicaux assyriens font état de l'utilisation du miel en friction: "Tu froteras la bouche du malade avec du miel et du beurre purifié.

Les médecins hindous déclaraient, il y a 5000 ans que les hommes ne s'alimentant que de lait et de miel pouvaient vivre 500 ans.

Hippocrate (**460-377 avant J.c.**), père spirituel de la médecine, conseillait le miel dans le but de prolonger l'existence dans toute sa vigueur. Il faisait du miel un fortifiant de la vue et des organes sexuels, un remède contre les douleurs d'oreille et un cicatrisant efficace des plaies de toutes sortes. Le miel figure en tant que matière médicale dans le manuel de stage en pharmacie de Camille et Marcel Guillot datant de 1942. Dans ce livre, les auteurs distinguent le miel de Narbonne (ou miel blanc du Languedoc), le miel ambré du Gâtinais et le miel brun de Bretagne. Les deux premiers étant réservés à la préparation de mellite, l'autre utilisé pour faire des lavements et en médecine vétérinaire.



I-2 Règlements

Cette dernière a pour objet la protection du consommateur contre les différents types de fraudes susceptibles d'être pratiqués (Louveau, 1986).

Selon la législation européenne le miel est défini comme suit : « Le miel est la substance naturelle sucrée produite par l'abeille *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur celle-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, *entreposent* et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. À l'exception du miel filtré, aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré, sauf si cela est inévitable lors de l'élimination de matières organiques et inorganiques étrangères ».

Le Codex Alimentarius reprend en partie la réglementation qui s'impose à tous les apiculteurs européens.

En Algérie, devant l'absence de loi concernant ce produit alimentaire la définition du Codex Alimentarius est appliquée.

I-3 Critères de qualité du miel

Les différents critères de qualité, ainsi que les différentes valeurs correspondantes à ces critères selon le Codex Alimentarius et l'Union Européenne sont résumés dans le tableau ci-dessous



TABLEAU n°01 : Norme concernant la qualité du miel

Critères de qualité	Projet du Codex-	Projet de l'UE
Teneur en Eau Général	≤ 21 g/100g	≤ 21 g/100g
Teneur en sucres réducteurs		
Miels qui ne sont pas mentionnés ci-dessous	≥ 65 g /100 g	≥ 65 g /100 g
Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar	≥ 45 g /100 g	≥ 60 g /100 g
Teneur en saccharose apparent		
Miels qui ne sont pas mentionnés ci-dessous	≤ 5 g/100	≤ 5 g/100 g
<i>Robini, Lavandula, Hedysarum, Trifolium, Zitrus, Medicago, Eucalyptus cam., Eucryphia luc. Banksia menz.* Calothamnus san., Eucalyptus scab., Banksia gr., Xanthorrhoea pr.</i>	≤ 10 g/100 g	≤ 10 g/100 g
Miel de miellat et mélanges de miel de miellat et de nectar	≤ 15 g/100 g	
Teneur en matières insolubles dans l'eau		
Général	≤ 0,1 g/100g	≤ 0,1 g/100 g
Miel pressé	≤ 0,5 g/100 g	≤ 0,5 g/100 g
Teneur en matières minérales (cendres)	≤ 0,6 g/100 g	≤ 0,6 g/100 g
Acidité	≤ 50 meq/kg	≤ 40 meq /kg
Activité diastasique, (indice diastasique en unités de Schade)		
Après traitement et mise en pot (Codex)	/	/
Tous les miels du commerce (UE)	≥ 8	≥ 8
Général	≥ 3	≥ 3

I-4 Classification des miels

Le miel peut être classé soit selon son origine botanique, son origine géographique ou bien selon le mode de traitement qu'il a subi.



I-4-1 Classification des miels d'après leurs origines botaniques

I-4-1-1 Miels issus du nectar

Le nectar est un liquide sucré et mielleux, il se produit à la surface des parties spéciales appelés nectaires, qui sont en forme de turgescences, situés soit sur les feuilles, appelés nectaires Extra floraux, soit sur les fleurs, (sépalés, pétales, carpelles) appelés nectaires floraux, retrouvés par exemple chez Le Thym. Pour recueillir un litre de nectar, on estime qu'il faut entre 20000 et 100000 voyages des abeilles (GONNET, 1982; DONADIEU, 1984; LOUVEAUX, 1968; ZIEGLER, 1968).

I-4-1-2 Miels mono-floraux

Un miel dit monofloral est issu d'un nectar, collecté par les abeilles sur un végétal unique et particulièrement attractif pour ces insectes.

Les miels monofloraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques. (BOGDANOV, 2003).

I-4-1-3 Miels multi-floraux

Les miels multi-floraux, ou miel toutes fleurs, sont souvent classés suivant les lieux de récolte (miel de montagne, de forêt, etc.), ou encore suivant les saisons (miel de printemps ou d'été). (DONADIEU, 1984)

I-4-1-4 Miels issus du miellat

Le miellat est un produit plus complexe que le nectar faisant intervenir un intermédiaire, généralement, des insectes de la famille des Homoptères tel que les pucerons, leur pièces buccales sont disposées pour piquer et absorber les aliments liquides telle que la sève des végétaux et rejetant l'excédent de matières sucrées sous forme de gouttelettes, que les abeilles récupèrent sur les feuilles des plantes. Nous citons quelques exemples d'arbres qui Hébergent les pucerons, tels que, les sapins, les Epicéas, les chênes, et aussi les plantes Herbacées comme les blés... (VACHE, GONNET, 1985). Les miellats représentent une ressource alimentaire importante pour les abeilles Lorsqu'elles ne trouvent pas des fleurs à leur disposition. Certains auteurs distinguent deux types de miellat :

Le miellat de puceron, et le miellat végétal qui se produit dans les journées chaudes à



Sécheresse prolongée séparée par des nuits relativement froides et humides, selon Gonnet (1985), en conditions particulières et en absence de pucerons par exsudation des feuilles à travers les orifices stomatiques.

I-5 Classifications des miels selon leur mode de traitement

Pour la classification ou l'appellation du miel selon le mode de traitement qu'il a subi on distingue 3 types de miel :

I-5-1 Miel en rayon : C'est le miel contenu dans les alvéoles fraîchement constituées operculées, sans couvains, de couleur blanchâtre. Ce miel est vendu en rayon ou une partie en rayons.

I-5-2 Miel centrifugé (coulé) : c'est un miel qui a été désoperculé puis extrait par centrifugation.

I-5-3 Miel pressé : Il est récolté à froid au moyen d'une presse hydraulique à partir d'alvéoles exemptes de couvain.

I-5-4 Miel jeune (non mur) : C'est le produit retiré des alvéoles non encore operculées, sa teneur en eau est généralement supérieur à celle du miel parvenu à maturité (plus de 20%)

I-6 selon l'origine géographique

Selon la norme Codex -stan-12 de 1981, le miel peut être désigné par le nom de la région géographique ou topographique, sous réserve d'être produit exclusivement dans la zone indiquée dans la désignation . La détermination (analyse qualitative) et le dénombrement des grains de pollen et les composants du miel présents dans les sédiments permettent de déterminer l'origine géographique de celui-ci (Bogdanov *et al.*, 2004).

I-7 Formation et récolte du miel

I-7-1 Formation

Une butineuse effectue entre 20 et 50 voyages par jour, chacun demandant environ 15 minutes. Le rayon d'action moyen se situe entre 500 mètres et 2 kilomètre, d'où l'importance, en plus des conditions climatiques et de la nature du sol. Elle prélève le nectar, sécrété par des glandes dites nectarifères ou le miellat (Huchetetal, 1996).



Que se soit du nectar ou du miellat. Les abeilles y ajoutent par un passage de jabot à jabot de la salive qui le rend fluide et surtout qui l'enrichit en enzymes et catalyseurs biochimiques à l'origine de la transformation des sucres dans le miel (Bhuiyanetal., 2002). Transformation chimique (l'emmagasinage) Le changement de la solution sucrée en miel commence déjà lors du voyage, au cours duquel elle est accumulée dans le jabot de l'abeille. C'est dans son tube digestif que s'amorce la longue transformation, des enzymes agissent sur le nectar ou le miellat. Le saccharose sous l'action de l'invertase, se transforme en glucose et fructose. L'évolution du nectar ou du miellat en miel s'accompagne par autre la progression de la quantité des sucres et de la naissance d'autres sucres (Jean-Prost,2005).

A son retour, la butineuse régurgite sa charge, la passe aux ouvrières, qui elles mêmes la communique à d'autres et ainsi de suite. D'individu en individu, la teneur en eau s'abaisse. La goutte épaissie est déversée ensuite dans une alvéole, d'où l'eau du miel s'évapore. Transformation physique (Maturation) La solution sucrée transformée, qui encore 50% d'eau d'environ, va subir une nouvelle concentration par évaporation, qui se fait sous la double influence:

- D'abord de la chaleur régnant dans la ruche qui est d'environ 36C°.
- En suite de la ventilation par le travail des ventileuses qui entretiennent un puissant courant d'air ascendant par un mouvement très rapide de leurs ailes(Gonnet,1982;Lobreau-Callen etal.,1999).

Dans la ruche, le miel se garde bien, car il est très concentré en sucres. Mais on dit que les abeilles, pour plus de sécurité, injectent dans chaque cellule une gouttelette de venin. Et celui -ci est un produit conservateur. Quand tout ce travail sera terminé, la cellule pleine du miel sera fermée par un opercule de cire (Bernadette et Roger Darchen, 1985).

I-7-2 La Récolte

La récolte du miel peut se pratique dès la fin de la miellée quand les $\frac{3}{4}$ des alvéoles des rayons de cire sont operculés (Jean-ProstetMédori,Synthèse bibliographique). Cette période se situe entre le mois d'avril et le mois de novembre en une ou plusieurs fois (Donadieu, 2003).

I-7-3 L'Extractions

Deux techniques sont exploitées pour extraire le miel (Lobreau-Callenetal., 1999) :

- Par pression : Le miel obtenu n'est pas pur car il contient des particules de propolis, cire, couvain et pollen.



- Par centrifugation : Cette technique est basée sur l'extraction du miel par centrifugation des rayons désoperculés des hausses.

L'extraction centrifuge ne donne pas un miel pur car elle présente, l'inconvénient d'émulsionner le miel et de ne pas éliminer les particules de cire arrachées aux rayons, les fragments de propolis et les amas de pollen. Selon Louveaux (1985) , pour avoir un miel prêt à la mise en pots, il faut lui faire subir une épuration soit:

-Par décantation : Cette méthode consiste à laisser le miel reposé durant quelques jours dans le récipient «maturateur». Cette technique permet d'éliminer les bulles d'air, la remontée des particules de cire et les amas du pollen en surface et le dépôt des grains de sable.

-Par filtration : Cette méthode est efficace pour éliminer les débris de cire et les grosses impuretés. Elle utilise des filtres à mailles de 0,1 mm et exige un chauffage modéré dans le cas d'un miel visqueux(Biri, 2003).

La pasteurisation consiste à porter le miel à l'abri de l'air, à une température de l'ordre de 80°C pendant 6 à 7 minutes, puis le refroidie rapidement. L'appareillage comporte principalement des plaques chauffantes parallèles entre les quelles le miel va circuler en lames minces. La pasteurisation tue les levures, refond les cristaux primaires de glucose qui sont les indicateurs de la cristallisation, détruit environ 30% de l'invertase Et 25% de l'amylase, ne modifier pas la nature des sucres, n'invertit pas le saccharose, mais peut augmenter très sensiblement la couleur et le taux d'hydroxyméthylfurfural (H.M.F).Cette substance résulte d'une du hexose en milieu acide; elle caractérise les miels chauffés ou vieillis (Hebbaretal.,2003).

I-7-4 la Pasteurisation

La pasteurisation consiste à porter le miel à l'abri de l'air, à une température de l'ordre de 80°C pendant 6 à 7 minutes, puis le refroidie rapidement. L'appareillage comporte principalement des plaques chauffantes parallèles entre les quelles le miel va circuler en lames minces. La pasteurisation tue les levures, refond les cristaux primaires de glucose qui sont les indicateurs de la cristallisation, détruit environ 30% de l'invertase Et 25% de l'amylase, ne modifier pas la nature des sucres, n'invertit pas le saccharose, mais peut augmenter très sensiblement la couleur et le taux d'hydroxyméthylfurfural (H.M.F).Cette substance résulte d'une du hexose en milieu acide; elle caractérise les miels chauffés ou vieillis (Hebbaretal., 2003).



I-7-5 Emballage et étiquetage

Les récipients doivent être étanches à l'eau et à l'air pour éviter toute pénétration d'humidité dans le miel. Les récipients et cuves en fer blanc, en aluminium, en acier chromé et en plastique (qualité alimentaire) conviennent parfaitement à cet usage (Schweitzer, 2004).

Pour les emballages de consommation, les pots en verre, mais aussi ceux en plastique (qualité alimentaire) et en fer blanc conviennent. Quant aux boîtes en paraffine, elles ne sont étanches ni à l'eau ni à l'air et sont en conséquence inutilisables pour le stockage du miel. Selon la loi sur les denrées alimentaires, elles sont même interdites (car la paraffine contient des substances toxiques qui peuvent migrer dans le miel) et ne pourront plus être utilisées une fois la période de transition est écoulée (Bogdanov, 1999).

I-7-6 Conditionnement et stockage

La rapidité de la dégradation du miel dépend de la composition du produit ainsi que les conditions de sa conservation. Le miel confiné en atmosphère humide absorbe l'eau rapidement, ce phénomène gagne rapidement en profondeur et le miel hydraté acquiert une structure très fragile (Jeanne, 1993).

Dans la mesure du possible, les locaux de conservation du miel seront secs et aérés et les emballages se feront en contaires pleins et fermés hermétiquement. Si le produit s'échauffe, on observe alors une dégradation plus en moins rapide des sucres, dégradation qui s'effectue essentiellement aux dépens du Fructose et s'accompagne de la formation d'hydroxyméthyl

-furfural (HMF) (Manikiset Thrasyvoulou, 2001). L'acidité et une disparition rapides des enzymes sont directement liées à des mauvaises conditions de stockages. Certains miels sont plus fragiles que d'autres en fonction de leur acidité naturelle, en effet; tout les miels dont le pH est inférieur à 4 se dégradent plus vite que ceux de caractéristique inverse. Il convient donc de garder le miel dans des locaux frais ou la température ne dépasse pas 20°C, si le miel à stocker présente un risque de fermentation, il faudra impérativement le pasteuriser ou le conserver à une température de 4 à 5°C (Louveaux, 1985).



I-8 Composition biochimique du miel

Bien que le miel soit un produit très complexe, sa composition qualitative est aujourd'hui bien connue, près de 500 composant ont été identifiés. Toutes fois les proportions peuvent varier sous l'influence de plusieurs facteurs qu'il est impossible de maîtriser, tels que la nature de la flore butinée, le sol sur lequel poussent ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles et l'état physiologique de la colonie. Généralement le miel contient des éléments majeurs et des éléments mineurs.

Tableau n° 02 composition moyenne du miel

Caractéristiques mesurées	Moyenne	Amplitude de la variation	
Couleur : échelle de PFUND	05,000	00,00	à 14,00
GRANULATION : échelle de WHITE	03 ,00	00,00	à 09,00
Humidité %	17,200	13,40	à 22,900
Fructose %	38,190	27,25	à 44,260
Glucose %	31,280	22,03	à 40,750
Saccharose %	01, 280	00,25	à 07,570
Maltose, isomaltose %	07,310	02,74	à 15,980
Sucres supérieurs %	01,500	00,13	à 8,490
Indéterminés %	03,100	00,00	à 13,200
PH	03,910	03,420	à 06,100
Acidité libre Meq/kg	22,030	06,75	à 47,190
Lactones Meq /kg	07,110	00,00	à 18,760
Acidite totale Meq /kg	29,120	08,68	à 59,490
Lactones /acidité libre Meq/ kg	00,335	00,00	à 00,950
Cendres %	00 ,169	00,02	à 01,028
Azote %	00,041	00,00	à 00,133
Indice diastasique (schade)	20,800	02,10	à 61,200



I-8-1 Les sucres

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel. Il s'agit en grande partie de monosaccharides (glucose et fructose), du saccharose, du maltose, et d'autres sucres présents à l'état de traces (érllose, mélézitose, isomaltose, nigérose, turanose, maltulose...)

