

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme Master 2

Option: Pharmacognosie et phytothérapie

Thème:

L'effet Anti biofilm a base de pro-miel

Présenté par : Melle Yessad Mansoriya et Mlle Balhadi Khadidja

Membres du jury :

- **Présidente :Dr Hammadi.K** professeur Université. Mostaganem
- **Examineur: Mr Bakouri.H** M.A.A Université. Mostaganem
- **Promotrice :Dr Ahmed.M** M.C.B Université. Tiaret

Laboratoire : pharmacognosie Api phytothérapie

Année universitaire 2015-2016

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- ❖ *Mes très chers parents pour l'amour, les sacrifices et les encouragements qu'ils m'ont donnés dans l'espoir de me voir réussir.*
- ❖ *Mon cher encadreur : Mr. Ahmed. M. conseil et son aide durant toute la période du travail.*
- ❖ *Mes chers sœurs et frères : Asma, Mohammed Ami, Amal, Fayza, Khalida, Abd alkader, Abd alkarim, Brahim.*
- ❖ *Toute ma famille et les amis : Yessad, Belmekdad, Saada, Khadhra, Halima, Fatima, Khadidja, Nojod, Soltana, Yamina.*
- ❖ *Ainsi qu'a tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

Mansoriya

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- ❖ Mes très chers parents pour l'amour, les sacrifices et les encouragements qu'ils m'ont donnés dans l'espoir de me voir réussir.*
- ❖ Mes chers sœurs et frères Mohamed, Abdalkadaer, Khiera.*
- ❖ Mon cher encadreur : Mr. Ahmed. M. conseil et son aide durant toute la période du travail.*
- ❖ Toute ma famille et les amis : Belhadi, Dakouis, Maryam, Imane, Ahlem, Lila, Amina, Zahra, Sara, Nadia .*
- ❖ Ainsi qu'à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

Introduction

En milieu hospitalier, la colonisation de la surface des implants, des cathéters et des salles d'intervention est responsable d'environ 60 % des infections nosocomiales par an en Amérique, induisant des milliers de décès (**rapport CDC, 2007**). La recrudescence des affections bactériennes et les difficultés rencontrées dans leur traitement ont sans doute pour cause la résistance accrue des souches aux drogues en usage. Aujourd'hui, la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques antibactériennes. Une étude récente **SMITH et HUNTER, 2008**, il a été démontré que certains biocides sont inefficaces contre les bactéries d'un biofilm bien qu'efficaces contre la même population de bactéries sous forme planctonique. Depuis quelques années, un intérêt accru est porté sur des molécules d'origine naturelle ayant montré des propriétés antibactérienne et anti biofilms notamment les produits de la ruche. Son usage en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Il est considéré comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables. L'efficacité antibactérienne du miel fait preuve parfois d'une activité supérieure à celle des agents antibactériens synthétiques. Plusieurs études ont montré que le miel Algérien, pouvait agir comme agent antibactérien contre un large spectre des souches bactériennes pathogènes y compris : *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S.aureus* (**Ahmed et al.2012 ; Ahmed et al., 2013 ; Ahmed et al., 2014 ; Ahmed et al.,2015 ; Ahmed et al., 2016**). Mais, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'effet du miel Algérien sur les biofilms et dans l'étude qui va suivre, nous allons essayer d'évaluer l'effet antibactérien et anti-biofilm de deux échantillons du miel à différentes concentrations seuls et en association avec la propolis sur trois bactéries comme étant résistantes aux antibiotiques soit : *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* en utilisant les

techniques préconisées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), et agréées par la majorité des pays dont le nôtre.

I.1. Historique

Le miel est une substance sucrée, utilisée par les êtres humains depuis les temps anciens, fabriquée à partir du nectar des fleurs par les abeilles qui en emploient une partie pour se nourrir. L'apiculture est pratiquée depuis le VII^e siècle avant notre ère.

La production du miel par les abeilles est fascinante. D'abord, les abeilles récoltent le nectar à l'aide de leurs pièces buccales adaptées, elles lèchent le nectar des fleurs et le projettent jusqu'au jabot (une poche située dans le tube digestif) où le nectar et la salive de l'abeille s'accumulent. Une transformation du nectar en miel s'opère par l'action enzymatique de la salive et du suc gastrique qui convertit le suc rose du nectar en glucose et en fructose. **(Assie, Descottes B. 2004).**

Ce nectar est alors déposé par les abeilles dans les alvéoles de la ruche pour être ensuite ventilé à grand battement d'ailes afin de diminuer le taux d'humidité entre 14 et 20%, cette ventilation peut prendre jusqu'à 20 minutes. Le miel est alors prêt à être consommé. **(Goethe ; P, 2009).**

Il existe une très grande variété de miels; certains sont faits à partir du nectar d'une seule variété de fleur, tandis que d'autres sont des mélanges; on nomme ces miels « toutes fleurs » (les abeilles ont butiné plusieurs espèces de plantes, ou alors le producteur a combiné plus d'une variété de miel). L'origine florale du nectar influence la couleur du miel, sa saveur et sa viscosité. La couleur du miel varie du blanc au presque noir, en passant par les teintes de brun, de roux et de blond. La saveur varie autant que la couleur, règle générale, plus le miel est foncé, plus sa saveur est prononcée. Parmi les miels les plus courants, les miels de trèfle, de colza et de luzerne sont pâles et de saveur modérée, le miel de bruyère est roux et de saveur forte, tandis que le miel d'acacia est très doux, transparent et liquide. **(Belkebiche Zakaria et Benaissa Mohammed, 2007).**

I.2. Définition

Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espace. **(Etienne Bruneau, 2003).**

Le miel est la denrée alimentaire produite par les abeilles à partir du nectar des fleurs ou de leurs sécrétions. **(Apfelbaum et al, 2004).**

Le miel consiste à l'état solide ou liquide. Il est composé essentiellement de glucides principalement sous forme de sucre inverti (glucose et fructose). **(Fredot,2007)**.

Le miel contaminé est un aliment sain, léger, naturel et riche en calories. Il contient des glucides, des enzymes et des vitamines.**(Monzur,2008)**.

I. 3. Description

Le miel consiste essentiellement en une solution concentrée de différents sucres. Le fructose reste liquide pour la plus grande partie. Outre le glucose et le fructose, le miel contient du saccharose, du maltose, du mélézitose, des oligosaccharides, des dextrines, des protéines des enzymes, des acides organique, du pollen et autre substances et peut contenir des champignons, des algues et d'autre particules solides provenant de la récolte du miel. La couleur du miel peut aller d'une teinte presque incolore au brun sombre. En ce qui concerne sa consistance, le miel peut être fluide, épais ou cristallisé (en partie ou en totalité). Sa saveur et son arôme varient, mais ils dérivent en général de la plante dont le miel provient **(Codex Alimentarius, 2006)**.

I. 4. Les types de miel

I. 4. 1. Les miels Uni Floraux

Un miel uni floral est un miel récolté par les abeilles sur une espèce végétale unique. De tels miels sont exceptionnels. Car il est rare que l'abeille ne butine qu'une seule espèce mellifère. On peut donc considérer que ces miels uni floraux naturels, sont des miels provenant d'une plante déterminée mais non à 100%.**(Nacer, 1994)**.

Dans la nature, il est impossible d'obtenir un miel mono floral à 100%, car l'abeille garde toujours la liberté de butiner ou bon lui semble **(Gout, 1998)**.

Pour fabriquer 1Kg de miel, les abeilles doivent butiner des millions de fleurs pour recueillir suffisamment de nectar, ce qui est toutefois impossible pour les miels mono floraux**(Biri, 1986)**.

I. 4. 2. Les miels multi floraux

Miels donnés par plusieurs espèces végétales d'où, sans origine florale précise. Il peut y avoir la dominance d'un pollen accompagné par d'autres, en petites quantités, ou bien il peut présenter une mosaïque de pollen. **(Nacer, 1994)**.

Ces miels varient énormément d'une année à l'autre, ce qui peut réserver quelques surprises concernant le goût (**Laffont, 2000**).

I. 4. 3. Les miels de miellat

Produit dans les régions où le sapin et l'épicéa sont abondants. Le miellat est une substance sucrée sécrétée généralement par les insectes piqueurs tels que les pucerons et les cochenilles sur des parties vivantes des plantes. Les abeilles le récoltent et le transforment en miel. Ce dernier se caractérise par une couleur foncée due à la présence élevée de matières minérales, contient moins de glucose et fructose, par contre, il renferme beaucoup des sucres supérieurs tel que le mellizitose dans les miels de figures. (**Belhout 2001**).

Le miellat est formé d'excrétion d'insectes (pucerons, cochenilles) qui ont sucé la sève des plantes. C'est un exsudat brillant, gluant, riche en sucres, que viennent lécher et récolter les abeilles butineuses et qui se trouve sur les feuilles des plantes en générale, les aiguilles des conifères ou d'autres organes végétaux. (**Bogdanov, 2003**).

Le miel de miellat présente une couleur ambre foncée caractéristique, son goût est agréable et il est riche en sels minéraux. (**Gonnet, 1982**).

I. 5. Origine du miel

Le miel vient des plantes par l'intermédiaire des abeilles. La sève élaborée, matière première du miel, est extraite des vaisseaux qui la contiennent de deux manières :

D'une part, par les nectaires élaborant le nectar (**Prost, 1987**); le nectar est un liquide plus ou moins doux et parfumé, produit par les fleurs des plantes supérieures (Biri, 1986), il peut contenir 80% d'eau, 18% à 19% de sucres. On trouve également des traces d'acides aminés, des sels minéraux d'hormones végétales, des pigments et des vitamines (**Bogdanov, 2005**).

Généralement, les abeilles ne visitent pas les fleurs dont la concentration en sucres est inférieure à 10% (**Vecchis, 1999 ; Caillas, 1974**). La sécrétion du nectar dépend largement des facteurs climatiques et de l'espèce végétale (**Vecchis, 1999**).

D'autre part, le miellat qui est plus complexe que le nectar faisant intervenir un intermédiaire, généralement un puceron, qui pique le végétal, se nourrit de sa sève et rejette

l'excédent de la matière sucrée sous forme de gouttelettes que les abeilles récupèrent, ramènent à la ruche et traitent exactement comme le nectar (**Gonnet, 1982**).

Il arrive que les abeilles puissent prélever aussi la matière sucrée des fruits, quand elles y ont accès dans la peau d'un fruit déjà altérée (**Gout, 1998**).