La présence de glucose et de fructose est le résultat de l'action d'une enzyme sur le saccharose : l'invertase. La présence des autres sucres semble dépendre des plantes qui ont été butinées.

I-8-2 Eau

Est présente en quantité non négligeable puisque sa teneur moyenne est de 17.2%, mais comme le miel est un produit biologique, cette valeur peut varier. En fait, les abeilles opercules les alvéoles lorsque la teneur en eau avoisine les 18%. De plus, certains aspects de l'eau contenue dans le miel restent un mystère puisque Helvey a montré que la proportion en deutérium de l'eau du miel est sensiblement plus élevée que celle de l'eau ordinaire. On ne sait pas d'où provient cet enrichissement en deutérium.

Tableau n°03 : Effet de la teneur en eau sur le risque de fermentation dans miel

Teneur en eau	effet sur le risque de fermentation dans le miel
A moins de 17.1%	Quel que soit leur nombre, les levures ne peuvent se multiplier la pression osmotique est importante, le miel ne peut donc pas fermenté.
De 17,1 à 18 %	Pas de Fermentation si le nombre de levure est inférieur à 1000 par gramme
De 18,1 à 19 %	Pas de Fermentation si le nombre de levure est inférieur à 10
De 19,1 à 20 %	Pas de Fermentation si le nombre de levure est inférieur à 1
Au dessus de 20%	Risque de Fermentation dans tous les cas



I-8-3 Les acides

Le miel contient aussi des acides. Le plus important est l'acide gluconique mais on trouve aussi une vingtaine d'acides organiques, comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide oxalique, l'acide butyrique, l'acide pyroglutamique et l'acide succinique. A l'état de traces, le miel contient de l'acide formique, de l'acide chlorhydrique et de l'acide phosphorique. Les lactones participent également à l'acidité du miel.

I-8-4 Les oligo-éléments

Le miel est un aliment qui apporte de nombreux oligo-éléments qui sont indispensables à la santé de l'homme. Suivant leurs origines florales, les miels présentent des concentrations variables en oligo-éléments. Il est intéressant de constater que des miels de différentes saisons et de différentes origines géographiques se complètent; ainsi une consommation variée tout au long de l'année assure des apports intéressants en oligo-éléments. Potassium, phosphore, calcium, soufre, magnésium, manganèse, silicium, bore, fer, zinc, cuivre et baryum sont retrouvés en plus ou moins grande quantité dans le miel. Ces substances participent au bon fonctionnement de notre organisme.

Quelques rôles d'oligo-éléments dans l'organisme humain:

- Le potassium est un cation intracellulaire d'une grande importance puisqu'il est utilisé entre autre par les cellules du muscle cardiaque.
- Le phosphore entre dans la composition de l'adénosine triphosphate.
- Les ions calcium jouent un rôle dans les phénomènes liés à la coagulation du sang et à l'excitation neuromusculaire.
- Le soufre est un oxydant; il entre dans la composition de nombreuses molécules organiques intervenant dans de nombreux métabolismes.

De plus, le miel facilite l'assimilation des oligo-éléments; en effet les travaux du Professeur Bengsch (1997) ont montré que les oligo-éléments sont mieux assimilés par l'organisme lorsqu'ils sont dans du miel que lorsqu'on les consomme seuls.

I-8-5 Les protéines

Le miel est une substance assez pauvre en protides. On y trouve des peptones, des albumines, des globulines ainsi que des acides aminés comme la proline, l'acide aspartique,



l'acide glutamique, l'alanine et la cystéine qui sont présents en faible quantité (1.7 gramme par kilogramme de miel soit une teneur de 0.26%) et la teneur en azote est négligeable (de l'ordre de 0.041%). Il y a présent essentiellement dans le miel des peptones, des albumines, des globulines et de nucléoprotéines qui proviennent soit de la plante, soit de l'abeille. Il y a également des acides aminés libres dont la proline, qui provient des sécrétions salivaires de l'abeille.

I-8-6 Les enzymes

De nombreuses enzymes existent dans le miel : l'invertase, l' α -amylase, la β -amylase, l' α -glucosidase, la glucose oxydase, une catalase et une phosphatase. Elles proviennent soit des nectars (origine végétale), soit des sécrétions salivaires des abeilles (origine animale). L'invertase est responsable de l'hydrolyse des disaccharides. Les amylases transforment l'amidon en glucose. La glucose-oxydase donne de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène à partir du glucose.

Ces enzymes étant thermolabiles, leur présence ou leur absence peut servir d'indicateur de surchauffe du miel

I-8-6-1 Diastases

L'activité de la diastase, enzyme du miel, est un facteur de qualité, qui est influencé par le stockage et le chauffage du miel et qui est par conséquent un indicateur de fraîcheur et de surchauffage du miel. Bien que l'activité de la diastase ait une large fluctuation naturelle, il s'est révélé que l'indice diastasique minimal actuel de 8 est adéquat. Lors de l'interprétation des résultats de l'activité diastasique, il faut tenir compte du fait que certains miels mono floraux ont une activité diastasique naturellement basse. Bien que les projets de l'Union européenne et du Codex Alimentarius proposent une même valeur pour l'activité minimale de la diastase, il existe une différence importante: alors que dans le projet du Codex, la valeur prescrite est valable lors de la mise en pot, dans le projet de l'Union européenne, elle est valable pour l'ensemble des miels du commerce. Cela signifie que la norme européenne est plus sévère, car plus le stockage est long, plus l'activité de la diastase diminue.



I-8-6-2 la glucose-oxydase

Une partie de l'action des inhibitions est à mettre sur le compte du peroxyde d'hydrogène (**WHITE et al 1963**) qui se forme à partir de la glucose-oxydase. Cette inhibine est à la fois photo et thermosensible (**MOLAN ,1992**). La glucose-oxydase est d'un intérêt considérable, car son activité entraîne la production du peroxyde d'hydrogène qui non seulement stabilise le nectar en maturation mais possède également une action microbicide (**JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996**).

La glucose-oxydase agit plus efficacement quand le miel est dilué. Quand le miel est non dilué, l'acide gluconique produit abaisse le PH à un point où il inhibe plus l'activité enzymatique, d'où moins de production de peroxyde d'hydrogène. Une chaleur excessive (>50C°) peut également réduire l'activité de la glucose oxydase (**WHITE et SUBRS, 1964**)

I-8-7 Les vitamines

Le miel contient peu de vitamines. On y trouve essentiellement des vitamines du groupe B: vitamines B1, B2 B3 (appelée aussi PP), B4 et B5. Parfois on y trouve aussi de la vitamine C, ainsi que les vitamines A, K et D.

I-8-8 Les composés phénoliques

Les polyphénols possèdent une grande variété de structures allant de composés contenant un simple noyau phénolique (acide phénolique) à des composés polymériques complexes comme les tanins (polymères de catéchine et épi catéchine présentant plusieurs dizaines d'unités). Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales; ils ont la capacité de moduler l'activité d'un grand nombre d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires. En outre, in vitro, un grand nombre de polyphénol sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antifongiques, antivirales et anticancéreuses (**KHAN, 2010**). Ces activités sont attribuées à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (HO[·]) et superoxyde (O₂^{·-}) (**NKHILI, 2009**).



I-8-9 Flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux, tous les flavonoïdes (plus de 4000) possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (**PORTET, 2007**). **BARBONI (2006)**) indique que les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les flavan-3-ol

Tableau n°04 : Composés phénoliques identifiés dans le miel (**DAVID *et al.*, 2011**)

Type du miel	Technique	Composés phénoliques identifiés
Eucalyptus, bruyère, châtaigne, lavande, tournesol, romarin acacia, orange	HPLC-DAD	L'acide 4-hydroxybenzoïque acide protocatéchique, acide gallique, acide syringique, acide vanillique, acide férulique, acide caféique, acide p-coumarique
Miel d'eucalyptus (australien)	HPLC-DAD	acide chlorogénique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique
Miel d'agrumes, lavande, thym, romarin	CE-DAD	acide gallique, acide caféique, acide p-coumarique, acide syringique, acide chlorogénique, acide férulique, acide cinnamique
Miel d'eucalyptus	HPLC-DAD	Myricétine, tricetin quercétine, lutéoline éther, quercetine-3-méthyl, Kaempferol, pinocembrin chrysin, pinobanksine genkwanine, isorhamnétine
Miel de romarin	CE-DAD	Kaempferol, chrysin, acide p-coumarique, pinocembrin acide férulique



I-9 Micro-organismes dans le miel

Leur présence s'explique par une contamination via les pollens, le contenu digestif des abeilles, la poussière, l'air, les fleurs... On va donc trouver dans les ruches, sur les abeilles adultes, des bactéries et des levures *Bacillus*, *Micrococcus*, *Saccharomyces*, *Streptomyces*, *Enterobacteriaceae*...qui se retrouveront ensuite dans le miel comme le montre l'illustration. En effet, les intestins des abeilles contiennent 1% de levures, 27% de bactéries Gram+ et 70% de bactéries diverses dont les Gram- (**Harris, 1994**)

L'autre source de contamination du miel est constituée par l'Homme, les équipements, les récipients, l'atmosphère lors de la récolte et du conditionnement.

Tableau 05 : Micro-organismes répertoriés dans le miel (**PIEPER B. - Honey-Based**)

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



La plupart de ces bactéries et autres micro-organismes ne peuvent pas se développer ou se reproduire dans le miel, car celui-ci possède une activité antibactérienne. 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. Seules les spores produites par les microorganismes peuvent survivent jusqu'à 4 mois après. Cependant si le miel est mis en présence d'eau, alors la croissance bactérienne est possible. Elle est toutefois minime 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. Donc la probabilité d'une contamination de l'homme est très faible. (OLAITAN, 2007)

I-9-1 Le genre *Lactobacillus*

Ce genre regroupe plus de 70 espèces (dont plusieurs sont divisées en sous-espèces). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Ce genre est subdivisé en trois sous genres :

Thermobacterium, *Bêtabacterium*, *Streptobacterium*.

- ❖ **Les Lactobacilles homofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Thermobacterium*, qui dégradent les hexoses en acide lactique.
- ❖ **Les Lactobacilles hétérofermentaires stricts** regroupent les espèces de l'ancien sous-genre *Bêtabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂ (voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase). Ils dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique (voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3- phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase). Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate.
- ❖ **Les Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs** regroupent les espèces de l'ancien sous genre *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose mais ils en produisent lors de la Fermentation du gluconate (KANDLER et WEISS, 1986b ; STILES et HOLZAPFEL, 1997). L'établissement d'un arbre phylogénique construit à partir des séquences d'ARN 16S a démontré que les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont très liés (malgré leurs caractères morphologiques et physiologiques très différentes) (SCHLEIFER et LUDWIG, 1995).



I-10 Caractéristiques du miel

I-10-1 Caractéristiques physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques, densité, viscosité, activité de l'eau, pH, abaissement du point de congélation, conductivité électrique, indice de réfraction et hygroscopicité du miel sont présentées :

I-10-1-1 Densité

Le miel a une densité relativement élevée qui varie entre 1,40 et 1,45 g/cm³ (BOGDANOV *et al.*, 2003). C'est une donnée très utile pouvant être utilisée pour mesurer la teneur en eau des miels. On peut admettre une moyenne de 1.4225 à 20°C (EMMANUELLE *et al.*, 1996).

I-10-1-2 Viscosité

La viscosité du miel est conditionnée essentiellement par sa teneur en eau, sa composition chimique et la température à laquelle il est conservé ; par ailleurs, les sucres contenus dans le miel peuvent cristalliser en partie sous l'influence de certains facteurs (température, agitation, composition chimique), entraînant alors une modification complète de son aspect mais sans rien changer à sa composition (DONADIEU, 2008).

I-10-1-3 Activité de l'eau

L'activité de l'eau (et non la teneur en eau) est le facteur le plus déterminant pour la observabilité d'une denrée alimentaire. L'influence de la composition du miel sur la valeur aw a été étudiée dans les travaux de RUEGG *et al* (1981). Les valeurs aw du miel varient entre 0,55 et 0,75. Les miels dont l'aw est < 0,60 peuvent être, du point de vue microbiologique, qualifiés de stables. Bien que l'activité de l'eau soit un facteur de qualité important, on ne la détermine que rarement (BOGDANOV *et al.* 2003).

I-10-1-4 pH

Le pH du miel varie entre 3,2 et 5,5. Il est généralement inférieur à 4 dans les miels de nectar, supérieur à 5 dans ceux de miellat (sapin = max 5,3). Les miels à pH bas (type lavande



= min 3,3) se dégradent plus facilement : il faudra alors prendre un soin particulier à leur conservation (GONNET et VACHE, 1985).

I-10-1-5 Abaissement du point de congélation

Il dépend de la proportion en sucres. Il serait de 1.42°C à 1.53°C en solution aqueuse à 15% et 2.75°C à 3.15°C en solution aqueuse à 25% (EMMANUELLE *et al.*, 1996).

I-10-1-6 Conductivité électrique

La conductivité électrique est intéressante, car elle permet de distinguer aisément des miellat des miels de fleurs, les premiers ayant une conductibilité bien plus élevée que les seconds (EMMANUELLE *et al.*, 1996). Cette mesure dépend de la teneur en minéraux et de l'acidité du miel; plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée. Récemment, des données complètes relatives à la conductivité de milliers de miels commercialisés ont été publiées, les miels de nectar (à l'exception du Banksia, Erika, Eucalyptus, Eucryphia, Leptospermum, Melaleuca, Tilia) et les mélanges du miel de nectar et miel de miellat ont une conductivité inférieure à 0,8 mS/cm et que le miel de miellat et le miel de châtaignier sont supérieurs à 0,8 mS/cm (BOGDANOV *et al.*, 2001).

I-10-1-7 Indice de réfraction

Il est couramment utilisé par les techniciens qui se servent de réfractomètres de petite taille, très pratiques. L'indice permet de calculer une variable très importante, la teneur en eau, bien plus rapidement que pour les autres méthodes (EMMANUELLE *et al.*, 1996).

I-10-1-8 Hygroscopicité

Le miel tend à absorber l'humidité de l'air et si on le laisse trop longtemps dans une atmosphère humide, cette absorption peut être considérable. Un miel normal, contenant 18% d'eau, peut atteindre, au bout de trois mois, une hygrométrie de 55%, son poids a alors augmenté de 84%. D'autre part, lorsqu'on veut dessécher le miel, il est nuisible de le maintenir en atmosphère rigoureusement sèche, parce qu'il se forme en surface une pellicule dure qui empêche le reste d'eau de s'évaporer (EMMANUELLE *et al.*, 1996).



I-10-1-9 Caractéristiques nutritionnelles

Le miel est apprécié partout comme aliment sucré et au goût agréable. En temps de pénurie alimentaire, c'est une source précieuse de glucides qui contient des oligo-éléments et apporte une diversité nutritionnelle dans les régimes alimentaires trop pauvres. Le miel occupe souvent une place importante dans la préparation des plats traditionnels (**BRADBEAR, 2005**). De plus, il peut prétendre à de nombreux avantages nutritionnels et énergétiques (**BLANC, 2010**). Si sa composition précise peut varier en fonction de son origine florale, le miel reste un produit riche en nutriments. Il contient :

- Des glucides qui représentent 95 à 99% de la matière sèche. La plupart sont des sucres simples dont le fructose (environ 40% de la matière sèche) et le glucose (environ 30 à 40% de la matière sèche).
- Des acides aminés.
- Des vitamines et minéraux : vitamine C, vitamine B, potassium, calcium, cuivre, fer, zinc, manganèse, phosphore... (**TOMCZAK, 2010**).