I. 6. Formation de miel

La formation du miel se fait selon les étapes présentes dans la figure N°1 :

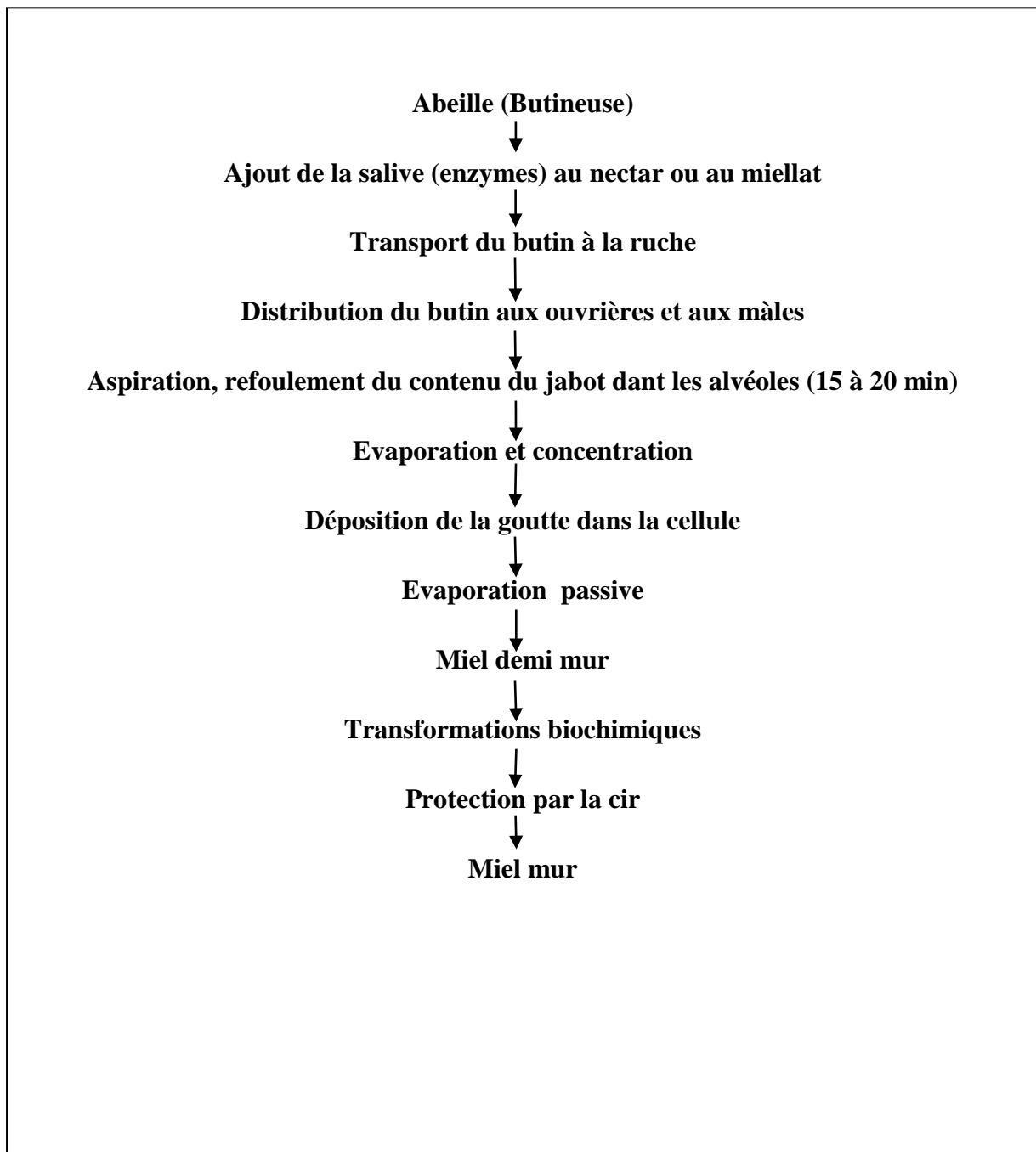


Figure 01 : Etapes de formation du miel (Gonet, 1982).**I. 7. La récolte du miel :**

D'après **Donadieu (1984)**, La récolte de miel par l'apiculteur a lieu en général après une miellée (qui correspond à la période de production de nectar par la flore susceptible d'en fournir) et lorsque les **3/4** des alvéoles des rayons de cire sont operculés. Le miel est récolté entre les mois d'avril et de novembre, en une ou plusieurs fois, La première récolte ne débute habituellement qu'à la fin du mois de mai.

I. 7. 1. Enlèvement des cadres : L'apiculteur retire les cadres de miel, après avoir chassé les abeilles par enfumage, il transporte les hausses dans la miellerie et enlève les opercules à l'aide d'un couteau à désoperculer (**Huchet et al., 1996**).

I. 7. 2. L'extraction de miel :

-La désoperculassions : C'est l'enlèvement des opercules. Avec ou sans passage à l'étuve, la désoperculation se pratique dans une pièce tiède et bien fermée (**Prost, 1987**). Selon **Donadieu (1984)**, il y a deux procédés de désoperculassions : -soit à la main avec un couteau, un rabot ou une herse à désoperculer, -soit mécaniquement grâce à des machines spéciales conçues pour cette opération.

-L'extraction : **Biri (1986)**, signale que l'extraction doit être exécutée avec un extracteur, c'est à dire un récipient en général cylindrique revêtu d'acier inoxydable, qui permet d'extraire le miel des rayons par la force centrifuge sans que ceux-ci soient endommagés.

- La filtration : Le miel est recueilli sur un filtre, qui va retenir les débris de cire entraînés lors de l'extraction, et être reçu dans un bac avant d'atteindre, après un deuxième filtrage le maturateur qui est un simple récipient de décantation pour lequel le terme d'épurateur serait préférable. Selon **Louveaux (1985)**, Les filtres couramment utilisés en apiculture sont de simples tamis à maille de **0,1 mm**. Leur efficacité est suffisante pour éliminer du miel les déchets de cire et les grosses impuretés. L'installation des filtres ne se justifie que sur des circuits de conditionnement industriels.



Figure 02: Protection et retrait des cadres



Figure 03: Cadre Donadieu (1984).

Donadieu (1984)



Figure 04: L'enfumage Donadieu (1984)



Figure 05 : Désoperculation des rayons Donadieu (1984)



Figure 06 : Extraction du miel.



Figure 07 : Filtrage du miel. Donadieu (1984)

Donadieu (1984)



Figure 08 : Mise en pot du miel (après maturation) (Donadiou, 1984).

I. 8. Composition du miel

La composition du miel dépend de très nombreux facteurs : espèces végétales butinées, nature du sol, race d'abeilles, état physiologique de la colonie, etc.

Les miels de miellat ont très souvent une teinte foncée, cristallisent généralement peu et contiennent moins de glucose et de lévulose mais davantage de sucres supérieurs que les miels de nectar (PROST, 1987).

La composition chimique du miel varie d'un échantillon à l'autre (tableau N°1).

Tableau N°01: Composition moyenne du miel.

Constitution	Teneur et commentaire	Références
Eau	L'eau présente en quantité non négligeable puisque sa teneur moyenne est de 17, 2%. Cette teneur peut être variée.	Huchet et al,(1996)
Glucides	Représente de 95 à plus de 99% de la matière sèche du miel qui sont: le glucose : 31%, lévulose : 38%, maltose : 7,5%, saccharose : 1,5% et une dizaine d'autres sucres.	Louveaux, (1968) Prost et Cont, (2005)
Acides organiques	Les analyses effectuées sur le miel ont montré que l'acide formique existe à l'état de traces dans le miel et que l'acide principal est l'acide gluconique qui	Louveaux, (1968)

	provient du glucose.	
Protides	Sont présente en faible quantité (0, 26%). La teneur en azote est négligeable (de l'ordre de 0, 041%).	Huchet et al,(1996)
Matière minérale	Représente de 0,1 à 0,2% tan disque les miels de miellat situent entre 0,5 à 1%. Groupe des éléments majeurs : N, P, Na, K, Ca, Mg et Si. Groupe des éléments mineurs : Fe, Al, Zn, Cu, Pb, Co, Ni et Cd.	Gonnet, (1982)
Enzymes	Les α -amylases et les β -amylases, diastases ou enzymes de la digestion de l'amidon.	Philippe, (1999)
Lipides	Le miel est pauvre en lipides : ceux qu'on y trouve sont préalablement des microparticules de cire qui échappent à la filtration.	Huchet et al,(1996)
Vitamines	Le miel en est très pauvre, il s'agit principalement des vitamines B (B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₄ , B ₅ , B ₆ , B ₇ , B ₈ , B ₉) qui seraient apportées par le pollen ; de la vitamine C et quelquefois les vitamines A, D et K. Ainsi, le contenu moyen d'un miel en vitamine C (vitamine la plus constante et la plus abondante dans le miel) est de l'ordre de 2 mg dans 1Kg de produit frais.	Gonnet, (1982)
Substances aromatiques	Sont toujours à l'état de traces. Les constituants principaux découverts sont des alcools aliphatiques, des aldéhydes et des cétones. Ils interviennent en proportion variables dans les miels de différentes origines.	Louveaux, (1968)
Pigments	Les pigment caroténoïdes (rouges) et flavonoïdes (jaunes).	Post et Cont, (2005)

I. 9. Propriétés physico-chimiques de miel

Les propriétés physico-chimiques sont motionnées dans le tableau N°2

Tableau N°02 :Les Propriétés physico-chimiques de miel

Propriétés	Définition	Références
Viscosité	La viscosité est une mesure de frottement interne d'un liquide. La viscosité du miel est affectée par la température, la teneur en eau et la source florale.	Bogdanov et al, (2004) National honey Board, (2005)
Densité	A 20°C, la densité du miel est comprise entre 1.410 et 1.435. elle varie en fonction de sa teneur en eau.	Prost et al, (2005)
Cristallisation	Plus la teneur en glucose d'un miel n'est forte, plus sa tendance à cristalliser est masquée.	Manikis et Thrasyvoulou, (2001).
Conductivité thermique	La conductivité thermique est une mesure de transfert de chaleur. La conductivité du miel est relativement faible. Elle s'exprime en calories par seconde et par degré celle est de 1.29 10 à 20°C pour un miel à 20% d'eau et finement cristallisé.	Bogdanov et al, (2004) Chauvin, (1968)
Chaleur spécifique du miel	Pour 17% d'eau, la chaleur spécifique est de 0.54 à 20° Celle varie très peu d'un miel à l'autre.	Chauvin, (1968)
PH	Le PH du miel varie entre 3,2 et 5,5. <4 dans les miels du nectar >5 dans ceux de miellat	Andrieu, (2003).
Hygroscopicité	Un miel à 18% d'eau se trouve en équilibre dans une atmosphère dont l'humidité relative est de 60% et dont la température est de 14°C (ex divers ; miel de colza : 19 à 20%. miel de miellat : 15 à 16% ; s'il contient plus de 20% d'eau, le miel dégagera du CO ₂ et fermentation.	Andrieu, (2003).
Indice	Le miel a un Indice de réfraction qui	Donadieu, (1978)

de réfraction	oscille entre 1.47et 1.50 (suivant sa teneur en eau) à la température de 20°C.	
Conductivité électrique	Cette mesure dépend des teneurs en sels minéraux et en acides du miel, plus elles sont élevées, plus la conductibilité électrique est élevée. D'une façon générale les miellats ont une conductivité électrique beaucoup plus élevé que les miels de fleurs.	Bogdanov, (2005)
L'acidité	L'acidité, propriété due à la présence d'acide dans le miel, notamment d'acide gluconique qui dérive de glucose.	Prost et al, (2005)
Le pouvoir rotatoire du miel	Sur la lumière, il concerne leur action sur la lumière polarisée.la majorité des miels fait tourner légèrement à gauche le plan de la polarisation : ces sont dits « lévogyres »	Prost et al, (2005)
HMF	Il provient de la décomposition du fructose en présence d'acide, lorsque le miel est conservé longtemps à température ambiante élevée.	Philippe, (1999)

I. 10. Propriétés organoleptiques

L'arome, le gout et la couleur du miel dépendent des plants ou les abeilles ont récolté le nectar : le miel foncé a généralement un gout plus prononcé et sa teneur en sels minéraux plus élevée ; le miel clair a une saveur plus délicate. La couleur peut aussi être un indice de qualité car le miel devient plus foncé pendant le stockage ou sous l'effet de la chaleur. Toute fois il arrive que certains sortes de miel, même très frais et non chauffé ; soit d'une couleur très foncée (Cribi, Khefif etLarabi, 2012). (Tableau N°3).