I-10-1-10 Caractéristiques organoleptiques

I-10-1-10-1 Cristallisation

La cristallisation du miel est un processus naturel, sa vitesse dépend surtout de la teneur en glucose. Les miels dont la teneur en glucose est < 28 g/100 g ou dont le rapport glucose/eau est $< 1,7$ restent plus longtemps liquides. Les miels à cristallisation rapide se cristallisent le plus souvent très finement, alors que les miels à cristallisation lente ont tendance à avoir une cristallisation grossière (**BOGDANOV et al., 2003**).

La cristallisation se fait à partir de cristaux primaires de glucose qui sont présents dès la récolte et faciles à mettre en évidence en lumière polarisée sous le microscope. La croissance de ces cristaux aboutit à la formation de 2 phases : une phase solide constituée de glucose cristallisé et une phase liquide enrichie en eau.

La cristallisation est la plus rapide à la température de 14°C . Les basses températures retardent la croissance des cristaux. Les hautes températures entraînent la dissolution des cristaux qui disparaissent totalement à 78°C (**EMMANUELLE et al. 1996**).



I-10-1-10-2 Couleur

La couleur constitue un critère de classification notamment d'un point de vue commercial. Plus il est clair, moins il est riche en minéraux et inversement (**BLANC, 2010**). La couleur du miel est un autre paramètre de qualité. Les miels sont divisés en sept catégories de couleurs (**ALVAREZ, 2010**), elle va du jaune très pâle (presque blanc) au brun très foncé (presque noir) en passant par toute la gamme des jaunes, oranges, marrons et même parfois des verts ; mais le plus souvent le miel est blond (**DONADIEU, 2008**). Elle est due aux matières minérales qu'il contient. La teneur en cendres des miels est inférieure à 1%, la moyenne étant 0.1%, la variabilité est grande puisque les miels les plus pauvres en matières minérales contiennent 0.02% de cendres, Il s'agit de miels très clairs. Les plus foncés étant les plus minéralisés (**EMMANUELLE et al., 1996**)

I-10-1-10-3 Odeur et goût

L'odeur du miel est variable (**BLANC, 2010**). L'arôme, le goût et la couleur du miel dépendent des plantes où les abeilles ont récolté le nectar. Les tournesols, par exemple, donnent un miel jaune d'or; le trèfle donne un miel sucré et blanc. Le miel foncé a généralement un goût plus prononcé et sa teneur en sels minéraux est élevée ; le miel clair a une saveur plus délicate (**BRADBEAR, 2005**).

I-11 Propriétés du miel

I-11-1 Propriétés antioxydantes

Le mécanisme protecteur antioxydant du miel utilise à la fois les enzymes telles que la catalase et la peroxydase, les composés phénoliques, les flavonoïdes, les acides organiques comme l'acide ascorbique et des acides aminés comme la proline (**Meda et al., 2005**). Toutefois, les composés phénoliques sont les plus importants dans cette activité. Les antioxydants sont des substances qui, présentes à faible concentration, sont capables de supprimer, retarder ou empêcher les processus d'oxydation et leurs conséquences. Les sources d'antioxydants sont nombreuses et variées :

Extrait d'herbe, de miel, de fruits, de légumes, de thé. Les antioxydants sont classés en fonction de leurs mécanismes d'action :



- les antioxydants primaires ou antiradicalaires (type I) : leurs actions reposent sur leurs capacités à inactiver les radicaux libres, car ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents. Les composés phénoliques appartiennent à cette classe.

- Les antioxydants secondaires ou préventifs (type II) : ils préviennent la formation des radicaux libres par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques réduisant l'effet pro-oxydant des ions ; c'est le cas de certains acides organiques et de certaines protéines. D'autres sont des piègeurs d'oxygène comme par exemple l'acide ascorbique, les carotènes ou certains systèmes enzymatiques. En règle générale, les miels foncés et les miels ayant une forte teneur en eau ont une capacité anti-oxydante plus grande que celle des autres miels. De plus, l'activité anti-oxydante des miels est très variable d'un miel à un autre, et elle dépend essentiellement de son origine botanique.

I-11-2 Propriétés antimicrobiennes

I-11-2-1 Activité antibactérienne du miel

Avec l'augmentation de la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques, le miel est de plus en plus apprécié pour son activité antibactérienne. La puissante activité *in vitro* du miel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel sur des plaies, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricide et bactériostatique du miel. On ne connaît pas encore précisément toutes les composantes antibactériennes du miel et ses vertus curatives constituent partiellement une énigme. Cependant, six facteurs principaux sont décrits comme étant impliqués dans ce pouvoir bactéricide.

I-11-2-1-1 Le pH acide

La PH du miel est relativement acide, situé entre 3,5 et 6. Même si de nombreuses bactéries sont capables de supporter un PH bas, ce pH semble être efficace pour ralentir ou éviter la croissance de certaines espèces de bactéries. (Molan, 2002) a rapporté aussi que l'éthylacétate est un acide de miel qui est efficace contre les bactéries et les mycètes.

D'après Jeffrey et Echazarréta (1996), les acides organiques libres jouent un rôle dans l'activité antimicrobienne du miel. Il sont très solubles dans les membranes de la cellule et induisent des altérations dans la perméabilité cellulaire et dans la phosphorylation oxydative des microorganismes pathogènes.



I-11-2-1-2 Osmolarite

Le miel est une solution sucrée concentrée avec une pression osmotique élevée (**Bogdanov et al., 2004**) 84% étant un mélange de fructose et de glucose avec une basse activité de l'eau (a_w) qui varie entre 0,56 à 0,62 (**Molan, 1992**).

D'après **Guiraud (2003)**, une a_w inférieure à 0,62 bloque tout développement microbien.

Mescle et Zucca (1996) expliquent, qu'une basse a_w provoque une diminution du volume cytoplasmique (plasmolyse) de la cellule et perturbe les fonctions métaboliques des germes pathogènes et inhibe totalement leur développement. Les mêmes auteurs rapportent encore que le stress osmotique provoque un effet primaire qu'est la fuite d'eau.

D'après (**Bogdanov et Blumer, 2001**), le miel agit d'une manière osmotique et absorbe l'eau vitale des cellules microbiennes.

Une étude comparative entre le miel et une solution de sucre à une pression osmotique et une activité de l'eau semblables à celles du miel a démontré que l'activité antimicrobienne du miel est particulièrement efficace contre les *Salmonelles*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger* et *penicillium chrysogenum* par rapport à la solution de sucre (**Miraglio et al., 2003**). **Molan (1995)** affirme que la basse activité de l'eau du miel n'est pas la seule explication pour son activité antimicrobienne.

(**Bogdanov & Blumer (2001)**) rapportent aussi que même dans les miels fortement dilués, les inhibines qui s'y trouvent sont efficaces. Par conséquent il doit y avoir encore d'autres substances antimicrobiennes en plus du taux de sucre et de la basse activité de l'eau.

I-11-2-1-3 Le système peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est considéré comme la principale inhibine contenue dans le miel (**Bogdanov & Blumer, 2001**). L'eau oxygénée et l'acide gluconique résultent de l'oxydation de l'eau et du glucose. Cette oxydation est provoquée par la glucose-oxydase (**Bogdanov & BLUMER, 2001**). L'acide gluconique et le peroxyde d'hydrogène résultant de cette réaction préservent et stérilisent le miel (miel non mur) pendant le processus de maturation (**Molan, 2002**).



Selon (Bogdanov & Blumer, 2001) la catalase représente l'antagoniste de la glucose-oxydase car elle réduit l'eau oxygénée. La concentration de peroxyde d'hydrogène dépend donc directement de l'activité de ces deux enzymes. Dans le miel mur, la glucose-oxydase est inactive, il contient seulement une petite quantité de peroxyde d'hydrogène non suffisante pour empêcher la croissance bactérienne (Bogdanov, 1997).

Cependant la dilution du miel augmente l'activité enzymatique de la glucose-oxydase et par conséquent la concentration du H_2O_2 s'élève (Molan, 1992).

Le peroxyde d'hydrogène donne une protection contre les microorganismes pathogènes par un mécanisme biochimique qui interrompt leurs métabolismes et dénature leurs protéines (Jeffrey & Echazarreta, 1996 ; Lusby, 2002). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est à la fois photo et thermolabile (Bogdanov & Blumer, 2001).

L'action du peroxyde d'hydrogène contenu dans le miel sur des bactéries résistantes (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et quatre souches d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine) prélevées dans des plaies infectées a été récemment soulignée (Brudzynski & Iannigan, 2012).

I-11-2-1-4 Facteurs photochimiques

Parmi les facteurs photochimiques, on retrouve les huiles essentielles des nectars de fleurs dont le pouvoir antibactérien est déjà connu ; on peut citer par exemple, le thymol du thym, ou encore la pinocembrine qui est un flavonoïde identifié récemment dans une douzaine de miels. L'activité antimicrobienne de la pinocembrine est caractérisée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Elle a été récemment détectée dans le miel de tournesol ainsi que dans la propolis. De par son effet antiseptique, elle jouerait un rôle important dans le maintien de l'hygiène à l'intérieur de la ruche. D'autres composés ayant une activité antibactérienne ont été identifiés dans le miel, on peut en citer : l'alcool benzylique, l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoïque (acide syringique), le méthyl 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoate (méthyl syringate), l'acide 3,4,5 triméthoxybenzoïque, l'acide 2-hydroxy-3-phényl propionique, l'acide 2-hydroxybenzoïque, le 1,4-dihydroxybenzène et des terpènes dont la quantité est trop faible pour contribuer de manière significative à cette activité.



I-11-2-1-5 La défensine -1

La défensine -1 est une protéine fabriquée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles. Elle est retrouvée dans le miel et gelée royale. Chez l'homme, les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité innée. Ce sont des petits peptides, de masse moléculaire variant de 3.5 à 6 kDa, qui possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne. Il a été montré récemment que la grande majorité des propriétés antibactériennes du miel provient de cette protéine (Kwakman *et al*, 2010).

I-11-2-1-6 La méthylglyoxal

Le méthylglyoxal (MGO) est un antibactérien naturel retrouvé en particulier dans le miel de Manuka (*leptospermum scoparium*).



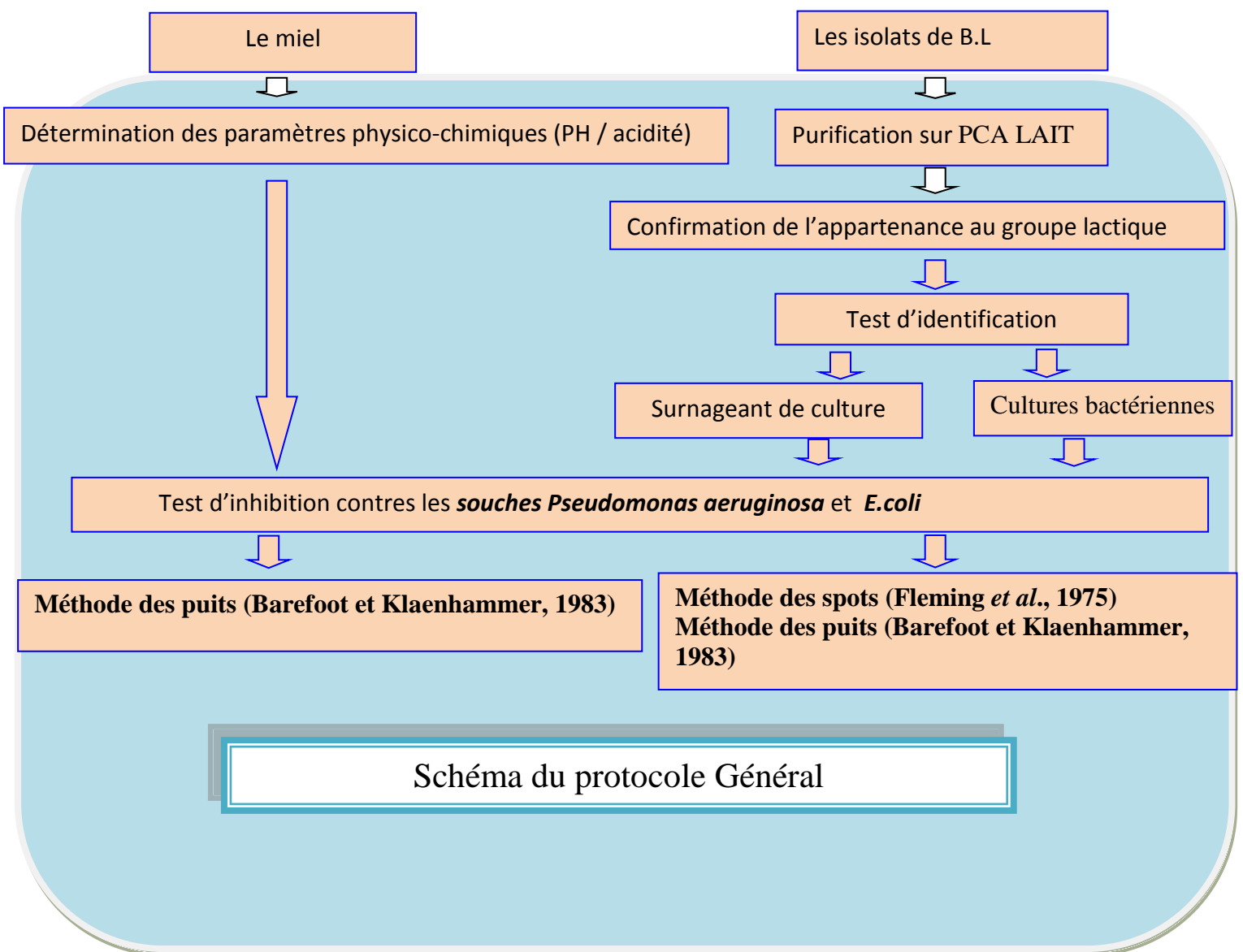
II Matériels et méthodes

II-1 Lieu de l'étude

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de sciences et techniques de production animale LSTPA DE l'université de Mostaganem et le laboratoire de Microbiologie université de Mostaganem.

II-2 Technique et méthodes expérimentales

Dans cette étude nous allons tout d'abord décrire le matériel biologique utilisé ensuite nous exposeront le protocole des différentes méthodes utilisées pour l'identification des B.L et enfin nous détailleront les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.



II-3 Le matériel biologique utilisé

II-3-1 Le miel

Pour réaliser ce travail nous avons testé l'effet de six échantillons de miel de différentes régions d'Algérie. Les échantillons de miel sont codés : M1, M2, M3, M4, M5 et M6

II-3-2 Les Bactéries lactiques

Pour effectuer ce travail nous avons testé l'effet de 58 souches de bactéries lactiques isolées à partir des différents miels précédemment cités.

Tableau n°06 : renseignement général sur les échantillons de miels

Code Miel	Origine géographique	Saison de récolte	Nombre d'isolats de Bactéries Lactiques
M1	Nord/Ouest	Eté	1
M2	Nord/Ouest	Eté	3
M3	Nord/Ouest	Eté	19
M4	Nord/Ouest	été	3
M5	Nord/Ouest	Eté	9
M6	Nord/Ouest	Eté	23

II-3-3 Les bactéries indicatrices

Le test d'évaluation des activités antibactérienne a été réalisé contre deux souches de collection internationale ATCC (American type culture collection). Il s'agit d'isolats responsables d'infections nosocomiales :

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* : ATCC
- ✓ *Escherichia coli* : ATCC

II-4 Milieux de culture

Les milieux de culture bactérienne utilisés étaient le MRS (Man et al., 1960) ; la gélose nutritive (G.N), Mac onkey, B.H .I .B et PCA Lait

II-5 Analyse physico-chimique du miel

II-5-1 Détermination du pH (Codex Alimentaire, 2001).

Ce test consiste en la détermination de la concentration du miel en ions dissociés H^+ .

II-5-1-1 Mode opératoire

On pèse 2,5 grammes de miel, on les dissout dans quelques ml d'eau distillée et on complète à 25 ml dans une fiole jaugée puis on procède au transvasement dans un bêcher. On plonge la pointe de l'électrode dans la solution et la valeur du pH s'affiche sur le pH mètre. On doit procéder à l'étalonnage du pH mètre avant de commencer à travailler..

II-6 Purification des bactéries lactiques

Ensemencement des isolats sur PCA Lait et réalisation de repiquages successifs.

II-7 Identification

L'identification des souches isolées est réalisée selon les techniques décrites par GUIRAUD et GALZY (1980), GARVIE (1986a et b), PETRANSXIENE et LAPIED, (1981) ; GUIRAUD (1998) ; BOUREL et al. 2001. La composition des milieux de cultures utilisés figure dans l'annexe 1.

II-7-1 Caractères morphologiques

Afin de déterminer leurs caractères culturaux (couleur, disposition forme et aspect), les colonies obtenues sont observées. Après la coloration de Gram, les cellules sont examinées au microscope optique (grossissement x1000).

II-7-2 Caractères biochimiques et physiologiques

II-7-2 -1 L'activité catalasique

Permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant la culture bactérienne à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.

Les bactéries lactiques sont à catalase négative.

II-7-2 - 2 Croissance dans les conditions hostiles

II-7-2 -2-1 Croissance à différentes températures (10 et 45°C)

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques **mésophiles** des bactéries lactiques **thermophiles**, ce test est réalisé en bouillon MRS.

La croissance est appréciée par un trouble du milieu après 24 heures à 10 et 45°C. En comparaison le témoin ensemencé et incubé à 30°C (Hassaine, 2013)

II-7-2 -2-2 Croissance à pH 4,5 et 9,6

Ce Test est réalisé en milieux MRS Liquide dont le pH est ajusté à 4,5 et 9,6. Des cultures témoins ont été réalisées dans du MRS à pH 6,5. La croissance est appréciée après 48 heures d'incubation à 30°C.

II-7-2 -2-3 Croissance en présence de 6,5% de NaCl

Dans ce test, nos isolats ont été cultivés en milieu MRS additionné de 6,5% de NaCl. Ce test ne donne pas d'indication sur l'identité des souches mais il permet de les caractériser. Des cultures témoins sont réalisées dans du milieu MRS. La lecture des résultats est réalisée par constatation d'une croissance bactérienne après incubation à 30°C pendant 48h

II-7-2-3 La thermorésistance

La thermorésistance est réalisée par un chauffage d'un milieu ensemencé par la bactérie à tester à une température de 63°C pendant 30 min (Stiles et Holzapfel, 1997; Teuber et Geis, 2006) puis incubation pendant 48h à 30°C. Le chauffage est réalisé dans un bain-marie.

II-7-2 -4 Le type fermentaire

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaires ou homofermentaires. Il est effectué dans un milieu dépourvu de citrate pour éviter la formation de CO₂ liée à ce métabolisme particulier et contenant comme seule source de carbone le glucose.

Chacun des isolats est ensemencé dans un tube de 10 ml de bouillon MRS (sans citrate) dans le milieu on introduit une cloche de Durham. Le CO₂ dégagé par les bactéries hétérofermentaires s'accumule dans la cloche après incubation à 30°C pendant 24h à 48 h.

II-7-2 -5 Production d'acétoïne

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer (VP) (Harrigan et McCance, 1976; Zourari et al., 1991; Facklam et Elliot, 1995) après une culture de 24h à 30°C sur milieu Clark et Lubs (annexe 1) Ajouter 5 gouttes du réactif VP1 (solution de soude NaOH à 16% dans l'eau distillée) et le même volume du réactif VP2 (alpha naphthol à 6% dans l'alcool à 95°). Agiter soigneusement les tubes et attendre un temps maximum de 10 min. La présence d'acétoïne se traduit par une coloration rose en surface mais pouvant diffuser dans tout le milieu.

II-8 Confirmation de l'identité des souches pathogènes

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture bactérienne de 18-24 heures, cultivé sur milieu gélosé et incubé à 37°. Le milieu King B a été utilisé pour *Pseudomonas aeruginosa* et Mac Conkey pour *E. coli*.

La vérification de l'identité des souches a été réalisée grâce à la coloration de Gram et le test de l'activité catalasique.

II-8-1 Etude du pouvoir antibactérien

II-8-1-1 Méthode de double couche (méthode de Fleming)

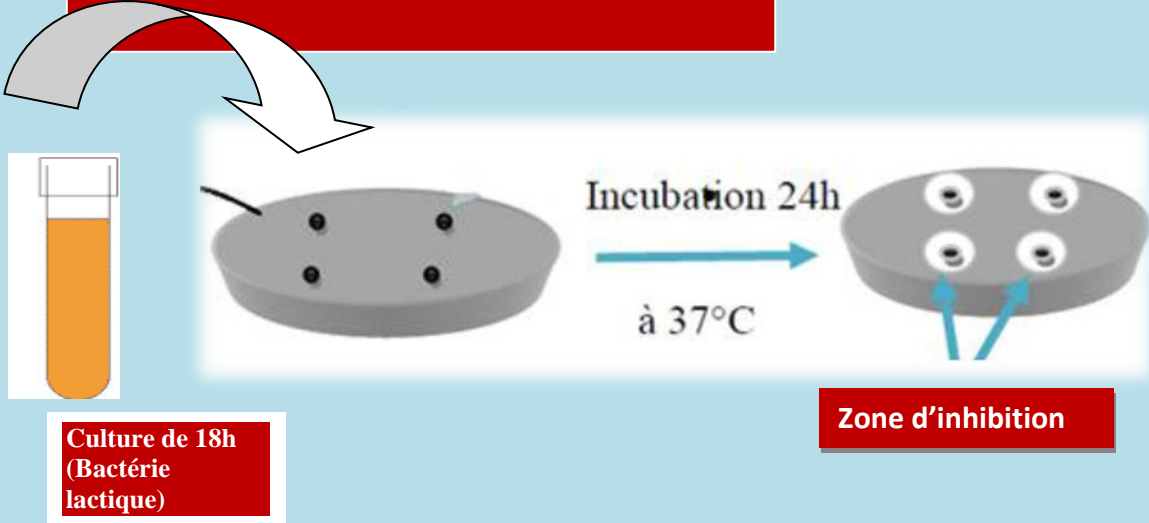
Pour mettre en évidence leur effet inhibiteur, des souches lactiques ont étéensemencées en touches à la surface d'un milieu MRS solide, puis incubées à 30°C pendant 18h. Puis une gélose molle (8 ml) contenant 0,1 ml d'une culture en milieu liquide de 18h d'une souche indicatrice (pathogène), est coulée dans les boîtes pré-incubées. La lecture des résultats a été effectuée, après une deuxième incubation de 24h à 37°C. Les souches présentant une zone transparente sont considérées comme productrices de substances antimicrobiennes (voir figure suivante).

II-8-1-2 Méthode de méthode de Barefoot et Klaenhammer .

Cette méthode est réalisée avec les miels ainsi que certaines bactéries lactiques testées pour leur effet inhibiteur. Les bactéries lactiques sont cultivées dans du milieu MRS liquide et incubées pendant une période de 18h à 30°C. Après incubation une centrifugation réfrigérée (4°C) est Réalisée à 6000 tr /min pendant 20 min. Des puits de 5 mm de diamètre sont creusés dans la gélose nutritive, pré-ensemencée en masse par la souche indicatrice (pathogène) et remplies avec 100 µL de la culture ou du surnageant de culture d'un lactobacille ou d'un échantillon de miel. Les boîtes de Pétri sont mises à une température de +4°C/4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (Doumandji *et al.*, 2010). Les boîtes sont incubées à 37°C et la présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 24h d'incubation (Hwanhlem *et al.*, 2011) (voir figure suivante).

Méthode des spots (Fleming et al., 1975)

Inoculation de souches par touches sur le milieu



Méthode des puits (Barefoot et Klaenhammer, 1983)

Centrifugation à 6000 tours /20min à 4°C

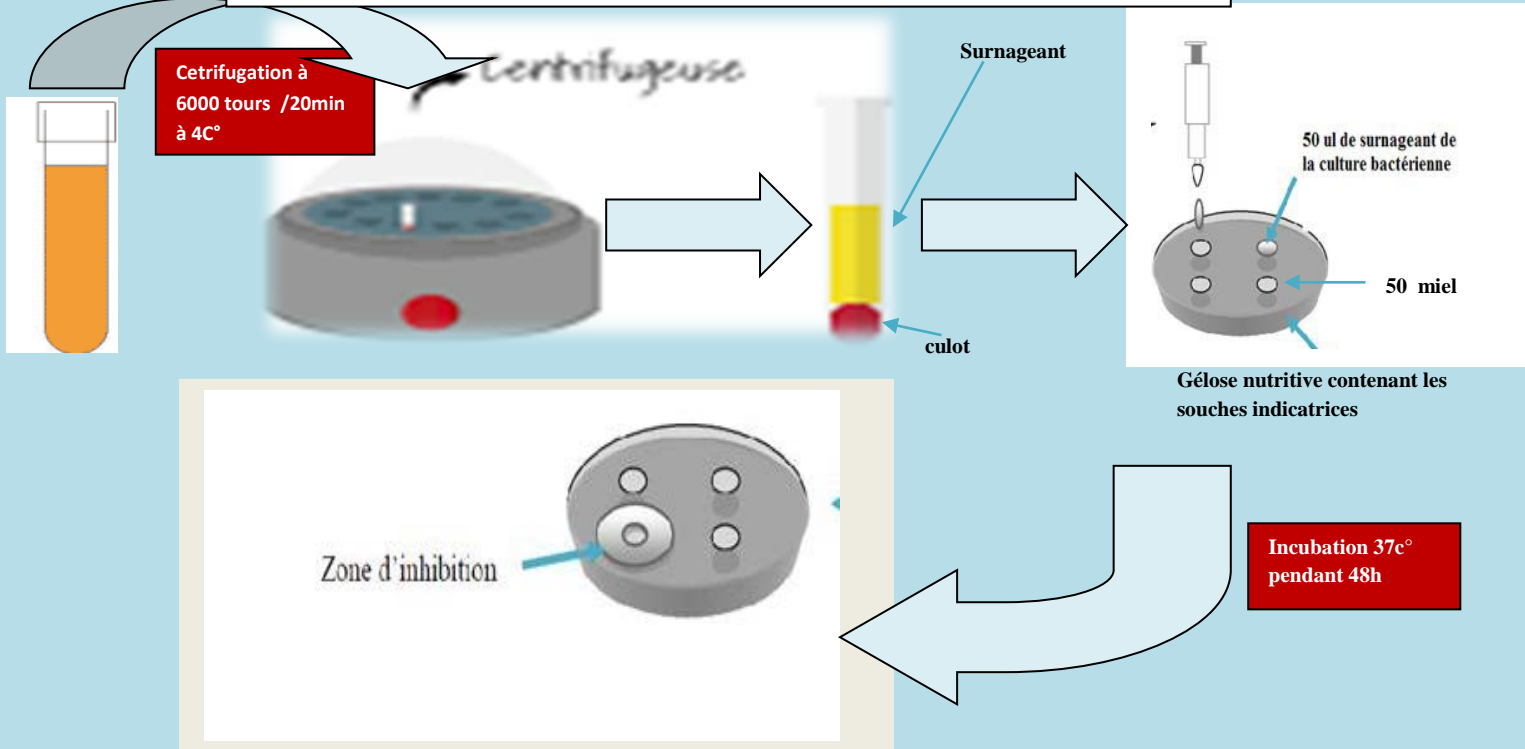


Figure 01 : Les différentes méthodes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antibactérien

III-1 Le pH des échantillons de miel

Le pH des différents échantillons mentionnés dans le tableau n° (07) varie entre 3.81 et 4.09 avec une moyenne de 4.01. Donc tous les miels analysés se sont avérés acide, Nos résultats sont conformes avec ceux décrits par Bogdanov *et al* (1999) qui ont signalé que les miels issus de nectar ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Le pH d'un aliment est l'un des principaux facteurs qui déterminent, pendant sa préparation et son stockage, la survie et la croissance des micro-organismes. Mahdeb *et al.* (2012) signalent des pH compris entre 2.66 et 4.83 et considère que les miels dont le pH est faible et proche de 3.5 sont considérés comme produits fragiles.

Tableau n°07 : valeur du pH des miels étudiés

Echantillon	pH
M1	3.90
M2	4,01
M3	4.03
M4	4.44
M5	3.81
M6	4.09

III-2 Caractérisation des bactéries lactiques

Le résultat de l'examen macroscopique des cultures obtenues sur les boîtes de pétri montre que toutes les colonies présentent les mêmes caractéristiques que celles du groupe lactique (figure 2). En effet les colonies observées sont :

- De très petites colonies
- De couleur blanche
- De forme Ronde, circulaire
- Lisse

Le résultat de l'examen macroscopique est illustré dans la figure ci-dessous

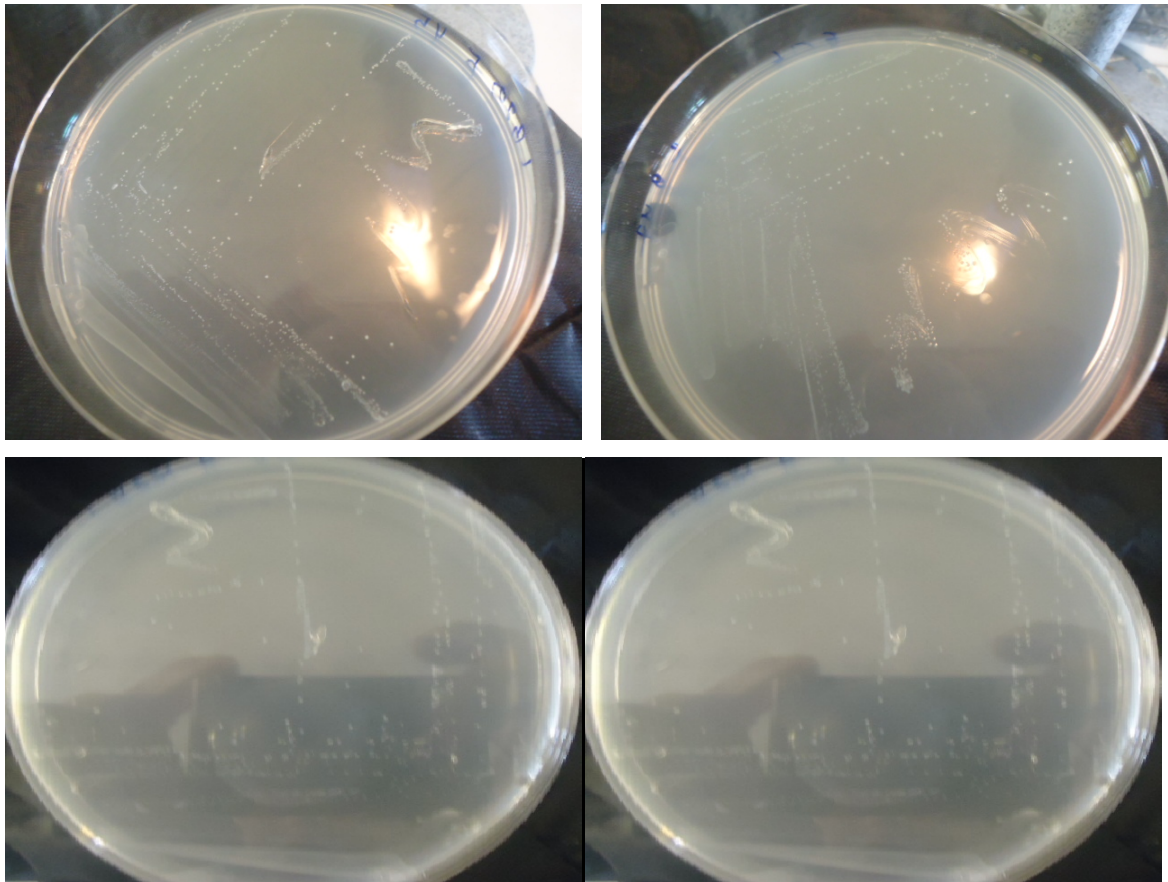


Figure 02 observations macroscopiques de certaines colonies après incubation à 30 C° pendant 24h