Tableau N°03 : Quelques type de miel et leur propriétés (Ravazzi, 2007).

Origine botanique	Propriétés organoleptiques	Propriétés bénéfiques
--------------------------	-----------------------------------	------------------------------

Lavende	Mélange en proportion prépondérante à d'autres plantes des montagnes. Elle donne un miel exquis de couleur ambrée. Arome très fleuri. Le consistence est moyenne.	A de très nettes vertus analgésiques et qui aide à lutter contre les troubles respiratoires et pulmonaires (asthme et emphysème).
Eucalyptus	Miel de couleur ambre clair, au parfum prononcé, notes de caramel et de raisin. Le consistence est épaisse.	Recommander pour désinfecter les bronches et les poumons.
Acacia	Miel limpide et claire, à la saveur délicate presque transparent, très douce, note de vanille, le consistence liquide	Très légèrement laxatif, il désengorge aussi le foie et a des vertus anti-inflammatoires pour les voies respiratoires
Thym	il peut donner un miel multi floral très aromatisé.	A des vertus digestives.
Romarin	miel foncé et aromatique, puissant avec une note de romarin. Le consistence est moyenne.	A des effets salutaires sur les troubles hépatiques.
Trèfle	Un miel dominé par les différentes espèces de trèfle a une couleur blanche à ambre claire, gout de caramel crémeux. Le consistence est moyenne	se révèle parfait pour combattre l'asthénie.
Rhododendron	Miel de couleur foncée et au parfum puissant.	Excellent sédatif
Luzerne	Miel foncé, au gout prononcé.	Doté de vertus anti-inflammatoires.
Arbousier	Ce miel verdâtre, à la saveur caractéristique très prononcé.	A des propriétés diurétiques et antiasthmatiques.
Bruyère	Ce miel de couleur jaune orangé et brun rouge, à l'arôme délicat, note de caramel. Le consistence est épaisse, gélatineuse.	Est un excellent diurétique.
	Limpide et de couleur jaune orangé et ambre très claire un peu vert, son gout	Excellent tonique des voies respiratoires ; le miel de

Tilleul	est prononcé, notes d'agrumes, senteurs mentholées, et son parfum incomparable. le consiste très liquide.	tilleul est également un bon sédatif.
Châtaignier	Miel brun très foncé, épais et au gout amer et boiser, arrière-gout de caramel. Le consiste est très épaisse.	Est un grand secours dans la lutte cotre les troubles cardio-vasculaires.

I. 11. Usage de miel

I. 11. 1. Usage interne

Administré par voie buccale, le miel peut guérir ou soulage les troubles intestinaux, les ulcères d'estomac, l'insomnie, les maux de gorge, certaines affections cardiaque, etc. Il augmente la teneur en sang en hémoglobine et la vigueur musculaire (**Prost, 2005**).

I. 11. 2. Usage externe

Il active la guérison des brûlures, des plaies et des affections rhinopharyngées grâce à une inhibine et à des substances provenant des plantes butinées qui lui communique des propriétés antibactériennes. L'élément essentiel de cette activité antibiotique du miel, une enzyme, la gluco-oxydase, provoque un dégagement d'eau oxygénée (**Prost, 2005**).

I. 12.L'effet thérapeutique du miel

Le miel est largement utilise dans le cadre thérapeutique de façon empirique de puis l'antiquité.

I. 12. 1 Application du miel en apithérapie

Selon **Bogdanov(2006)**

-Pour lutter contre les refroidissements

-Comme remède domestique contre la fièvre, les insomnies, les inflammations des gencives et le rhume des foins

-En cas d'affections au niveau de l'estomac, de l'intestin et en cas d'ulcères de l'estomac et del'intestin

-En cas de maladies de la peau, des reins et des nerfs

-Massage au miel

I. 12. 2Effet du miel favorable à la santé

-Inhibe la croissance de nombreuses bactéries, y compris de nombreuses bactéries pathogènes.

- Inhibe la croissance d'*Helicobacterpylori*, qui provoque des ulcères a l'estomac et dans le duodénum de même que des gastrites. Dans le cas de ces maladies, l'utilisation de miel de façon préventive a fait ses preuves.

-Stimule dans l'estomac la croissance des bactéries utiles du type *Bifidus* et la croissance d'espèces *Bifidus* et d'autres bactéries utiles dans le lait et le yogourt.

- L'ajout de miel a la nourriture des enfants réduit les pleurs, stimule la prise de poids et la production d'hémoglobine, diminue les problèmes digestifs.

-Aide dans le cas d'une gastro-entérite d'origine bactérienne (diarrhée) chez les enfants.

-Réduit la concentration en prostaglandine dans le sang et agit de façon anti-inflammatoire.

-Antioxydant, le miel réduit le risque de cancer, de maladie cardio-vasculaires, de maladie d'Alzheimer, de cataracte et d'autres troubles dus a l'âge.

-Réduit les facteurs de risque des maladie cardiovasculaires dans le sang comme : lipoprotéines « lowdensity », protéines C-réactives et cholestérol dans le sang ; réduit le risque d'artériosclérose.

-Agit de façon antimutagène et anti-cancérigène dans les tests cellulaires et dans les expériences sur les animaux.

-Le miel dans la sauce de barbecue réduit la formation d'amines cancérogènes hétérocyclique due au grill et au rôtissage (**Bogdanov, 2006**).

I. 13. Stockage et conditionnement

La rapidité de la dé gradation 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 (**Jeanine, 1993**).

Certains miels sont plus fragiles que d'autres en fonction de leur acidité naturelle, en effet ; tous 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 (**Louveaux, 1985**).

II. 1. Définition

La propolis est une substance résineuse butinée par les abeilles, est produite par l'association de la résine des bourgeons de divers arbres résineuses, telles que les espèces de *Populus*, *Ecalyphes*, *Cybree*,..., avec c'autre substances telles que la sécrétion salivaire de l'abeille et sa cire. (Ernst et al, 2005).

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles ouvrières sur les bourgeons de certains arbres comme par exemple : Saule, bouleau, peuplier, prunier et jamais sur le marron d'Inde. Les abeilles emmènent cette résine dans la ruche ou un autre groupe d'abeille lui ajoute certaines salives en la transformant en un mastic pour pouvoir enduire l'entrée de la ruche et les cadres pour qu'il n'est pas de courant d'air à l'intérieure de leur demeure. (Mlagan et Sulimanovic, 1982).

En raison des propriétés médicinales qu'elle renferme, la propolis est depuis longtemps considérée dans l'herboristerie traditionnelle comme un remède utile pour combattre les infections de toutes sortes. (Cardile et al, 2003 ; Castolda et Cappaso, 2002 ; Hikmet et Mercan, 2006 in Yacine, 2014).

Selon la flore botanique disponible en Algérie. On peut conclure que notre propolis est d'origine soit du pin (*pinus sp*) qui occupe les zones semi arides, le chêne qu'on trouve en nord-est du pays, châtaignier, Cyprès (*Cupressus sp*), Casuarina, et le peuplier (*Populus sp*). D'après une étude faite sur la propolis Algérienne, récoltée dans quatre régions (Tlemcen, Guelma, M'sila et Tizi-Ouzou) a montré que : les échantillons analysés ont comme source principale le Peuplier (*populus nigra*) avec la participation d'autres. sauf pour l'échantillon de Tizi-Ouzou, car a montré une constitution différente (Moudir, 2004).



Figure 09: Propolis brute

II. 2. Origine de mot propolis

Le mot propolis est d'origine grecque et il signifie « pro »-devant « polis »-cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche "devant la cité" (**Wade et al., 1999**). Cette résine nommée la propolis est utilisée depuis les temps les reculés pour de ces propriétés antibactériennes, immunostimulantes, cicatrisantes (**Crane, 1997**).

Les anciens Grecques l'ont utilisée pour les "suppurations" comme on a découvert dans les anciens livres (Aristote), les Romains l'ont donné à tous les soldats pour soigner les blessures pendant les différentes invasions (**Stevin, 1996**).

Les anciens textes grecques parlent que les médecins l'utilisaient pour fabrication des baumes. Les textes hébreux la nommait "tzori" et les propriétés thérapeutiques sont décrites dans l'Ancien Testament. Les plaquettes du moyen-Age européen décrivent les préparations médicales à base de la propolis pour les traitements des maladies de la bouche et de respiration (**Krell, 1996**).

II. 3. Composition chimique de propolis

La composition de la propolis est variable selon la source végétale visitée par les abeilles, mais présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable, constance vérifiée et confirmée par des travaux d'analyse chromatographique effectués sur de très nombreux échantillon (**Popravco, 2005**).

Tableau N°04 : composition moyenne de la propolis.

Composition en ordre	Composition par groupe	Références
Résines et baumes	45-55% Flavonoïdes, acide phénolique et leurs esters	(Bankova et al., 1987) (Nagy, 1989) (Omar, 1989)
Cire et acide gras	20-30% La cire d'abeille et plante	(Papay, 1987)
Huiles essentielles	10% Produits volatiles	(Tozi et al., 2006)

Pollen	5% Protéine (6 acides aminés libres >1%) arginine et proline jusqu'à 46% du total	(Gabry, 1986 in Yacine, 2014)
Autres composés et minéraux	5% 14 traces de minéraux ; silice, Fe, Zn, sont les plus communs, il y'a aussi Ag, Cs, Hg, La, Sb, acide benzoïque et ses esters, vitamines, sucres, cétones, lactones,... etc	(Bankova et al., 1987) (Cuellar et Henandez, 1987)

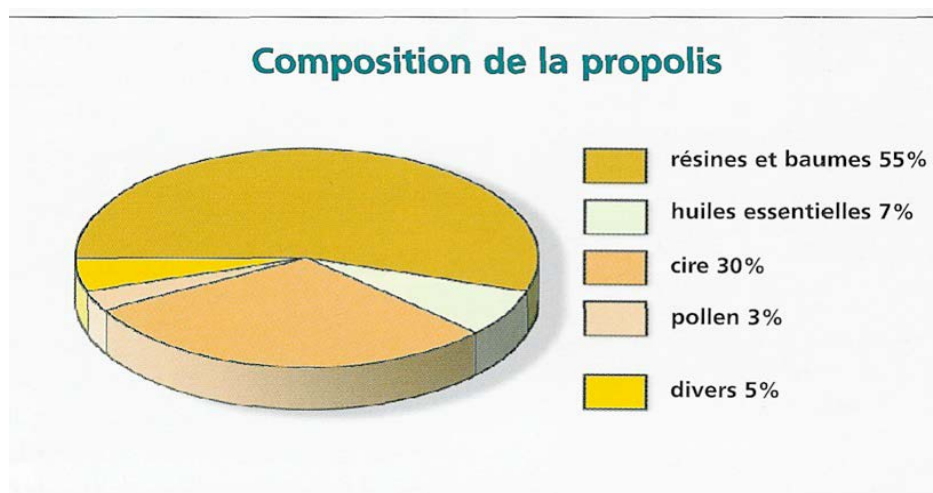


Figure 10: Les différents pourcentages des composants de Propolis.

Selon la littérature, plus de 300 constituants différents sont identifiés, la plupart sont des poly phénols entre flavonoïdes, acide phénoliques et leurs esters sont considérés comme les constituants major de la propolis (**Bankova, 2005**).

Les constituants de la propolis du point de vue de l'activité pharmacologiques sont les flavones, flavonols, et les flavanones (communément appelé les flavonoïdes) les phénols (antiseptiques) et les substances aromatiques. Les flavonoïdes jouent un rôle important dans les pigmentations des plants. Les flavonoïdes possèdent une énorme propriété dans l'activité biologique de la propolis (**Grange et Davey 1990**).

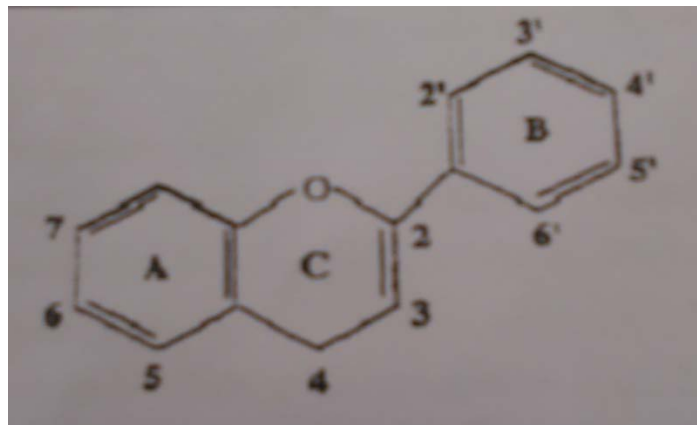
L'inventaire complet de ses substances serait fastidieux. Citons toutefois, plus de quarante flavonoïdes (flavones, flavonols, et les flavanones), des acides aromatiques, des

esters aromatiques, terpanoïdes, acide aliphatique, autres matières organiques et minérales et de nombreuses vitamines (dont la vitamine A et les vitamines du groupe B). (Tozi et al., 2006).

II. 3. 1. Flavonoïdes

Provenant du latin flavus qui signifie jaune, composés phénoliques d'origine strictement végétale, on les trouve en abondance dans les sécrétions résineuses qui protègent les bourgeons des plantes (Ghedia, 2005).

Les flavonoïdes sont composés de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par le biais d'un cycle pyrone (oxygène contenu au niveau d'une pyrane). (Hakkinen, 2002 in Yacine, 2014).



L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes est conditionnée par :

- Pour le cycle C : la présence d'une double liaison en 2, 3 avec un groupement oxo en 4, et une hydroxylation en 3 ;
- pour le cycle A : une dihydroxylation en 5, 7 ;
- pour le cycle B : une *ortho*-dihydroxylation (Halbwirt, 2010 ; Kale et al., 2008 ; Mladinka et al., 2010 ; Rufer et al., 2006 in Yacine, 2014).

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par leur capacité de chélation des ions métalliques (Halbwirt, 2010 in Yacine, 2014 ; Leopoldini et al., 2010).

D'après de nombreux travaux réalisés par différents chercheurs sur la composition chimique de la propolis, la plus part des flavonoïdes identifiés sont réunis en 6 groupes :

➤ **Flavonols**

D'après (Atac et al., 2005 in Yacine, 2014) les flavonols les plus répons dans la propolis sont le kaempferol, la Quercétine et la Galangine par contre le Myricin et le Kaempfiride sont les moins répandus.

➤ **Flavonones**

Les Flavonones les plus répons sont : le Pinocembrin, le Naringin, le Naringenin et 4,5-dihydroxy-7-methoxyflavanone (Ivona et al., 2006 in Yacine, 2014).

➤ **Flavones**

D'après (Kalogropoulos et al., 2009) l'Apigenin, la Chrysin et le Flavone sont les plus répandus.

➤ **Flavonolols**

Le Pinobanksin, le Pinobanksin-3-acétate, le Pinobanksin-3-butirate et le Pinobanksin-3-hexanoate (Atac et al., 2005 ; Takeshi, 2001 in Yacine, 2014).

➤ **Flavan-3-ols**

Le plus répandu est le Catechin (Kalogeropoulos et al., 2009).

➤ **Isoflavones**

Le 4, 7-Dimethoxy-2-isoflavanoln et le 7,4-Dihydroxyisoflavone sont les plus répons dans la propolis (Alencar et al., 2007).

II. 3. 2. Les acides phénoliques

le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Bruneton, 1999). Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamique.

II. 3. 3. Esters aromatiques

D'après la littérature, plusieurs travaux ont été réalisés sur la composition de la propolis en ester aromatiques parmi eux ce de Silici et Kultuca, (2005) (Tableau N° 05)

Tableau N° 05 : Esters aromatiques de la propolis :

1. Ethyle palmitate	9. 3- méthyle-3- butenyl-trans caffeate
2. diethyl phtalate	10. 2- méthyle-2- butenyl-trans caffeate
3. Benzyl-trans-4-coumarate	11. 3- méthyle-2- butenyl-trans caffeate
4. 1-phenylethyl trans caffeate	12. 2- méthyle-2- butenyl-trans-4-coumarate
5. cinnamyl caffeate	13. 3- méthyle-2- butenyl-trans-4-coumarate
6. 3-méthyle-3-butenyl-trans ferulate	14. phenylethyl trans-4-coumarate
7. 3-méthyle-2-butenyl-trans ferulate	15. ethyl linoleate
8. 3-méthyle-3- butenyl-trans ferulate	16. ethyl oleate

II. 3. 4. Acides aliphatiques

(Kalogeropoulos et al., 2009). Ont identifié la composition chimique des EEP de Grèce et de Chypre en acides aliphatiques (Tableau N° 06).

Tableau N° 06 : composition des EEP de Grèce et de Chypre en acides aliphatiques.

Acides aliphatiques	Rt
Acide succinique	7, 69
Acide malique	11, 67
Acide azeleique	18, 24
Acide héraadecanoïque	22, 96
Acide oléique	26, 04
Acide hexenedoïque	32, 96

II. 3. 5. Terpènes

D'après les résultats obtenus, la majorité des échantillons des EEP étudiés ont montré des teneurs significatives en terpènes. Les terpènes ont été aussi observés dans la propolis de la région méditerranéenne comme la Sicile, la Turquie, l'Algérie et la Grèce (Kalogeropoulos et al., 2009).

II. 3. 6. Sucres

Le (Tableau N° 07) illustre les sucres identifiés par **Beatriz et al., (2009)** lors de son étude. La région géographique influence la composition en sucres de propolis.

Tableau N° 07 : influence de La région géographique sur la composition en sucres de propolis.

Le pays	Les composants	% (g/100g)
Kenya	Saccharose	3, 34
	Glucose	0, 23
	Fructose	0, 65
Bulgarie	Saccharose	0, 23
	Glucose	0, 16
	Fructose	0, 08
Kenya	Saccharose	1, 15
	Glucose	0, 75
	Fructose	0, 95
Tanzanie	Saccharose	0, 04
	Galactose	Traces
	Glucose	0, 12
	Fructose	0, 03

II. 3. 7. Substances minérales et oligoéléments

La propolis est riche d'un grand nombre de substances minérales et d'oligo-éléments parmi lesquels nous trouvons en particulier (Tableau N° 08) (**Beatriz et al., 2009 in Yacine, 2014**).

Tableau N° 08 : composition minérale de quelques échantillons de propolis de l'Argentine.

	San Martin	Sarmiento	Chimbas
Calcium (Ca) (mg/Kg)	1651	42	3397
Potassium (K) (mg/Kg)	473	174	1148
Fer (Fe) (mg/Kg)	473	174	1192
Sodium (Na) (mg/Kg)	855	368	370
Magnésium (Mg) (mg/Kg)	237	395	875
Zinc (Zn) (mg/Kg)	61	68	80
Manganèse (Mn) (mg/Kg)	14	17	22

II. 3. 8. Vitamines

En général, la propolis ne constitue pas une source importante de vitamine. La fraction vitaminique de la propolis d'abeille se caractérise par des teneurs appréciables en vitamines de groupe B, tout particulièrement la vitamine B₃ (pp) et la provitamine A qui se transforme en vitamine A dans l'organisme (**Krell, 1996**).

II. 4. Propriété physique

La propolis est récoltée sur une grande variété d'arbres et d'arbustes. Chaque région et chaque colonie, semble avoir ses propres sources de résine préférées. Ce qui explique la grande variation de la couleur et de l'odeur de la propolis (**Krell, 1996**).

II. 4. 1. Consistance

De consistance variable en fonction de la température :

- Dure et friable à 15°C ;
- Molle et malléable aux alentours de 30°C ;
- Collante ou gluante entre 30 à 70°C.

Le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C (**Krell, 1996**).

II. 4. 2. Solubilité

La propolis d'abeille est peu soluble dans l'eau. Soluble dans l'alcool, l'acétone, l'éther, le chloroforme, le benzène,...etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (**Raoul, 1992**).

La partie insoluble est constituée de tissus végétaux, de grains de pollen, de débris de cuticule et de soie d'abeille, etc. (**Debuyser, 1984**).

II. 4. 3. Caractéristiques organoleptiques

- Couleur : elle varie très fortement selon l'origine botanique et géographique ; brun jaune, brun vert ou de brun rouge à rouge foncé ;
- Odeur : la propolis à une odeur marquée et agréable de résine ;
- Gout : la propolis à un gout amer et piquant (**Tozi, 2006**).