III-3 la coloration de Gram et le test de la catalase

III-3 -1 Coloration de Gram

L'observation au microscope optique après coloration de Gram nous a montré que tous les isolats sont à Gram positif avec 3 coques et les restants sous la forme de bâtonnets.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau n°(11) en annexe 1 ainsi que dans la figure n°(3)

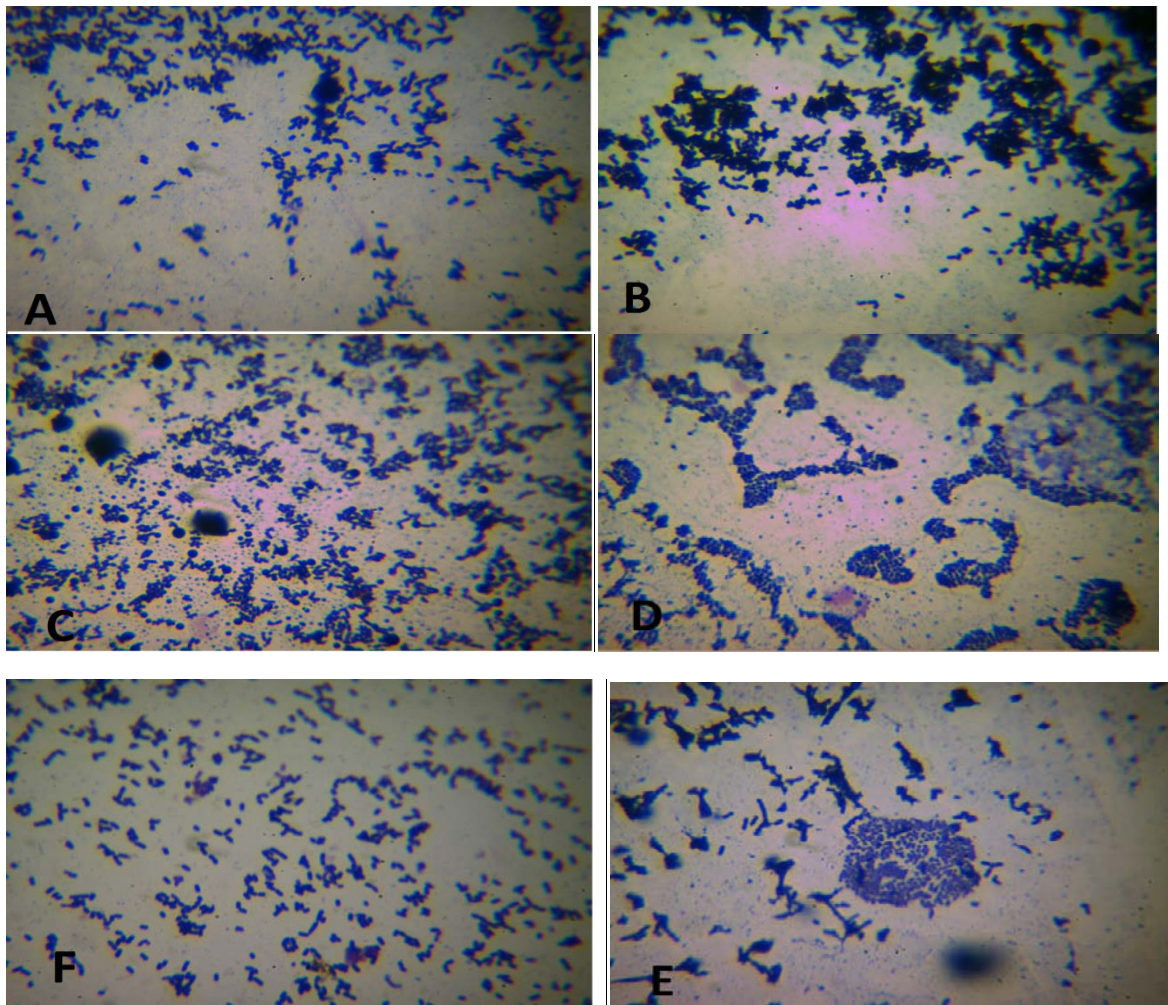


Figure n°03 aspect morphologie de certains isolats après la coloration de Gram (**A** (échantillons 04) : bacille, **B** (échantillons 01) : bacille **C**(échantillons 02) :bacille , **D** (échantillons 05) :bacille , **E** (échantillons 03) :bacille , **F**(échantillons 06) : bacille paire

Les résultats sont mentionnés dans le tableau n°(10) en annexe 1.

III-3 -2 Test de la catalase

Chez toutes les souches, nous avons constaté une absence d'activité catalasique.

Pour la suite de notre travail, nous avons retenu seulement les souches sous forme de bâtonnets c'est-à-dire seulement les lactobacilles

III-4 Croissance dans les conditions hostiles .

III-4-1 Croissance à différentes températures 10 ,30 et à 45°C

Cette étude est réalisée à 10 ,30 et à 45°C pendant 48 h. Ce test permet de faire la différence entre la flore thermophile (bactéries qui poussent à 45°C) et mésophile (bactéries qui poussent

à 10°C). La température de 30°C correspond au témoin. vingt quatre bactéries lactiques sur cinquante sept ne poussent pas à 45° C. 31 souches poussent à la température de 10°C dont 4 avec une croissance très faible. Le résultat de ces tests est résumé dans le tableau n° (10) annexe 1.



Figure n° 04 : Test de croissance à 30°C sur MRS bouillon après 24h d'incubation



Figure n° 05 : Test de croissance à 45°C sur MRS bouillon après 48 heures d'incubation

III-4-2 Test de croissance à pH 9,6 et 4,5

On remarque une croissance de la plus part des isolats sur le bouillon MRS à pH 4,5 et 9,6. Seulement 9 souches de bactéries lactiques sur 55 sont incapables de se multiplier à pH 4 et 25 à pH 9,6. La figure suivante présente une partie des résultats obtenus. Les résultats sont mentionnés dans le tableau n°(10) en annexe 1

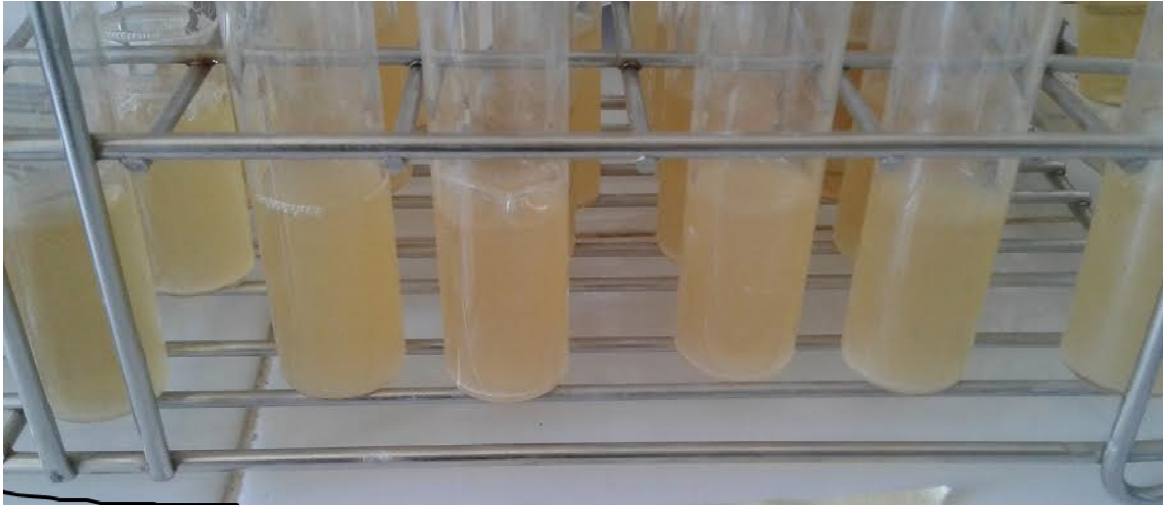


Figure n° 06: Test de croissance à pH 9.6 sur MRS bouillon après une incubation à 30°C pendant à 48 h



Figure n° 07 : Test de croissance à pH 4,5 sur MRS bouillon après une incubation à 30°C Pendant à 48 h

III-4-3 Croissance en milieu hyper Salé à 6.5% NaCl

Ce test est décrit comme donnant des résultats variable chez les lactobacilles c'est-à-dire qu'il va nous permettre juste de caractériser nos isolats en évaluant leur tolérance au NaCl.

Ce test à montré que Tous les isolats sont capables de croître en présence de 6,5 % NaCl.



Figure n° 08 : Test de croissance en présence de 6.5% NaCl sur milieu MRS bouillon après incubation à 30°C pendant **48h**.

III-5 Test de la thermo-résistance

Ce test permet de sélectionner les souches thermorésistantes. Tous les isolats ne survivent pas après leur exposition à 60° pendant 30 min. (Figure 09). Les résultats de ce test sont mentionnés dans le tableau n° (10) annexe1.



Figure n° 09 : Résultat du test de Thermo-résistance

III-6 Test du type fermentaire

Les résultats du test du type fermentaire indiquent que tous les isolats sont homofermentaires. Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau n° 10 annexe 1.



Figure n° 10 : résultat du test de type fermentaire sur bouillon MRS sans citrate après incubation à 30°C pendant 48 h

Le genre *Lactobacillus* est subdivisé en 3 groupes qui sont :

Groupe I homofermentaires

Groupe II homofermentaires ou hétérofermentaires facultatifs.

Groupe III dont les bactéries sont Hétérofermentaires obligatoires.

Tous nos isolats appartiennent donc aux groupes I ou II des lactobacilles

III-7 Production d'acétoïne :

La recherche de l'acétoïne est testée par la réaction de Voges Proskauer. Les résultats de ce test montrent que tous les isolats ne produisent pas d'acétoïne (tableau 10) annexe 1.

III-8 Les activités antibactériennes

Dans cette partie de notre travail nous avons recherché l'effet inhibiteur, de nos différents échantillons de miels et des lactobacilles isolés de ces miels, contre deux bactéries l'une appartenant au genre *E. coli* et la deuxième *P. aeruginosa*.

III-8 -1 Caractérisation des souches pathogènes

III-8 -1-1 Test macroscopique

L'examen macroscopique sur la purification de souches est illustré Dans la figure suivante

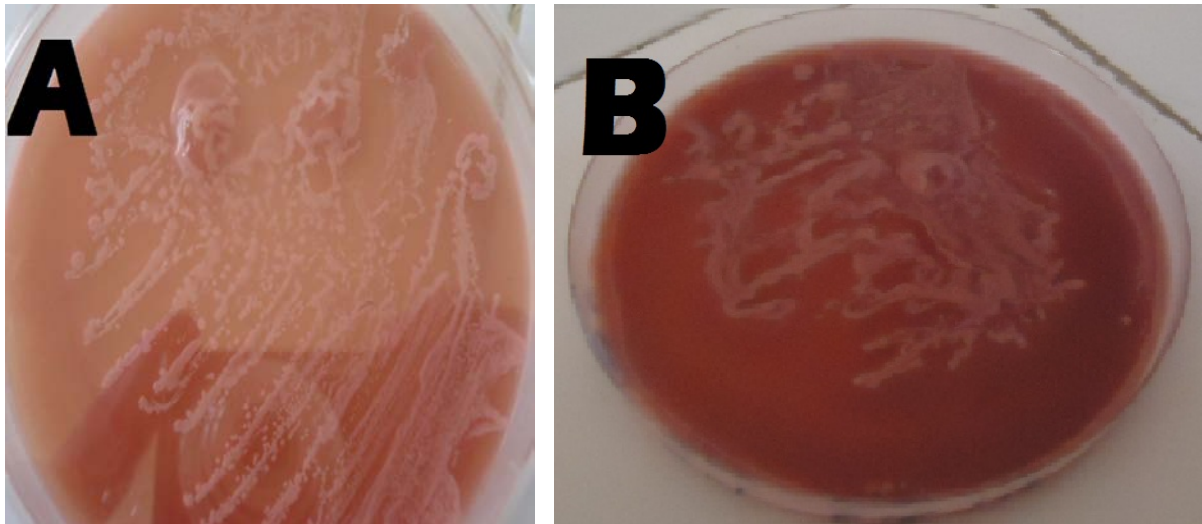


Figure n° 11 : observation macroscopique de bactéries pathogènes après d'incubation 37°C pendant 24 h. **A**(*E.Coli*) **B** (*P.aeruginosa*)

III-8 -1-2 Test microscopique des souches pathogènes

Grâce à l'observation au microscope nous avons pu observer que les souches pathogènes étaient à Gram négatif.

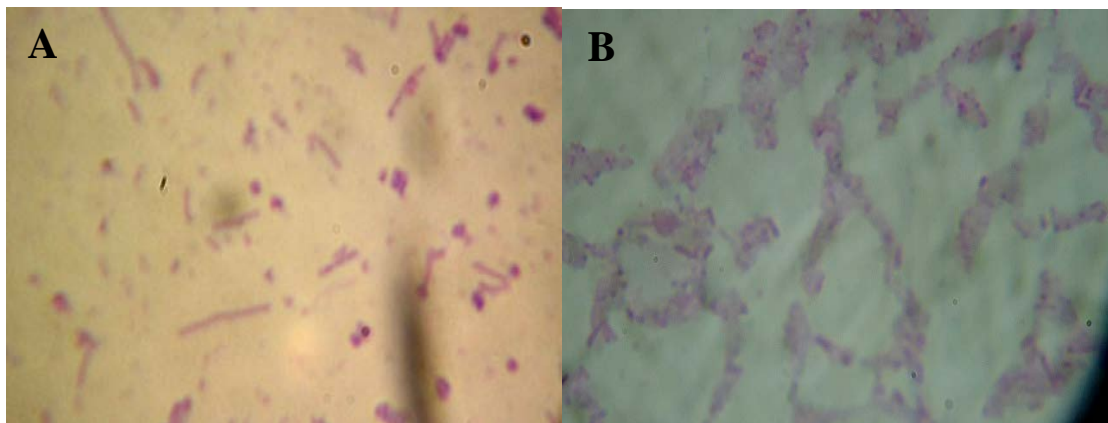


Figure n°12 : aspect morphologique des souches pathogènes après la coloration de Gram. **A** (*E. coli*) **B** (*P. aeruginosa*)

III-8 -2 Mise en évidence des inhibitions

III-8 -2-1 Méthode de Fleming ..

Les résultats observés montrent que la plupart des isolats de bactéries lactiques étudiées possèdent une activité antibactérienne mais certaines ont une plus forte activité que d'autres.

Les résultats de la mesure des zones d'inhibition sont cités dans le tableau n° (11). Les taux d'inhibition les plus élevés ont été observés avec *E.coli*. *P. aeruginosa*, s'est montrée moins sensible qu'*E.coli*.