II. 5. Rôle de la propolis dans la ruche

La propolis une fois prélevée de sa source végétale, et ramenée à la ruche, est utilisée par l'abeille de différentes façons :

- Ciment pour colmater les fissures de leurs habitats, et réduire le trou de vol pour mieux contrôler le passage des intrus et pour se protéger du froid (**Kolankay, 2002**).
- Isolant thermique **idéal** (**Jean ; Prost et Le Conte, 2005**).
- Traitement antiseptique des cellules de cire avant la ponte de la reine par un tapissage d'une pellicule de propolis pour le développement harmonieux de l'œuf (**Burdock, 1998 in Yacine, 2014; Kolankay et al., 2002**).
- Lutte biologique, en recouvrant l'intérieur de leur habitat d'une fine pellicule de cette résine, les abeilles se mettent à l'abri des maladies (**Jean ; Prost et Le Conte, 2005**).
- Elle est utilisée pour embaumer les corps des prédateurs gourmand de miel (sphinx à tête de mort, petit rongeurs) tués par les abeilles et qu'elles ne peuvent pas évacuer compte tenu de leur poids (**Jasprica, 2007**). Leur purification, source de maladies, est ainsi évitée.

II. 6. Extraction et purification

C'est après des années de recherche que les biologistes slovènes ont mis au point mode breveté de purification par ultrasons qui permet d'obtenir un mout de propolis extrêmement pur, dont les vertus originales ont été remarquablement préservées (**Bozcuk et Lmez, 2003**).

Ce procédé permet d'obtenir 70% à 80% des substances actives de la propolis alors que le mode traditionnel d'extraction à l'alcool ne permet d'en retirer que 30% à 40% (**Broudiscou et al., 1997**).

II. 7. Conservation de propolis

Lapropolis se conserve assez facilement dans de bonnes conditions sans impératifs spéciaux pour la plupart de ses présentations, mais il parait néanmoins préférable de la garder dans des récipients opaques à la lumière, bien fermés et à l'abri de la chaleur (certaines formes impliquent d'ailleurs rigoureusement ces conditions pour une bonne conservation :longue conservation par exemple) (**Donadieu,1981**).

Certaines expériences ontmontré par ailleurs que le stockage de longue durée de la propolis ne semble pas diminuer sa teneur en composants chimiques, ni son activité antibactérienne,Il a été suggéré pour l'obtention de meilleurs effets et résultats possibles, d'utiliser une propolis fraiche (**Donadieu,1981**).

A signaler, enfin, que la lyophilisation de la propolis (c'est -à-dire, sa dessiccation obtenue par congélation brutale à basse température, suivie d'une sublimation sous vide,permettant d'obtenir une poudre poreuse qui se conserve indéfiniment sous vide et qui se dissout instantanément par simple addition d'eau).Ce procédé de conservation lui maintient également son action antibiotique, ce qui peut en faire un procédé très intéressant et à retenir pour l'utilisation de ce produit sur une plus grande échelle dans un proche avenir (**Donadieu, 1981**).

I. 8. Les propriétés thérapeutiques de la propolis

II. 8. 1. L'activité antimicrobienne de la propolis

En dépit de ses activités antimicrobiennes, la propolis est souvent nommée « antibiotique naturel ». Un grand nombre d'études ont démontré l'effet d'inhibition sur les différents micro-organismes (tableau2).

Tableau N° 09 : Les effets antimicrobiens de la propolis (Krell, 1996).

Organisme	Commentaire	Référence
Bactérie		
<i>Bacillus larvae</i>	détruite	Mlagan et Sulimanovic, 1982
<i>B. subtilis</i>	détruite	Meresta , 1985
<i>Helicobacter pylori</i>	inhibée	Itoh et al., 1994 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
MRSA	Forte inhibition	Grange et Davey, 1990
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tb	Karimova, 1975 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013. Grange et Davey, 1990
<i>Staphylococcus sp</i>	inhibé	Tcherniak, 1973 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Effet synergique	Kedzia et Holderena, 1986
<i>Streptococcus sp</i>	inhibé	Rojas et Cuetara, 1990 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Streptomyces</i>	inhibé	Simuth et al., 1986 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>S. sobrinus, mutans, cricetus</i>	Caries dentaires	Ikeno et al., 1991, Arvouet et Pourrat, 1990 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	destruction	Petri et al., 1988
<i>Escherichia coli</i>	inhibé	Simuth et al., 1986
<i>Salmonella</i>	Potential. éliminé	Okonenko et col, 1986 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
		Olarin et al., 1989 in Boudjreda,

Giardia lamblia	Effet positif	Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
Bacteroides nodosus	réduite	Munoz, 1989 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
Klebsiella pneumoniae	Effets positifs	Dimov in Yacine, 2014
Levures		
Candida albicans	Effets synergiques	Holderna et Kedzia, 1987 et autres in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
Aspergillus niger	Effets positifs	Petri et al.,1988
Botrytis cinerea	In vitro fongicide	La Torre et al., 1990 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
Ascospaera apis	inhibé	Ross, 1990
Virus		
Herpes	Inhibé in vitro	Sosnowski, 1984
Virus de pomme de terre	effectif	Fahmy et Omar, 1989 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
Influenza (grippe A et B)	Réduite de 72%	Serkedjieva, 1992 et Osmanagic, Likar et col, 1985 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
Maladie de Newcastle	Virus de reproduction affecté	Maksimova – Todorova et al., 1985 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.

Les composés de la propolis qui démontrent l'activité antibactérienne sont la pinocembrine, galangine, acide caféique, et l'acide férulique. L'activité antifongique est démontrée par la présence des substances comme pinocembrine, pinobanksine, l'acide caféique, ester benzylique, sakuranetine, et le ptérosilbène. L'activité antivirale de la propolis est due à la présence de l'acide caféique, du lutseoline, et de la quercétine(**Schmidt et Buchmann, 1992**).

Cette propriété est principalement due aux flavonoïdes et aux acides phénols, et particulièrement grâce à la galangine, à lapinocembrine, mais aussi aux acides caféique, férulique et salicylique. La propolis a une action essentiellement par l'inhibition de la division

cellulaire qui provoque l'arrêt de la croissance et de la progression des germes. D'autres mécanismes rentrent en jeu, comme la désorganisation du cytoplasme (Martini MC and Seiller M, 2006). Cet actif va donc lutter contre l'acné (Boyanova L et al., 2006).

La propolis peut être utilisée chez le jeune veau (jusqu'à 1 mois) pour combattre les diarrhées qui sont le plus souvent à une bactérie très connue (*Escherichia coli*). Chez l'adulte, elle lutte contre les maladies du pis notamment les mastites (inflammatoire de la glande mammaire) à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* ou *Candida albicans* (un champignon microscopique qui s'attaque aussi à l'homme) (Broudiscou et al., 1997).

La propolis est également recommandée dans le cas d'affection de l'oreille par des champignons microscopiques. La présente invention concerne une nouvelle composition thérapeutique comprenant un composant phénolique et de la propolis. Cette mixture est également utile en tant que moyen antiviral vis-à-vis des virus à capsidique lipidique. Les extraits aqueux et alcoolique de la propolis exercent une action antivirale sur quelques virus de plants. Les différents extraits de propolis inhibent la reproduction des virus d'influenza responsables du rhume. Toutefois, il semble que dans cette action les extraits alcooliques soient plus actifs (Logerot, 2003).

II. 8. 2. Effet anticancéreux

L'extrait alcoolique de la propolis est capable de transformer les cellules humaines de l'hépatite et de carcinome, et elle est capable de les inhiber (Matsuono, 1992 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013).

Les substances isolées de la propolis qui ont cet effet cytotoxique sont la quercétine, l'acide caféique et la clérodane dytherpénoïque. Cette dernière montre une particulière et une sélective toxicité sur les cellules des tumeurs. La propolis a également démontré une activité cytotoxique et cytostatique (in vitro) chez les hamsters infectés de cellules cancéreuses des ovaires et de la tumeur de sarcome (Ross, 1990).

Les substances ont un effet sur les cultures de cellules de cancéreuses humaines et animales comme le carcinome, mélanome, le colon et les cellules de carcinome des reins (Grunberger, 1988).

Les composés de la propolis ayant cet effet sont l'acide caféique et le phényléster. La substance nommée Artepillin C qui a été isolée de la propolis, a démontré qu'elle a un effet

puissant cytotoxique sur les cellules de carcinome gastrique, sur les cellules du carcinome muqueux *in vitro* (Kimoto, 1995 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013).

II. 8. 3. Propriétés anti oxydantes

Les flavonoïdes concentrés dans la propolis ont un énorme pouvoir antioxydant et ils sont capables de détruire les radicaux libres en protégeant les lipides et autres substances comme la vitamine C. c'est pour cette raison qu'il est recommandé de prendre de la propolis au même temps que de la vitamine C. (Popeskovich et al, 1980 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013).

Il est probable que les radicaux libres avec d'autres facteurs sont responsables de la dégradation cellulaire comme par exemple dans le cas de maladies cardiovasculaires, d'arthrites, du cancer, du diabète, de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer.

Cette propriété est liée aux polyphénols et aux flavonoïdes pour lesquels il a été démontré qu'ils étaient capables de casser les réactions en chaînes sur les lipides, d'inhiber les réactions de chimioluminescences et de piéger les certains ROS (Marquele FD et al, 2005). Les nombreux oligoéléments et minéraux de la Propolis favorisent également l'action antioxydante. (Martini MC and Seiller M, 2006).

II. 8.4. Propriétés immunitaires

La propolis démontre une très grande activité immunitaire sur certains virus (Manolova, et al., 1987 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013). Des chercheurs japonaises ont démontré que les extraits de la propolis sont responsables d'activation macrophagotique, en activant les réponses immunitaires de l'organisme humain (Moriyasu, 1993 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013).

La propolis active les cellules immunitaires qui commencent à produire les cytokines. Les résultats sont que l'effet de la propolis empêche le développement de cellules tumorales. La propolis a démontré à pouvoir supprimer la réponse de l'HIV-1 et elle a modifié *in vitro* les réponses immunitaires, et selon certains travaux, la propolis, " peut constitué un produit naturel non toxique dans l'arsenal contre HIV-1 avec son pouvoir immunorégulateur" (Harish, et al., 1997 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013).

II. 8. 5. Effet sur les maladies dentaires

Chez les rats inoculés par *S. sobrinus*, dans leurs caries dentaires il leur avait administré par badigeonnages des solutions à la propolis, ces caries ont disparus. Aucun effet toxique n'a été observé sur ces expériences (**Ikeno, 1991 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**). La propolis a démontré une efficacité réelle pour les traitements des gingivites et la plaque dentaire (**Neumann, 1986 ; Arvouet, 1989 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**).

La solution contenait 50% d'extrait de propolis a été très efficace dans le cas de gangrène gingivale (**Gafar, 1986 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**).

II. 8.6. Propriétés anti-cicatrisantes

La propolis a démontré qu'elle possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation, et la formation du collagène et au même temps recorde répare l'épiderme abimé (**Ghisalberti, 1979, Krell 1996**). Ces propriétés proviennent du flavonoïde arginine qui est un composant de la propolis. Une accélération encore plus rapide de la réparation tissulaire est obtenu si l'extrait d'aloé vera lui est joint (**Sumano-Lopez, 1989 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**).