La figure suivante représente le résultat de l'effet inhibiteur des isolats lactiques contre les bactéries pathogènes. Les résultats obtenus figurent dans le tableau en annexe 2

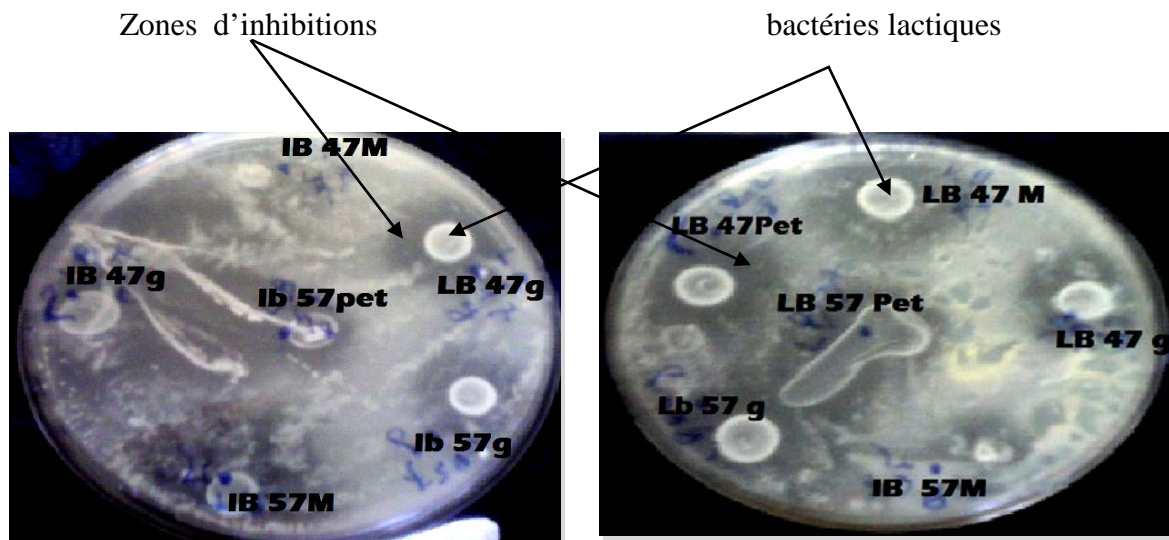


Figure n°13 : Inhibition obtenues par la méthode de Fleming des souches de bactéries lactiques, contre A (*E. coli*) et B (*P.aeruginosa*)

Par la méthode de Fleming *et al.* (1975), les deux souches indicatrices ont été inhibées par tous les isolats lactiques testés. Cependant la souche d'*E. coli* s'est avérée plus sensible que la souche de *P. aeruginosa* (voir figure suivante).

Si nous prenons en considération seulement les inhibitions s'exprimant par des zones d'inhibition dont le diamètre est supérieur à 10mm (voir figure suivante).

En prenant en considération seulement les inhibitions dont le diamètre du halo est supérieur à 10mm *E. coli* a montré la aussi une plus grande sensibilité

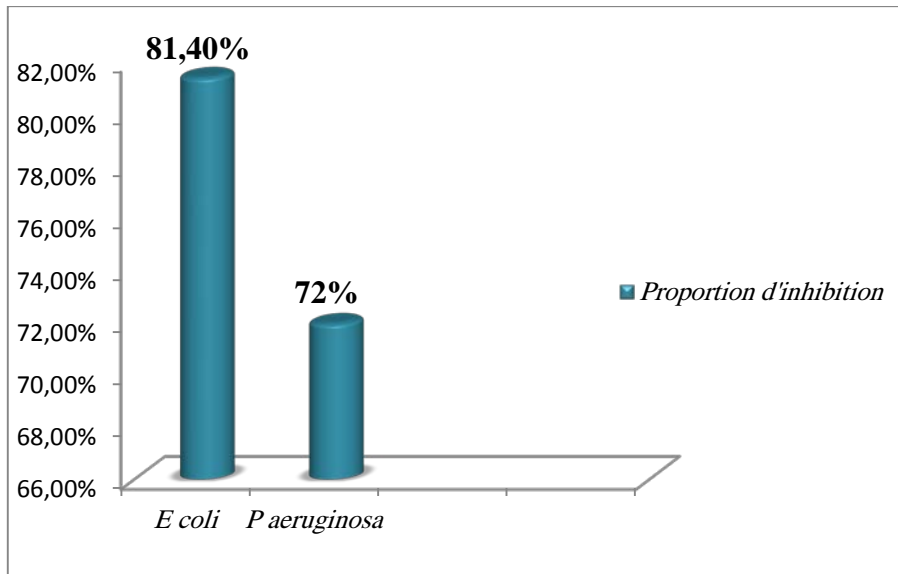


Figure n°14 : Proportion des inhibitions de diamètre supérieur à 10 mm des bactéries lactiques contre les bactéries indicatrices.

Dans le cas où on prend en compte seulement les inhibitions dont le diamètre est supérieur à 15 mm (voir figure suivante).

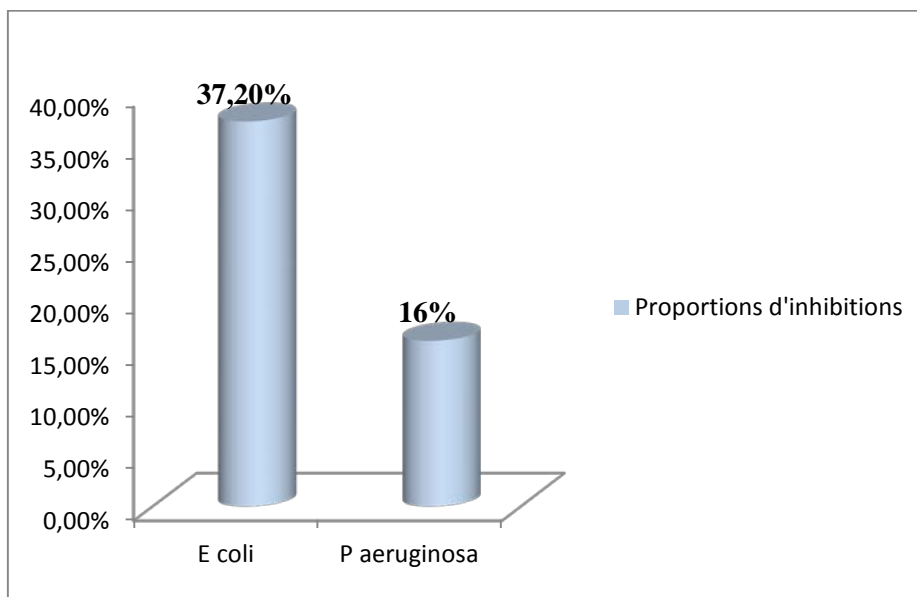


Figure n°15 : Proportion des inhibitions de diamètre supérieur à 15 mm des bactéries lactiques contre les bactéries indicatrices.

III-8 -2-2 Méthode de Barefoot et Klaenhammer

Cette méthode consiste à tester l'effet inhibiteur d'un échantillon liquide contenu dans un puits creusé dans de la gélose pré-ensemencée par une souche indicatrice. Les diamètres des zones d'inhibitions apparues après incubation sont mesurés et exprimés en mm voir tableau n°11 en annexe 1.

Par cette technique nous avons testé les échantillons de miel d'une part et des cultures de lactobacilles isolés de ces mêmes miels ainsi que leurs surnageant de cultures d'autre part.

III-8 -2-2-1 Le miel

Par ce test, nous avons essayé de détecter l'effet inhibiteur de nos échantillons de miels sur deux bactéries *E. coli* et *P.aeruginosa*. L'évaluation de cet effet inhibiteur a été appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure et le tableau suivants :

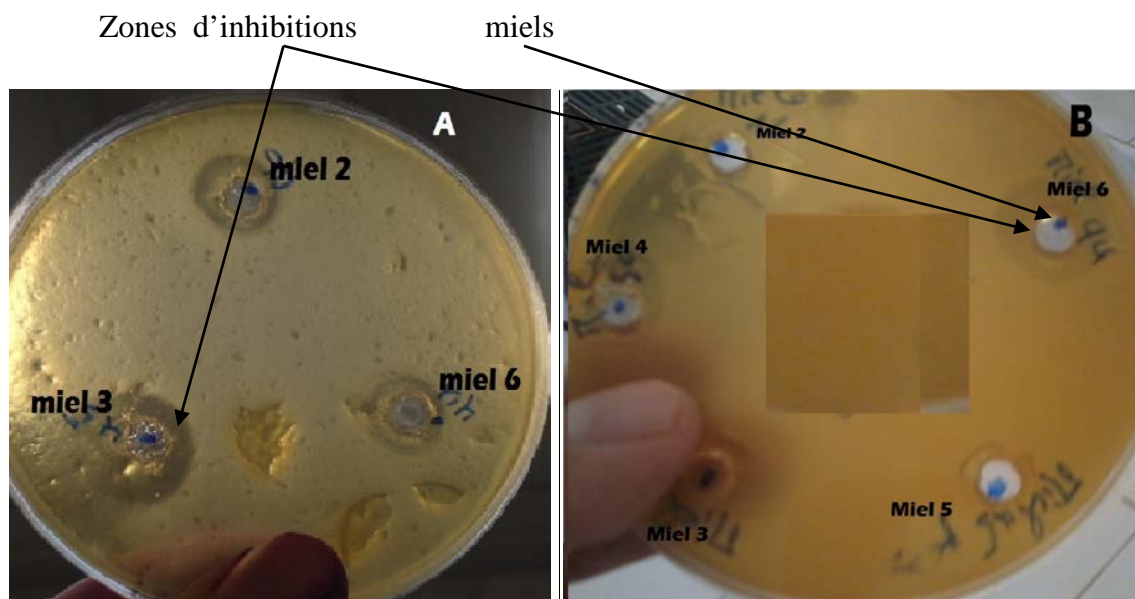


Figure n°16: zone d'inhibition des différents échantillons de miels obtenus par la méthode de Barefoot et klaenhammer (1983) Contre A (*E. coli*) et B (*P.aeruginosa*)

Tableau n°08 : Résultats de l'effet inhibiteur des différents échantillons de miels

Miels	Bactérie	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
M1	10	08
M2	12	08
M3	12	10
M4	08	08
M5	10	05
M6	11	12

Les diamètres des zones d'inhibitions sont exprimés en mm.

A l'issue de ce test des zones d'inhibition ont été observées autour des puits dans le cas de l'utilisation des miels. L'analyse de ces résultats montre que les zones d'inhibition contre *E. coli* sont plus larges pour le miel M3 et M2 avec un diamètre de 12 mm tandis que la zone d'inhibition contre *P.aeruginosa* est plus prononcée pour le miel M6 avec un diamètre de 12 mm. Nous pouvons dire que les miels exercent des effets différents sur les deux souches indicatrices.

III-8 -2-2-2 Culture bactérienne et surnageant de culture

Dans ce test des Zones d'inhibitions ont été observés autour de 48 et 49 des cultures bactériennes sur contre *E.Coli* et *P.aeruginosa*.

Le résultat d'inhibition contre *E.coli* et *p. aeruginosa* par les surnageant ont montré que vingt quatre des surnageant inhibent la souhe *E.Coli* et vingt sept inhibent *P.aeruginosa* (tableau n°11)

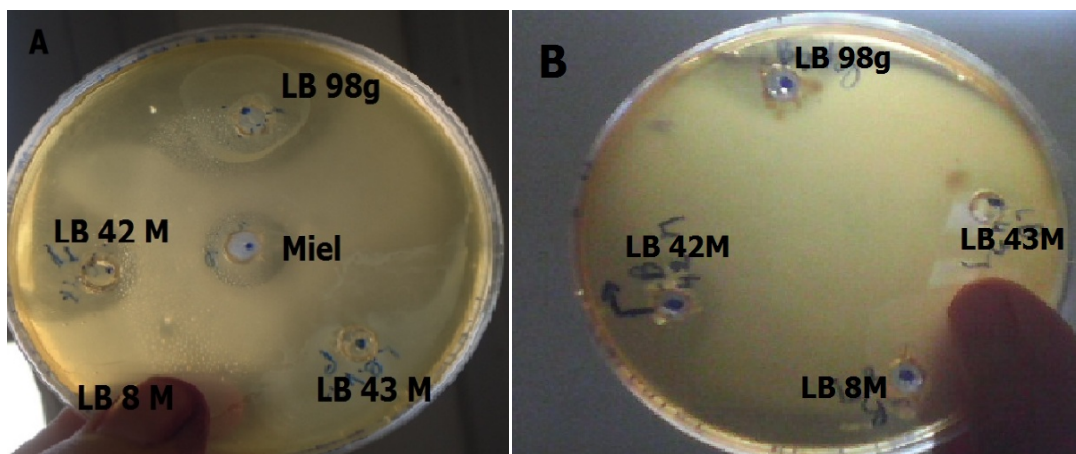


Figure n°17 : Inhibitions obtenues par la méthode de Barefoot et klaenhammer de cultures bactériennes et miel contre A (*E. coli*) et B (*p.aeruginosa*)

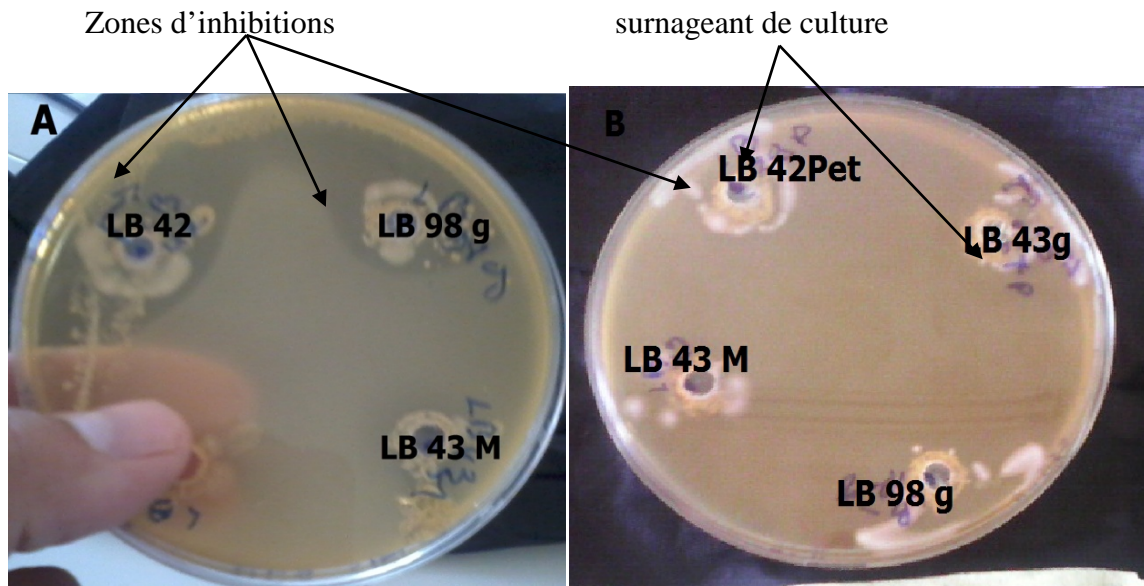


Figure n°18 / Inhibitions obtenues par la méthode de Barefoot et Kleanhammer de *surnageant de culture* contre A (*E. coli*) et B (*p. aeruginosa*.)

Tableau n°09 : Spectre d'activité antibactérienne des bactéries lactiques par la Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983)

Souches bactérie lactique	Méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983)			
	culture		Surnageant de culture	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Lb: 29.3	/	/	/	/
Lb: 64.1	08	08	/	/
Lb: 64 .3	/	/	/	/
Lb: 64 .2	/	/	/	/
Lb : 63	/	/	/	/
Lb : 35	10	12	10	08
Lb : 43	12	12	20	14
Lb : 3	10	10	05	08
Lb : 38	/	/	08	10
Lb : 63.1	/	/	/	/
Lb : 38	/	/	10	10
Lb : 98 .3	05	05	18	14
Lb : 97	05	05	13	15
Lb : 35.2	05	03	10	10
Lb : 66 .3	05	05	08	08

Les diamètres des zones d'inhibition sont exprimés en mm.