La Propolis entraîne la stimulation des processus de régénération tissulaire et de cicatrisation (**Gregory SR., 2002**). La propolis joue un rôle nutritif notable dans l'intégrité cutanée. Cette propriété est en partie, due à la présence d'acides aminés tels l'arginine et laproline, dont on connaît le rôle dans le processus de régénération de la peau. Ils permettent d'augmenter la synthèse du collagène et est ainsi accélérer la réparation de l'épiderme abimé.

II. 8.7. Propriétés anesthésiques

La propolis avec ses composants est un très puissant anesthésique, et les études ont démontré que cette résine est trois fois plus anesthésiante que la cocaïne et 52 fois plus puissante que la procaine dans les tests sur les cornées de lapin (**Rode, 1977 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013 ; Ghisalberti, 1979**). L'effet anesthésique est du à la pinocembrine, l'acide caféiques aux composés des esters de la propolis (**Paint et Metzner, 1979 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**). Les propriétés anesthésiques ont été utilisées par les gens depuis des siècles et plus particulièrement dans le cas des rages des dents. Un emplâtre dentaire a été mis en place et breveté en Pologne (**Sosnowski, 1984**).

II. 8. 8. Effet cardiovasculaires

Les concentrations importantes de l'extrait de la propolis diminuent la tension sanguine et produisent un effet sédatif en maintenant le niveau de sérum du glucose dans le sang (**Kedzia, 1988 in Yacine, 2014**). Les dihydroflavonoïdes, contenus dans la propolis renforcent les capillaires (**Roger, 1988 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**), et produisent une activité antihyperlipidique (**Choi, 1991 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**).

La propolis est aussi un grand secours dans le cas d'alcoolémiques en vue de protection de foie, et le tetrachloride chez les rats (**Coprean, 1986 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013**).

II. 8. 9. Allergies et toxicité

La propolis n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si les quantités de propolis consommées sont raisonnables de la (**Ghisalberti, 1979**). Les doses recommandées ne doivent pas dépasser 2g de la propolis extraite par jour (cette dose est déjà très importante en tenant compte la dilution de cette résine dans les différentes productions. La dermatose de contact est l'allergie la plus courante avec la propolis (chez les apiculteurs) (**Hausen et al., 1987**). Dermatites est souvent provoqué avec de la propolis brute, les extraits ou avec les produits qui en contiennent. C'est l'acide caféique et ses dérivés qui sont responsables le plus souvent dans les réactions allergiques (**Hashimoto et al., 1988**).

Pour savoir si une personne est allergique à la propolis, il est souhaitable qu'elle fasse un essai préalable en se frottant le lobe de l'oreille avec un produit contenant la propolis. Si au bout de deux minutes aucune démangeaison n'apparaît la personne n'est pas sensible au produit et elle peut l'utiliser ou consommer. Par contre il faut quand même signaler qu'une population de 1 à 3% est sensible (**Schmidt et Buchmann, 1992**).

II. 9. La récolte de propolis

II. 9. 1. La récolte de propolis par l'abeille

Lorsque l'abeille a repéré la source avec ses antennes, elle l'indique à ses congénères par la danse frétilante. L'abeille découpe avec ses mandibules des fragments de résine qu'elle étire comme un fil et qu'elle entasse après l'avoir pétri en boule, dans les corbeilles à pollen. Tâche effectuée au moment le plus chaud de la journée (20°C) du printemps à la fin de l'été

Dans la ruche les ouvrières déchargent la butineuse en ramollissant la résine avec leurs sécrétions salivaires entraînant une maturation organique et en y ajoutant un peu de cire. (Tournefeuille, 2014).

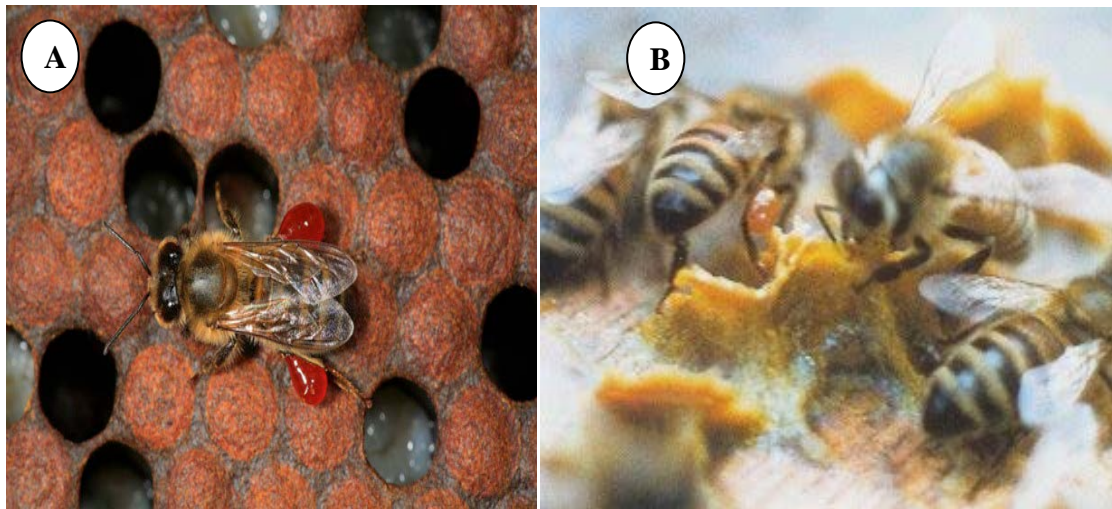


Figure 11:A et B La récolte de propolis par l'abeille.

II. 9. 2. La récolte de propolis par l'homme

D'après les recherches de (Maryadele J ; et al., 2001) la colonie produit entre 100 et 300g de propolis par ans. Le travail de récolte est donc souvent fastidieux et les opérations de purification très délicates. Pour certains apiculteurs, la propolis est une gêne. Parfois, certains prennent la peine de la recueillir lors du nettoyage des cadres. Cette propolis brute de raclage nécessite d'être épurée car elle peut contenir de la cire, du bois et des morceaux d'insectes. Chez certains apiculteurs amateurs qui ouvrent rarement leurs ruches, elle peut être assez vieille et dégradée.

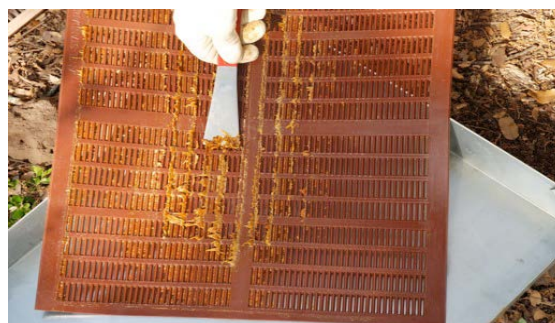


Figure 12: Raclage de propolis

La propolis de raclage peut également contenir des morceaux d'abeilles. Ce dernier élément confère à la propolis de grattage, une plus-value sur le plan de ses qualités bio-apithérapiques. En effet, utilisée par les abeilles pour ce travail d'embaumement, la propolis de grattage présenterait des qualités antibactériennes supérieures à la propolis de grille. La

propolis de grille est essentiellement employée par l'abeille comme matériau de construction, et non comme protection antibactérienne, son efficacité sur ce plan n'étant pas prioritaire pour l'abeille. (Maryadele J ; et al., 2001)

II. 10. Utilisation par l'abeille

La propolis est utilisée comme un matériau de construction et de réparation : les abeilles n'ont pas de maison en bois mais une ruche faite de cire; la propolis va jouer le rôle de mortier imperméable et va permettre de combler les fissures et autres brèches susceptibles de permettre à des prédateurs de rentrer dans la ruche.

Du fait de ses propriétés antibactériennes, la propolis va aussi servir à momifier les intrus morts à l'intérieur de la ruche et trop gros pour être transportés par les abeilles (rats et souris, papillons, gros insectes ...). La momification des intrus avec de la propolis évite ainsi qu'ils se décomposent et deviennent de véritables nids à microbes.

La propolis est aussi déposée en fines couches à l'intérieur de la ruche, pour lisser les parois ainsi que les alvéoles qui recevront les œufs de la reine. (Gardana et al., 2007)

Réduction de l'entrée de la ruche

Réparation des rayons, fissures

Fixation des cadres mobiles pour réduire les vibrations

Embaumement des cadavres des intrus

Aseptisation de la ruche

Opération renouvelée chaque année (Tournefeuille, 2014).

III. 1. Historique

Les premières observations d'un biofilm datent de 1684. Elles ont été réalisées par Antonie van Leeuwenhoek qui étudiait avec un microscope, de sa propre invention, le dépôt retrouvé sur ses dents et avait observé des « animalcules » agrégés (**Bjarnsholt, Alhede, Eickhardt-Sorensen, Moser, Kuhl, Jensen, and N. Hoiby, 2013 et Donlan, R. M., and J. W. Costerton, 2002**). Ces données corrélées à nos connaissances actuelles montrent qu'il s'agissait de la plaque dentaire et d'un biofilm bactérien. Louis Pasteur rapporta la description d'agrégats bactériens dans le vin qui se transforme en acide acétique (ou vinaigre). Ces agrégats devaient être des biofilms formés par des levures (**Bjarnsholt, Alhede, Eickhardt-Sorensen, Moser, Kuhl, Jensen, and N. Hoiby, 2013**).

La théorie du mode de vie des bactéries non pas libres mais adhérentes sur une surface fut avancée par **Henrici en 1933**. Il observa sur des lames de verre plongées dans un aquarium, le développement de bactéries sur la surface des lames. Le lavage sous un robinet était insuffisant pour décrocher les bactéries. Il constata aussi, que les bactéries étaient abondantes et diverses. Ses observations des micro-organismes dans l'eau lui permirent d'établir une évidence acceptée seulement depuis quelques décennies : les bactéries sont majoritairement adhérentes sur une surface pour croître et non libres dans leur environnement. Henrici avança cette idée uniquement pour l'environnement aquatique en opposant les bactéries benthiques aux bactéries planctoniques (**Henrici, 1933**). Quelques années plus tard, Zobell étudia l'attachement des bactéries sur une surface (**Zobell, 1943**). Il montra que les bactéries étaient majoritairement sessiles (adhérentes sur une surface en un point fixe qu'elles ne quittent pas) plutôt que planctoniques (libres dans le milieu). Il fit les premières études sur le mécanisme d'attachement des bactéries et évoqua le "film" bactérien (**Zobell, 1943**). Le terme de "biofilm" a été introduit pour la première fois en **1978 par Costerton et Coll**. puis la définition n'a cessé d'évoluer. Les premières études du biofilm ont commencé dans les années 70, puis leur nombre a augmenté de manière exponentielle. Jusqu'en 1987, le biofilm était perçu comme une "dalle" de matrice dans laquelle étaient intégrées les bactéries sessiles (**Stoodley, Sauer, Davies, and Costerton. 2002**). La mise au point de la microscopie confocale a permis l'observation du biofilm vivant et la démonstration que les bactéries étaient bien incluses dans la matrice extracellulaire.