LB : bactérie lactique

/ : Non déterminé

Les résultats obtenus montrent que par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) dans le cas de certains lactobacilles l'effet inhibiteur des surnageants de cultures était plus important que celui des cultures en effet certains auteurs ont mis en évidence que certains agents inhibiteurs ont la possibilité de rester attachés aux parois cellulaires d'où une diffusion beaucoup plus faible qui aura pour conséquence un effet inhibiteur plus réduit (**Yang et al., 1992 ; Hartmann et al., 2011**).

Discussion

IV -1 pH

Le pH des différents échantillons mentionnés sur le tableau n° (07) varient entre 3.81 et 4.09 avec une moyenne de 4.01. Donc tous les miels analysés ont été jugés acides, Nos résultats sont conformes avec ceux représentés par Bogdanov *et al.* (1999) qui ont signalé que les miels issus de nectar ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Le pH des miels de fleur est plus bas que les miels de miellat (Bogdanov, 2006). Le pH d'un aliment est l'un des principaux facteurs qui déterminent, pendant sa préparation et son stockage, la survie et la croissance des micro-organismes. Mahdeb *et al.* (2012) signalent des pH compris entre 2.66 et 4.83 et considère que les miels dont le pH est faible et proche de 3.5 sont considérés comme produits fragiles.

IV -2 Identification des bactéries lactiques

Cinquante huit bactéries isolées à partir de six échantillons de miels crus ont été purifiées sur milieu PCA Lait. La majorité de ces isolats ont été isolée à partir de l'échantillon de miel M6 avec un nombre total de vingt sept isolats, puis vient l'échantillon M3 avec un nombre total de 13 isolats, ensuite on a l'échantillon M5 (neuf isolats). Le nombre d'isolats provenant des échantillons M2 et M4 est de 3 isolats pour chacun et enfin on a l'échantillon M1 avec un seul isolat. Des tests d'identification ont été effectués sur ces isolats afin d'essayer de déterminer leur groupe. La coloration de gram et le test de catalase ont révélé que tous les isolats sont catalase négatifs et à Gram positif. Ce sont donc des bactéries du groupe lactique. Cinquante isolats sur cinquante huit sont de forme bâtonnet et sont homofermentaire (tableau n°07). Nous supposons donc que ce sont des lactobacilles soit appartenant au groupe *Thermobacterium* ou bien au groupe *Betabacterium*. On constate que tous les isolats poussent très bien à la température de 30°C et en présence de 6,5% NaCl. Les tests ont montré aussi que la majorité des isolats sont capables de croître à pH 9.6 et à pH 4.5 à l'exception de 6 isolats (LB44-1, LB47-2, LB97, LB3, LB44-1, LB47-2). On constate que les isolats (LB 65-1, LB66-1, LB65-3, LB66-3, LB 44-3, LB120, LB43-3, LB 97, LB3, B67, LB38, poussent très bien à la température de 45°C mais ne poussent ou ont une très faible croissance à la température de 10°C ce sont donc des thermophiles. En ce qui concerne les tests technologiques on constate que tous les isolats n'ont pas résisté à un chauffage de 30min à 60,5°C au bain Marie et ils ne produisent pas de l'acétoïne sur milieu Clark et Lubs. D'autres tests sont indispensables afin de pouvoir identifier et caractériser nos isolats par rapport à l'espèce à laquelle ils appartiennent.

IV -3 Pouvoir antibactérien des échantillons de miels

La puissante activité du miel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel sur des plaies, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricide et bactériostatique du miel.

Escherichia coli est connu depuis longtemps comme une bactérie commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines catégories d'*E. coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés.

Dans notre étude des miels crus ont été testés pour leur activité antibactérienne sur *E.Coli* et *P. aeruginosa* par la méthode de diffusion en puits. Le principe de cette méthode consiste à mettre en évidence l'effet inhibiteur d'échantillons liquides sur des microorganismes ensemencés dans la masse en boîtes de Petri. Ces échantillons ont montré une activité inhibitrice sur les microorganismes testés mais à des degrés différents. D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, on peut constater ce qui suit :

- les deux souches microbiennes testées sont sensibles à l'action inhibitrice des six échantillons de miels naturels, avec des différences d'un type à un autre et d'une souche à l'autre, ce qui indique un large spectre d'action antibactérienne et une efficacité par inhibition de tous nos miels.
- les zones d'inhibitions ont une taille de 8 à 12 mm en ce qui concerne *E.coli* et entre 5 et 12 mm en ce qui concerne *P.eruginosa*.
- Les échantillons de miels M2 et M3 ont montré l'effet inhibiteur le plus grand sur *E.Coli* Alors que l'échantillon M6 est l'échantillon le plus efficace contre *P. aeruginosa*.
- La souche *E. coli* est relativement plus sensible à l'effet de tous les échantillons de miel en comparaison avec *Pseudomonas aeruginosa* à l'exception de l'échantillon M6.

L'action du miel naturel sur les microorganismes dépend, d'une part de la structure de la paroi de la cellule cible, et d'autre part de la composition du miel lui-même.

La composition du miel elle-même dépend à son tour de nombreux facteurs, tels que : la nature du sol, la race des abeilles et l'état physiologique de la colonie.

Blair *et al.*, (2009), ont étudié *in vitro* le potentiel antibactérien du miel sur *E.Coli*. ils ont démontré que la croissance d'*E.coli* était inhibée lorsque l'on ajoute du miel dilué à des concentrations (6.3% et 8.5%) au milieu de culture.

L'étude de Domerego (1997) apporte des preuves que le miel naturel paraît deux fois plus cicatrisant que les autres produits utilisés, à savoir, la BIOGAZE ® et le DEBRISANT ®. La BIOGAZE® est un pansement gras protecteur composé d'une compresse imprégnée d'huile essentielle de niaouli et de thym, et de lanoline ; le DEBRISANT® (dextranomère) est un pansement osmotique utilisé pour la détersion des plaies chronique, et qui existe sous forme de poudre ou de pâte.

IV -4 Pouvoir antibactérien des bactéries lactiques isolées à partir de miels

Dans cette partie de notre étude les bactéries lactiques isolées à partir des échantillons de miel ont été testés par deux méthodes différentes pour leurs activités antibactériennes sur *E.Coli* et *P. aeruginosa*. La première méthode est celle de Fleming *et al.* (1975) ou la méthode directe, La sensibilité des souches indicatrices aux bactéries lactiques testé est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition visibles autour des souches testées en touche. La deuxième méthode est la méthode des puits qui est basée sur le principe de la capacité de ces substances à diffuser dans un milieu semi solide.

Ces Bactéries ont montré une activité inhibitrice sur les microorganismes testés, mais à des degrés différents. En effet l'ampleur de l'effet inhibiteur dépend, des isolats de bactéries lactiques utilisés comme agents inhibiteurs, des souches indicatrices testées et de la méthode utilisée.

L'étude du pouvoir antibactérien des lactobacilles lactiques par la méthode de Fleming *et al.*, (1975) a donné de meilleurs résultats que la méthode de Barefoot et Klaenhammer, 1983.

Les résultats concernant l'activité antimicrobienne obtenue par la méthode des spots montre que la souche *E.coli* est beaucoup plus sensible aux différentes bactéries lactique que *P. aeruginosa* mise à part les isolats (LB35-3, LB38-3, LB58, LB29, lb3 et LB63) dont la zone d'inhibition est légèrement plus grande. Le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 et 20mm contre *E.Coli* et entre 5-20mm contre *P.aeruginosa*. Il est à noter que l'activité antimicrobienne la plus élevée a été enregistrée avec la culture LB42-1 qui provient de l'échantillon M6 avec un diamètre de 20 mm pour *E.coli* et 18 mm pour *P.aeruginosa*.

Le diagramme suivant nous montre la zone d'inhibition la plus élevée pour chaque échantillon de miel.

L'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion en puits a été testée avec des cultures bactériennes et des surnageants. Les résultats obtenus ont montré que Les taux d'inhibition les plus élevées on été observés avec *E.coli*. *P. aeruginosa* s'était montrée moins sensible qu'*E.coli*. On remarque que dans certain cas (LB63-4, LB-89-1, LB47-1), le surnageant a un plus grand pouvoir inhibiteur que la culture elle-même.

L'inhibition des bactéries pathogènes par les bactéries lactiques peut avoir plusieurs origines parmi lesquelles, nous pouvons mentionner la production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène et/ou de bactériocines (GUESSAS *et al.*, 2005; Todorov et DICKS, 2005; Moreno *et al.*, 2000; Navarro *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002; MALDONADO *et al.*, 2003)

Conclusion

Le miel est une substance sucrée produite par les abeilles à partir de nectar.

Notre travail a porté sur cinquante huit (58) bactéries du groupe lactique isolées à partir de différents miels crus. 50 isolats se sont avérés être des lactobacilles.

Les résultats de la pré-identification, nous permettent de dire que tous nos lactobacilles appartiennent aux groupes I et II du genre *lactobacillus*. Une identification plus poussée, nous permettra de situer avec plus de précision nos isolats parmi les espèces du genre *Lactobacillus*.

En deuxième partie de notre travail, nous avons étudié l'acidité de six (6) différents miels. Les résultats obtenus montrent un pH compris entre 3,5 et 4,5. Nous pouvons donc dire que dans tous les cas il s'agit de miels de nectar.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet inhibiteur de nos miels et nos lactobacilles contre deux souches pathogènes (*E. coli* et *P. aeruginosa*). Pour cela, deux méthodes ont été utilisées, celle de Fleming et al. (1975) par laquelle, nous avons testé les cultures bactériennes et la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) par laquelle, nous avons testé les miels, les cultures liquides les surnageants de culture de nos isolats lactiques.

Tous les miels ont montré un effet inhibiteur sur les deux indicatrices pathogènes cependant *E. coli* s'est montrée plus sensible. De plus le miel M6 a donné l'effet inhibiteur le plus grand et le miel M4 le plus faible.

Concernant les isolats lactiques ils ont tous montré un effet inhibiteur contre les deux indicatrices par la méthode de Fleming *et al.*, (1975). Par cette même méthode l'indicatrice *E. coli* s'est avérée plus sensible que *P. aeruginosa*. Par la méthode de Barefoot et Klaenhammer (1983) seuls certains isolats ont montré un effet inhibiteur. Pour les autres une faible concentration en inhibiteur ou une dégradation sont responsables de l'absence de l'effet inhibiteur.

Ce travail pourra être complété par :

- La réalisation d'autres tests pour identifier l'espèce des lactobacilles par des méthodes pasteuriennes et des méthodes moléculaires.
- La détermination de la nature de l'agent inhibiteur dans le cas de chacune des indicatrices.

- La détermination de la composition de chacun des miels afin de pouvoir les comparer selon leurs aptitudes inhibitrices.
- Le test de nos différents miels contre d'autres bactéries et surtout des bactéries nosocomiales.
- L'analyse par des méthodes biochimiques des échantillons de miels surtout le miel M6 pour déterminer avec précision, la nature de l'agent inhibiteur.

Tableau n°10 : Tests d'identification des souches lactiques

Souche	Catalase	Gram	forme	10C°	45C°	PH 9,6	P h 4	NaCl 6,5%	Thermoré sistante	Type fermentaire	Clark et lubs
LB 42 - 2	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 89--2	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
L B 120	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 43 - 3	-	+	Bacille	+/-	+		+	+	-	Homo	-
LB 43 - 2	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 106	-	+	Bacille	-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 97	-	+	Coque	-	+	+	-	+	-	Homo	-
LB 38- 1	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 3	-	+	Bacille	-	+	+	-	+	-	Homo	-
LB 67 - 3	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 38 - 3	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 67 - 2	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 63 - 3	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 65 - 3	-	-	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 65 - 1	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 64 - 3	-	+	Bacille	-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 63 - 2	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 63 - 1	-	+	Bacille	+/-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 64 - 2	-	+	Bacille	-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 66 - 1	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 65 - 3	-	+	Bacille	+/-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 65 - 2	-	+	Bacille	-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 66 - 2	-	+	Bacille	-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 47 - 1	-	+	Bacille	-	-	+	+	+	-	Homo	-
LB 125 - 1	-	+	Cocco	-	+	+	+	+	-	Homo	-
LB 66 - 3	-	+	Coque	-	+	+	-	+	-	Homo	-
LB 44 - 3	-	+	Coque	-	-	-	-	+	-	Homo	-

Souche	Catalase	Gram	forme	10C°	45C°	PH 9,6	P h 4	NaCl 6,5%	Thermo-résistante	Type fermentaire	Clark et lubs
LB 44 - 1	-	+	Bacille	+	-	-	-	+	-	Homo	-
LB 47 - 2	-	+	Bacille	-	-	-	-	+	-	homo	-
LB 35 - 1	-	+	Cocco	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 57 - 1	-	+	Bacille	+	+/-	-	+	+	-	homo	-
LB 35 - 3	-	+	Bacille	+	+/-	-	+	+	-	homo	-
LB 1 - 3	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 57-2	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 89-1	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 43-1	-	+	Bacille	+	+	+	+	+	-	homo	-
LB 57 - 3	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 29 - 3	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 29 - 2	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 1 - 1	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 12' - 1	-	+	Bacille	+	-	+	+	+	-	homo	-
LB 12' - 3	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 12' - 2	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 35 - 2	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 42 - 1	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 1.2	-	+	Bacille	+	-	+	+	+	-	homo	-
LB 47 - 3	-	+	Bacille	-	-	-	-	+	-	homo	-
LB 67 - 1	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 13' - 2	-	+	Bacille	+	+	+	+	+	-	homo	-
LB 8 - 1	-	+	Bacille	+	+	-	+	+	-	homo	-
LB 43 - 3	-	+	Bacille	-	+	+	+	+	-	homo	-
LB 98 - 3	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 13' - 2	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-
LB 64 -1	-	+	Bacille	+	/	+	+	+	-	homo	-
LB 98 -3	-	+	Bacille	+	-	-	+	+	-	homo	-

Souche	Catalase	Gram	forme	10C°	45C°	PH 9,6	P h 4	NaCl 6,5%	Thermo-résistante	Type fermentaire	Clark et lubs
LB 8 - 3	-	+	Bacille	+	/	/	/	+	-	homo	-
LB 8 -2	-	+	Bacille	+	/	/	+	+	-	homo	-
LB 32	-	+	Bacille	+	/	/	/	+	-	homo	-

Homo : homofermentaire

/ : non déterminé

- : il n'y a pas croissances

+/- : Ratio croissances faible.

+ : croissances

Tableau n°11: Résultats des tests de mise en évidence des effets inhibiteurs des lactobacilles

isolats lactiques	Méthodes utilisées					
	Barefoot et Klaenhammer (1983)				Fleming <i>et al.</i> (1975)	
	Cultures		<i>Surnageants de cultures</i>			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
LB : 63.1	08	05	/	/	12	10
Lb : 8.3	10	08	/	/	12	12
Lb : 8.1	10	09	/	/	15	10
Lb : 63.3	08	05	10	12	20	12
La : 43.3	10	11	/	/	15	10
Lb : 89.2	12	10	/	/	13	09
Lb : 125.1	09	08	/	/	15	13
Lb : 44.1	10	13	/	/	15	12
Lb : 89.1	09	06	10	13	15	13
Lb : 1.3	05	12	/	/	14	12
Lb : 1.2	08	08	/	/	08	10
Lb : 63.3	10	10	/	/	12	12
Lb : 47.1	05	04	08	12	18	14
Lb : 47.2	05	08	08	10	13	15
Lb : 47.3	05	06	08	15	12	15
Lb : 57.3	10	09	15	12	12	12
Lb : 57.2	10	11	12	10	12	12
Lb : 57.1	/	/	10	09	12	12
Lb : 66.3	/	/	08	10	14	12
Lb : 12.3	10	12	15	12	14	15
Lb : 65.2	05	05	/	/	14	10
Lb : 66.2	05	09	/	/	14	15
Lb : 67.2	05	05	10	12	10	14
Lb : 97	/	/	12	12	17	12
Lb : 29.1	10	12	15	13	10	10
Lb : 12.1	/	/	15	12	15	13
Lb : 12.2	10	10	/	/	13	10
Lb : 66.1	08	10	/	/	13	12
Lb : 29.2	10	09	/	/	15	12
Lb : 120	09	15	/	/	20	15
Lb : 42.1	10	08	13	10	20	18
Lb : 44.3	08	05	/	/	18	14
Lb : 42.2	10	05	10	12	09	10
Lb : 13.2	08	08	/	/	12	10
Lb : 43.2	12	12	08	08	17	12
Lb : 38.3	10	15	10	10	09	10
Lb : 35.3	10	13	/	/	10	12
Lb : 37	/	/	/	/	11	12
Lb 58	/	/	/	/	15	13
Lb : 106	10	12	13	13	12	12
Lb : 35.1	12	12	/	/	17	15
Lb : 8.2	/	/	/	/	12	12

Le diamètre des halos d'inhibition est exprimé en mm.