III. 2. Définition du biofilm

La définition du biofilm, selon **Hall-Stoodley et Coll en 2004**, est une communauté bactérienne adhérente à une interface (air-liquide ou solide-liquide) et vivant dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) produite par les membres de la

communauté. Certains scientifiques, comme Costerton, considèrent que les flocules, bactéries agrégées entre elles, mais libres dans le milieu, sont également des biofilms (**Costerton, and Lappin-Scott, 2003, Donlan, and Costerton, 2002**).

Le biofilm est une structure dynamique qui repose sur un comportement collectif. Il est considéré comme le principal mode de vie des bactéries : 90 à 99,9 % des bactéries vivraient dans un biofilm. Il se forme dans un environnement avec une humidité suffisante (**Donlan, and Costerton, 2002, Hall-Stoodley, Costerton, and Stoodley, 2004, Rodriguez-Navarro, Dardanelli, and Ruiz-Sainz, 2007**).

Le biofilm est une structure complexe organisée en trois dimensions avec des canaux permettant l'approvisionnement des bactéries en nutriments et en oxygène et la diffusion des signaux de communications (**Stoodley, Sauer, Davies, and Costerton, 2002**). Le biofilm serait un mode de vie stratégique pour les micro-organismes. Il constitue un environnement protégé pour la croissance des microorganismes dans un environnement hostile (**Belas, 2013, Flemming, and Wingender, 2010**). La matrice extracellulaire du biofilm est produite par les micro-organismes du biofilm. Elle contribue à freiner la diffusion des molécules au sein du biofilm telles que l'oxygène et les nutriments mais aussi les antibiotiques (**Costerton, Lewandowski, DeBeer, Caldwell, Korber, and James, 1994, Jolivet-Gougeon, and Bonnaure-Mallet, 2014**).

Les biofilms sont le plus souvent multi-espèces pouvant inclure des micro-organismes procaryotes (Bacteria et Archaea) et des micro-organismes eucaryotes (levures, micro-algues, champignons inférieurs) (**Carmichael, Harper, Coventry, Taylor, Wan, and Hickey, 1998, McLaughlin-Borlace, Stapleton, Matheson, and Dart, 1998, Morris, Monier, and Jacques, 1997**). Les différents micro-organismes communiquent et interagissent entre eux afin d'assurer la pérennité du biofilm et la survie de tous.

III. 3. Etapes de formation des biofilms

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement. Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels, ou sur tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation des biofilms (Figure N°13).

III. 3. 1. L'adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active

(présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide (**Beloinet al., 2008**). L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire.

III. 3. 2. L'adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E. coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloinet al., 2008, Van Houdt & Michiels, 2005**).

III. 3. 3. Le développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique.

III. 3. 4. La maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Filloux & Vallet, 2003; Tenke et al 2006**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoquent la dégradation des tissus environnants de l'hôte et permettent ainsi la libération de nutriments (**Jacobsen et al., 2008**). Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de micro-organismes (**Behlau & Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et inclut également des polymères d'exopolysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des phospholipides, des nutriments et des métabolites (**Beloin et al., 2008**). Cette matrice a un rôle protecteur et un rôle structural.

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différents des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une évolution du profil d'expression de leurs gènes. Ainsi, chez *E. coli*, on note une différence d'expression des gènes de 38% entre les bactéries attachées aux biofilms et les bactéries planctoniques (**Tolker-Nielsen & Molin, 2000**). Toutes ces transformations sont coordonnées

grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé le quorum sensing (Behlau & Gilmore, 2008). Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, par exemple les acyl-hamosérinelactones chez les bactéries à Gram négatif, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné (Filloux & Vallet, 2003).

Les biofilms matures possèdent une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui évoluent selon l'osmolarité, le pH et la densité cellulaire. Du fait de cette hétérogénéité, l'état métabolique d'une bactérie diffère selon sa localisation : il existe une variété de phénotypes bactériens au sein d'un biofilm.

Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal de matériel génétique. Ce phénomène pourrait notamment faciliter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (Trautner & Darouiche, 2004).

III. 3. 5. Le détachement de bactéries

La densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 cellules/cm² (Hall-Stoodley et al 2004). Des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (Kaplan, 2010). Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries.

Ainsi, un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces.

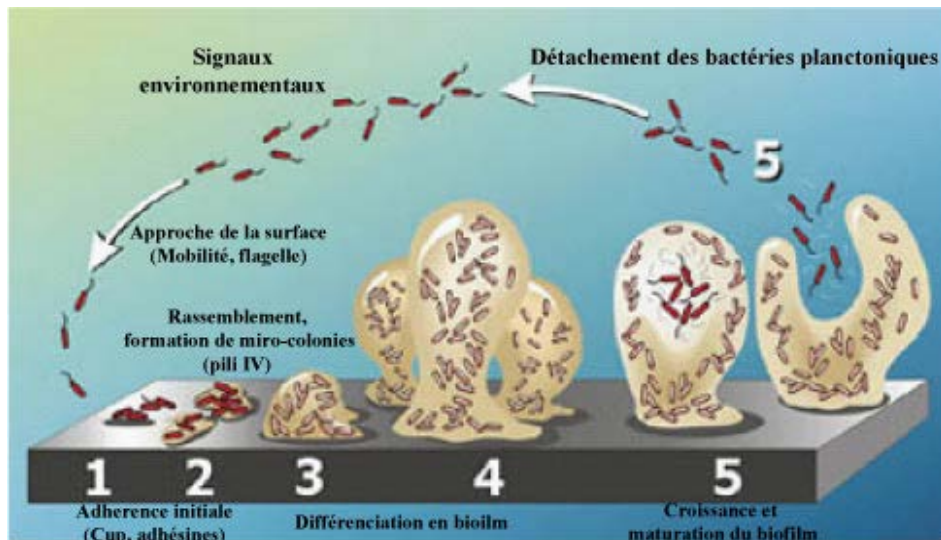


Figure N°13: Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm (Van Houdt & Michiels, 2005).

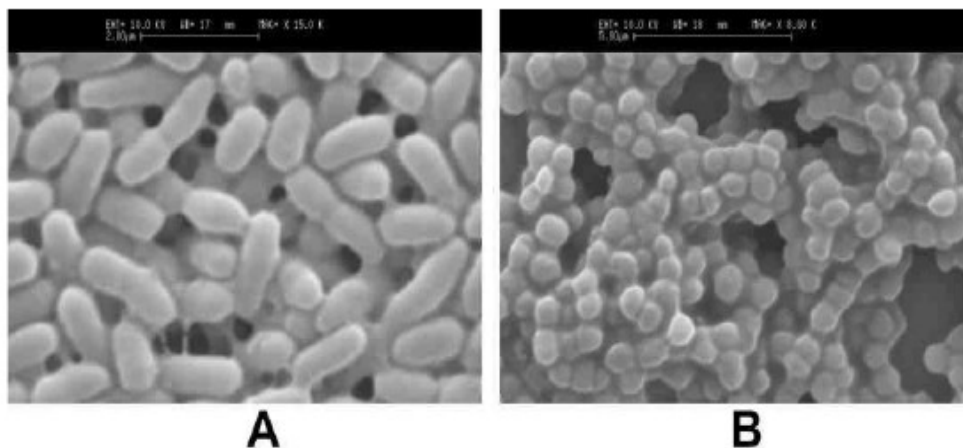


Figure N°14: Photographies par microscopie électronique de biofilms de 24 heures formés par A) un bacille à Gram négatif *Burkholderiacepacia* et B) un cocci à Gram positif *Staphylococcus* sp (Simoes, 2011).

III. 4. Importance médicale des biofilms

Biofilms et infections chroniques

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. En effet, 65% des infections recensées dans les pays développés sont dues à des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley, 2004).

Biofilms et santé publique

Les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques et d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec le port de prothèses médicales, on parle donc d'infections nosocomiales. Les infections à biofilms sont résistantes aux traitements

antibiotiques, et posent de sérieux problèmes en matière de santé publique. Certaines maladies peuvent même favoriser la formation de biofilms, comme nous le verrons avec l'exemple de la mucoviscidose.

Infections liées à la présence de biofilms

La liste suivante, non exhaustive, regroupe les principales infections liées à la présence de biofilms (Lewis, 2008) :

Infections ou maladies :

Caries dentaires, Gingivites, Péritonite, Mucoviscidose, Ostéomyélites, Prostatites.

Infections nosocomiales :

Sutures, Lentilles de contact, Port d'un implant médical :

Sonde urinaire Cathéter veineux central, Sonde endotrachéale, Sonde de gastrotomie, Valve cardiaque artificielle, Prothèse orthopédique, Broches (ostéomyélite).

III. 5. Le micro-organisme le plus étudié en monoculture : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce la plus utilisée en laboratoire pour l'étude des biofilms et ce, pour plusieurs raisons.

Cette bactérie est rencontrée dans de nombreuses situations médicales (affections pulmonaires, brûlures, formation de biofilms sur des cathéters veineux centraux...). Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* forment rapidement (moins de 24h), alors que des biofilms d'autres espèces (*Escherichia coli* par exemple) mettent au moins 48 heures à se former. Une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1, présente l'avantage d'avoir été entièrement séquencée, et sert donc de support à des études du génome (Maclean, 2004).

En plus de la standardisation des méthodes reproductibles d'un laboratoire à un autre, des modèles d'infections associées à des biofilms permettent la comparaison des résultats et la recherche de traitements possibles de ces infections.

III. 6. Composition de la matrice du biofilm

La matrice du biofilm est hautement hydratée et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Elle peut être constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, d'agents tensioactifs, de lipides, de glycolipides et de cations (Karatan et al 2009, Flemming et al 2010). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance. Un des exopolysaccharides le plus souvent retrouvés est un polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine. On retrouve ce polymère chez plusieurs espèces bactériennes, dont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*,

Bordetella spp. Et *Actinobacillus* spp. La cellulose, un polymère linéaire de glucose, est également retrouvée fréquemment chez diverses espèces et genres bactériens, dont *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Il existe plusieurs autres polysaccharides dont le glucane chez *Streptococcus mutans* et l'alginate retrouvé chez *Pseudomonas*.

III. 7. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels (**Costerton, Stewart, Greenberg, 1999**). Les biofilms permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (**Olson et al 2002, Ceri et al 2010**). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance (certains auteurs préfèrent plutôt parler d'une tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens (**Hall-Stoodley et al 2009, Anderson et al 2008, Ceri et al 2010**). Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi lier certains agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante; ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (**Lewis, 2008**). La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) demeure la mesure de référence pour déterminer la sensibilité des bactéries planctoniques à divers agents antimicrobiens. Cependant, il faut être conscient qu'il n'existe pas une bonne corrélation entre la CMI de cultures bactériennes planctoniques et la concentration de l'agent antimicrobien requise pour éradiquer un biofilm (**Olson et al 2002**). Il est maintenant possible de déterminer la concentration minimale d'un antibiotique pouvant éradiquer un biofilm (**Harrison et al 2010**).