*Composition des milieux de culture***Milieu MRS gélose (Man et al ,1960)**

✓ Peptone	10g
✓ Extrait de viande	10g
✓ Extrait de levure	5g
✓ Glucose	20g
✓ Tweenn80	1ml
✓ Phosphate di potassique	2g
✓ Acétate de sodium	5g
✓ Citrate d'ammonium	2g
✓ Sulfate de magnésium	0.2g
✓ Sulfate de Maganése	0,5g
✓ Agar- agar	15g
✓ Eau distillée	1l

- Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min

Milieu MRS bouillon (sans citrate) (Man et al ,1960)

✓ Peptone	10g
✓ Extrait de viande	10g
✓ Extrait de levure	5g
✓ Glucose	20g
✓ Tweenn80	1ml
✓ Phosphate di potassique	2g
✓ Acétate de sodium	5g
✓ Sulfate de magnésium	0.2g
✓ Sulfate de Maganéés	0,5g
✓ Eau distillée	1l

- Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min

Milieu Gélose nutritive (source)

✓ Extrait de viande	3 g
✓ Peptone de viande	3 g
✓ Peptone de caséine	4 g
✓ Peptone de soja	3 g
✓ Agar- agar	10g
✓ NaCl	5 g

PH 7.2

Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min

Milieu Mac Conkey :

✓ Peptone pancréatique de gélatine	17,0 g
✓ Tryptone	1,5 g
✓ Peptone pepsique de viande	1,5 g
✓ Lactose	10,0 g
✓ Sels biliaires	1,5 g
✓ Chlorure de sodium	5,0 g
✓ Rouge neutre	30,0 mg
✓ Cristal violet	1,0 mg
✓ Agar agar bactériologique	13,5 g
✓ Eau distillée	1l

Milieu PCA Lait :

✓ Peptone de Caseine	5g
✓ Extrait de levure	2.5g
✓ Glucose	1g
✓ Agar	20g
✓ Lait poudre	1g
✓ Eau distillée	1l

Stérilisation par autoclavage à 120 C° Pendant 15 min

Références bibliographiques

- **APAN A., 2002** - Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des miels de quelques marchés des Hauts Plateaux de l'Ouest Cameroun. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome, Option Productions Animales, Université de Dschang, FASA, 40 p
- **AXELSSON, L. (1993)**. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Salminen S. and von Wright A., pp: 1-63. Marcel Dekker Inc. New York.
- **BLANC M., 2010** - Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de doctorat, Univ. Limoges, 142 p.
- **Bogdanov, S. et al. Honig Quality and International Regulatory Standards (1999)** Review of the Work of the International Honey Commission. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 90, in pressa
- **Bourel G., Henini S., Krantar K., Oraby M., Divits C., Garmyn D., 2001.** Metabolism sucre-citrate chez leuconostoc mesenteroides. Lait 81:75-505.
- **Barefoot S.F., Klaenhammer T.R., 1983.** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by lactobacillus acidophilus. Apple Environ Microbiol. 45(6):1808-1815.
- **BARBONI T., 2006** - Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes) EGE (et de risques d'incendie. Thèse de doctorat, Univ. Bretagne, 292 p.
- **BOGDANOV S., BIERI K., GREMAUD G., IFF D., KANZIG A., SEILER K., STOCKLI H. et ZURCHER K., 2003** - Produits Apicoles. 23 A Miel, 1-37.
- **BOGDANOV S., BIERI K., GREMAUD G., IFF D., KANZIG A., SEILER K., STOCKLI H. et ZURCHER K., 2003** - Produits Apicoles. 23 A Miel, 1-37.
- **BOGDANOV S., LÜLLMANN C., MARTIN P., WERNER V.O., HARALD R., GÜNTHER V., LIVIA P.O., ANNA G.S., MARCAZZAN G.L., PIRO R., FLAMINI C., MORLOT M., LHERITIER J., BORNECK R., MARIOLEAS P., TSIGOURI A., KERKVLIT J., ORTIZ A., IVANOV T., D'ARCY B., MOSSEL B. et VIT P., 2001** - Qualité Du Miel et Normes Internationales Relatives Au Miel. RAPPORT DE LA COMMISSION INTERNATIONALE DU MIEL. APISERVICES, Galerie Apicole Virtuelle.

- **BRADBEAR N., 2005** - Apiculture et moyens d'existence durables. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. ISSN 1813-6001, Rome, 64 p
- **Bogdanov S, & Blumer P (2001)** . Propriétés antibiotiques naturelles du miel .Revue Suisse d'Apiculture, 98(3) : 107-114.
- **Bogdanov S , Martin P ,Lullmann C , (1997)**- Harmonised methods of the European Honey Commission. Apidologie (extra issue): 1-59
- **BACUS, J.N. and BROWN, W.L. (1985b)**. The pediococci: meat products. In: Bacterial Starter Cultures for foods. Gilliland S. E., 7, pp: 86-96. CRC Press Inc. Boca Baton. Florida.
- **BOGDANOV S., BIERI K., GREMAUD G., IFF D., KANZIG A., SEILER K., STOCKLI H. et ZURCHER K., 2003** - Produits Apicoles. 23 A Miel, 1-37.
- **CANINI A., DE SANTIS L., LEONARDI D., DI GIUSTINO P., ABBALE F., DAMESSE E. et COZZANI R., 2005** - Qualificazione dei mielic e piante nettariifere del Camerun Occidentale. La Rivista di Scienza dell'Alimentazione, anno 34 n, 4
- **Chauvin R. (1968)**. Traité de la biologie de l'abeille, Masson et Cie , éditeurs ,paris PP : 66-81et 277-319.
- **CHAPMAN, H.R. and SHARPE, M.E. (1981)**. Microbiology of cheese. In: Dairy Microbiology, Robinson R.K., Eds., Vol. 2, The microbiology of milk products, Applied Sciences Publishers LTD, London, pp: 157-243.
- **DFID. 2000**. *Bees for wealth and health: Wambui fi nds out*. Ministry of Agriculture ET Rural Development, Nairobi, Kenya.
- **De Man, J., Rogosan M.et Sharpe ,M.E., 1960**. A medium for the cultivatation of Lactobacilli, J.Appl.Bacteriol. 23:130-135.
- **Doumandji A.,Hellal A .,Saidi N.,2010**. identification de La Bactériocine a partir de lactobacilles acidophiles 11Rev. Microbiologie. Inde San et Environn,4 :25-47
- **DAVID H., CARLOS A. U. and GOMEZ-CORDOVES C., 2011**- Role of honey polyphones in health. Journal of Api Product and Api Médical Science, 3 (4), 141 – 159.
- **DONADIEU Y., 2008** Les Produits De La Ruche. Thérapeutiques naturelles. Edit, Maloine S. A, Paris.
- **DEVOYOD, J.J. et POUILLAIN F. (1988)**. Les Leuconostocs propriétés : leur rôle en technologie laitière. *Revue Le lait*, 68 (3), pp: 249-280.

- **DELLAGLIO, F., SARRA, P.G. and VESCOVO, M. (1981A)**. DNA homology of *Pediococcus* strains isolated from some Italian cheeses. *Zentralbi. Bacterial. Mikrobiol. Hyg* , 1 Abt. Orig. C2, pp: 278-281.
- **DESMAZEAUD, M. (1996)**. Les bactéries lactiques dans : L'alimentation humaine : Utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, **5**, pp: 331-343.
- **de ROISSART H.B. (1986)**. Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Liquet F. M., **3**, Eds. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.
- **EMMANUELLE H., JULIE C. et LAURENT G., 1996** - Les Constituants Chimiques du Miel. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. APISERVICES, Galerie Virtuelle apicole.
- **Facklam R., Elliot J.A .1995**. Identification Classification, and Clinical Relevance of Catalane-Négative, Gram- positive Cocco, Excluding the Streptococci and Entérocoque *Clinical Microbiology Reviews*, 8:479-495.
- **Fleming H.P., Etchells J.L., Costilow R.N., 1975**. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber Brines. *Appl Microbiol.*,30(6):1040-1042
- **FARROW, J.A.E., FACKLAM, R.C. and COLLINS, M.D. (1989)**. Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. Nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**, pp: 279-283
- **Garvie E.L., 1986** .Gram positives cocci-Genus *Leuconostoc* .In : Bergeys Manual ,9th edit the Williams and Wilkins co .,Baltimore,pp:1071-1075.
- **GONNET. M, VACHE. G, (1985)** : *Le gout de miel*. Ed. UNAF, Paris. 150p.
- **GONNET. M, (1982)** : *Le miel ; composition, propriétés, conservation*. INRA Station expérimentale d'apiculture. Pp : 1-18.
- **Gout M. (1982)**. le miel : composition, propriétés, conservation INRA station expérimentale d'apiculture, 1982 : 1-18 .
- **Harrigan W.F. , McCance M.E. ,1976**. laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology Academic Press, Orlando
- **Hwanhlem N. ,Buradaleng S. ,Wattanachant S. , Benjakul S., Tani A, Maneerat S.,2011** . Isolation and screening of lactic acid bacteria from thai traditional fermented

- fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains .Food Control.,22:401-407
- **Harris S.** Honey for the treatment of superficial wounds: a case report and review. Primary Intention 1994 ; 2(4) : 18-23
 - **H.A. Hartmann, T. Wilke, R. Erdmann. (2011).** Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. International Journal of Food Microbiology, 146, pp. 192–199
 - **JEFFREY A. E. CHAZARETTA M, 1996).** Medical uses of honey Rev Binmed 7.PP43- 49.
 - **JONES, D. (1978).** Composition and differentiation of genus *Streptococcus*. In: *Streptococci*. Skinner, F. A., Quesnel, L. B., Eds. Academic Press, London, pp: 1-49
 - **Kwakman P.te Velde A de Boer L , et al, (2010)** How honey kills bacteria. FASEB J ;24:2576e2582
 - **KANDLER, O. and WEISS, N. (1986A).** Regular nonsporng Gram-positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams, Wilkins, Baltimore, 2, pp: 1208- 1209
 - **Lusby P.E , Coombes A ,Wilkinson J.M.(2002)** Honey : a potent agent for wound healing,J Wound Ostomy Con-tinence Nurs, 29(6),295-300.
 - **LARPENT, J.P. (1989).** Les bactéries lactiques, Les microorganismes de fermentations. Dans : Microbiologie alimentaire, Tome 2, Bourgeois, C.M., L'arpent, J.P., Eds. Techniques et documentation Lavoisier, pp: 3-15.
 - **LOUVEAUX. J, (1968):** Composition propriété et technologie du miel. Les produits de la ruche, in Traité de biologie de l'abeille. Tome 03. Ed Masson et Cie. 389p.
 - **Michener, C. D. et Grimaldi, D. A. 1988.** The oldest fossil bees: Apoid history, evolutionary stasis and antiquity of social behaviour. Proceedings of the National Academy of sciences Etats-Unis 85:6424-6426.
 - **MOLAN PC, (1992).**The antibacterial activity of honey .I. The nature of antibacterial activity .Bee World, 73.(1), pp5-28.
 - **Molan P.C,(2002)** « Hydroxymethylfural (HMF) and related compounds. In : Stadler R.H. ,Lineback D.R . (Eds) ,ProCESS- Induced food Toxicant: occurrence , formation mitigation , and health risks . Wiley-Blackwell: Hoboken.135

- **Molan P.C. (1995)** ‘ ‘ The antibacterial properties of honey ’ ’Chemistry in New Zealand 59(4):10-14.
- **Miraglio A.M, Beuchat L. R , Coulston A.M. et al.(2003)** : Honey- Health and Therapeutic Qualities. Provided by the National Honey Board. PP: 4-33.
- **NJIA N.M., 1998** - Caractéristiques socio-économique et technique de l’apiculture dans les Hauts Plateaux de l’Ouest Cameroun. Mémoire présenté en vue de l’obtention du diplôme d’Ingénieur Agronome. Université de Dschang, FASA, 75 p.
- **NOVEL, G. (1993)**. Les bactéries lactiques. Dans : Microbiologie industrielle, les microorganismes d’intérêt industriel. Leveur, J.Y, Bouix, M., Tech. et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374
- **Otis, G.W. 1996**. Distribution of recently recognised species of honeybees in Asia. J. Kans. Ent. Soc. 69:311-333.
- **OLAITAN P.B., ADELEKE O.E., OLA I.O. OLUFEMI E. A.** - Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes - *African Health Sciences*, September 2007, 7 (3), p. 159-165.
- **PORTET B., 2007**- Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d’une plante guyanaise *Piper hostmannianum var. Berbicense*. Thèse de doctorat, Univ. Toulouse, 270 p.
- **Stiles Michael E ., Holzapfel Wilhelm H. , 1197. Lactic Acid Bacteria of foods and their** current taxonomy. Inter .J.food Microbiol,36:1-29
- **SANDINE, W.E. (1988)**. New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*, **70**, pp: 519-522.
- **SCHLEIFER, K.H. (1986)**. Gram-positive cocci. Dans: bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Williams et Wilkins, Baltimore, **2**, pp: 999-1002
- **STILES, M. and HOLZAPFEL, W. (1997)**. Lactic acid bacteria of foods and their Current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, **36**, pp: 1-29.
- **SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M.D. and FISCHER, W. (1985)**. Transfer of *Streptococcus lactis* and related Streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **6** pp: 183-195

- **Zourari A, Roger S. Chbanet C., Desmazeaud M., 1991** .Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs . souches de Streptocoques salivarius subsp.thermophilus.lait..71 : 445-461.
- **TOMCZAK C., 2010** - Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire, Univ. Lyon, 185 p.
- **Teuber Michael ,Geis Arnold 2006**. The Genus lactococcus .prokaryotes 4:2005-228.
- **Theunisszn F ,Groblerb S , Gedalia I (2001)** The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans* . Apidologie.32:371-379.
- **UCHIDA, K. (1982)**. Multiplicity in soy pediococci carbohydrate fermentation and its application for analysis of their flora. *Journal of General and Applied Microbiology*, **28**, pp: 215-223.
- **VILLAR, M., DE RUIZ HOLGADO, A., SANCHEZ, J.J., TRUCCO, R.E. and OLIVER, G. (1985)**. Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis mordax*). *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, pp: 664-666.
- **Yang R, Johnson MC, Ray B (1992)**. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microb* 58: 3355–3359
- **www.ordre.pharmacien.fr**
Site consulté le 27/12/2004 KASSEL D. La Thériaque, 20 siècles d'histoire, documents de référence - Histoire de la pharmacie,
- **www.biologiq.nl**
- **http://www.beekeeping.com/articles/fr/qualite_miel.htm**
- **ZIEGLER. H, (1968)** : *La sécrétion du nectar*, in *Traité biologique de l'abeille*, Tome 3. Édition Masson de Cie, Paris. Pp : 218-247.