III. 8. Les biofilms dans les organes humains

Le biofilm, comme chez les animaux, est présent sur différents organes humains. Ces organes sont ceux où un microbiote résident est retrouvé, comme les microbiotes buccal, intestinal et respiratoire.

L'un des biofilms *in vivo* multi-espèces les plus étudiés à ce jour chez l'homme est la plaque dentaire. Ce biofilm peut être constitué de plus de 500 espèces différentes. Après un brossage des dents, une pellicule salivaire va rapidement recouvrir l'émail des dents. Cette pellicule constitue une surface exhibant des récepteurs reconnus par les bactéries colonisatrices primaires qui vont adhérer et former des co-agrégats. Il y a alors formation de la plaque initiale qui est formée à 60-90 % par des streptocoques tels que *Streptococcus oralis*. D'autres genres comme les *Actinomyces*, *Neisseria* et *Veillonella* sont identifiés dans les espèces primaires du biofilm dentaire. D'autres bactéries sont ensuite recrutées parmi lesquelles des espèces pathogènes comme *Porphyromonas gingivalis* (Periasamy et al., 2009). Les caries dentaires seraient d'ailleurs causées par des micro-organismes associés à un biofilm (Costerton et al., 1999, Donlan et al., 2002).

Le tractus gastro-intestinal abrite 10¹⁴ bactéries, qui seraient associées et structurées en biofilm d'après Macfarlane et Coll. (Macfarlane et al., 2000, Macfarlane et al., 2011). Toutefois, peu de publications rapportent la présence d'un biofilm dans le tractus gastro-intestinal. Ces microbiotes ou biofilms sont bénéfiques pour l'individu. Ils sont constitués majoritairement par des micro-organismes non pathogènes. Toutefois, des pathogènes tels que *C. difficile*, *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes* peuvent être présents dans le microbiote intestinal résident, en quantité minoritaire sans conséquence pour la santé du porteur. En revanche, une altération du microbiote intestinal permettrait la prolifération de ces micro-organismes pathogènes et la survenue d'infections pouvant être mortelles (Kleessen et al., 2005, Rupnik et al., 2009, Smedley et al., 2004).

Au niveau respiratoire, certaines maladies comme la mucoviscidose peuvent favoriser la formation d'un biofilm dans les voies respiratoires inférieures qui sont exemptes de microorganismes chez le sujet sain. Des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, formant un biofilm dans les voies respiratoires, sont souvent observées chez des patients atteints de mucoviscidose (Costerton et al., 1999, Singh et al., 2000).

III. 9. Les biofilms sur matériel étranger

Des biofilms peuvent se développer chez l'homme suite à un acte médical ou chirurgical, comme la pose d'une sonde, la mise en place d'un cathéter ou d'une prothèse artificielle (Costerton et al., 1999, Donlan et al., 2002). Le biofilm formé peut être mono ou

multi-espèces. Il serait formé par des bactéries provenant du patient lui-même ou du personnel soignant lors de l'acte chirurgical (Otto, 2008). Les staphylocoques à coagulase négative sont régulièrement identifiés dans les biofilms observés dans des infections nosocomiales, telles qu'au niveau des sutures, sur les shunts artérioveineux, les cathéters ou des valves cardiaques mécaniques (Costerton et al., 1999). Les staphylocoques à coagulase positive sont aussi impliqués dans les biofilms formés sur les cathéters (Donlan et al., 2002).

III. 10. *Escherichia coli*

E. coli est un élément important de la microflore intestinale normale des humains et d'autres mammifères. *E. coli* est également une importante diarrhée pathogène à l'origine, elle conduit à la mort de porcs et se produit dans le monde entier. *E. coli* entérotoxigène (ETEC), produisant des adhésines qui interviennent dans l'adhérence des bactéries dans les intestins et entérotoxines, est la principale cause de diarrhée post-sevrage. *E. coli* entéropathogènes (EPEC) est un autre type de *E. coli*, et semble être associée à environ 6% des cas de diarrhée post-sevrage (Fairbrother et al., 2005).

De nombreux isolats de *E. coli* ont la capacité de former un biofilm *in vivo* et *in vitro*. Trois polysaccharides extracellulaires, la cellulose, la PGA et l'acide colanique sont des éléments majeurs de la matrice de biofilm de *E. coli*. Ces polymères sont liés à l'activité des contacts cellule-cellule, ce qui contribue à la formation de biofilms sur les interfaces liquide-solide, des pellicules aux interfaces air-liquide, les agrégats cellulaires et des touffes dans des cultures liquides et froissées la morphologie des colonies sur des plaques d'agar-agar (Beloin et al., 2008). PGA est produit par *E. coli* K-12 et est impliqué à la fois l'adhésion cellule-cellule et la formation de l'attachement permanent aux surfaces (Agladze et al., 2005). *In vivo*, lorsque *E. coli* exprime les gènes nécessaires à l'agrégation et la exopolysaccharide production, l'expression des gènes de virulence est à son plus haut (Beloin et al., 2008).



Figure N°15: Photographies par microscopie électronique d'*Escherichia coli*. (Anderson et al., 2003).

III. 11. *Staphylococcus aureus*

Résistant à la méthicilline *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonisation chez les porcs a été rapportée dans de nombreuses régions, comme l'Europe, l'Amérique du Nord et en Asie. SARM peut être transmis entre les porcs et les humains. L'exposition à des porcs est le principal facteur d'infection par le SARM chez les humains. ST398 MRSA est considéré comme le SARM de l'élevage associé, car il semble avoir son origine chez les porcs, et il pourrait conduire à des infections à SARM humaines (**Khanna et al 2007; Smith et Pearson 2011; Fitzgerald 2012**). En outre, *S. aureus* est un pathogène majeur de la mammite bovine. La formation du biofilm est considéré comme étant un important facteur de virulence de *S. aureus*. Les biofilms produites par *S. aureus* favorisent son adhésion et la colonisation de l'épithélium de la glande mammaire (**Melchior et al 2006;. Oliveira et al., 2006**). Biofilm favorise la persistance de staphylocoques dans le tissu hôte et réduit la sensibilité aux antibiotiques (**Melchior et al., 2006**).

Le polysaccharide dans staphylocoques, appelée PIA, est synthétisé par les enzymes codées par l'opéron *ica*. Certaines souches comptent plus sur le polysaccharide pour la formation de biofilm, mais d'autres souches forment des biofilms de polysaccharide indépendant avec des matrices qui contiennent principalement des protéines et EDNA. Les biofilms reposent sur des polysaccharides pour la structure intégrité. Certaines protéines de surface telles que les protéines liant la fibronectine, la protéine A, SASG et Bap, sont associés à des interactions cellule-cellule et cellule-surface (**Boles et Horswill 2011**).

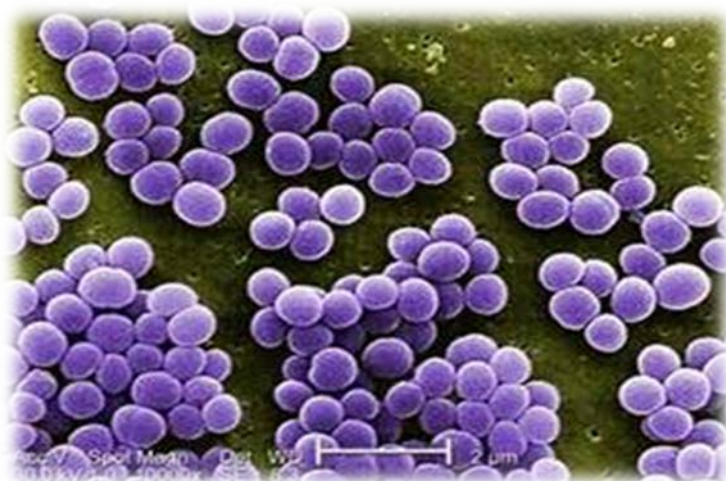


Figure N°16: Photographies par microscopie de *staphylococcus*. (**Masako, 2005**)

111. 12. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (**Donlan, 2002**).

111. 12. 1. Caractéristiques de la surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm.

Rugosité de la surface.

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (**Donlan, 2002**). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (**Donlan&Costerton, 2002**). Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques.

Propriétés physico-chimiques de la surface.

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outrepasser les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaisons hydrophobes (**Bendinger, 1993**).

Présence de films protéiques sur la surface.

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de la surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide intersitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (**Mittelman, 1996**).

La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux. Prenons l'exemple des bactéries formant le biofilm de la plaque dentaire. Elles se fixent sur un film protéique,

présent à la surface de l'émail dentaire et composé d'albumine, de lysosymes, de glycoprotéines, de phosphoprotéines et de lipides (Donlan, 2002). La présence de films protéiques sur des implants médicaux en contact direct avec un fluide favorisent la formation de biofilms. Par exemple, les cathéters veineux centraux, en contact direct avec le sang, sont recouverts de plaquettes, de plasma et de protéines: albumine, fibrinogène, fibronectine, laminine...(Goller, 2008).

L'attachement à une matrice protéique est la première étape de formation d'un biofilm dans le corps humain (Otto, 2008). Par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* expriment à leur surface des molécules, les MSCRAMM11, capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine (Patti, 1994). Ces interactions spécifiques entre matrice protéique de l'hôte et MSCRAMM sont très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne.

111. 12.2. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs. On peut citer les facteurs suivants (Goller, 2008 ; O'Toole, 2000 Donlan, 2002 ; Martinez, 2007 ; Fletcher, 1988):

_ Température,

_ PH : conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité

(Martinez, 2007),

Concentration en oxygène,

_ Concentration en fer,

_ Osmolarité,

_ Présence d'ions spécifiques,

_ Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007),

_ Concentrations en **nutriments** : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008),

Concentrations en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺, ionlanthanum) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988),

_ Hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

_ Saison : il existerait un effet saisonnier sur la formation de biofilms (Donlan, 1994).

La formation d'un biofilm dépend, selon les bactéries, de conditions environnementales différentes. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* peut former des biofilms dans n'importe quelles conditions alors que d'autres bactéries nécessitent des conditions particulières de température, de pH ou encore de nutrition. Certaines bactéries peuvent s'adapter à des milieux par des modifications génétiques (Clutterbuck, 2007).

Des conditions environnementales stressantes (fortes concentrations de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH) inhibent la biosynthèse du flagelle (Goller, 2008).

11. 12. 3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides... Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas, température basse ou forte osmolarité) (Goller, 2008). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des

caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate et fer ; microaérophilie et croissance ralentie (**Goller, 2008**).

IV.1. Lieu et objectif de l'étude

IV.1.1. Objectif de l'étude

Ce présent travail repose essentiellement sur L'effet anti biofilm des api- produits de deux variétés de miels vis-à-vis d'une souche à caractère pathogène, les bactéries: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureoginosa* et *Staphylococcus aureus*.

IV.1.2. Lieu de l'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie (site Ita), Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn- Badis, Motaganem, durant une période de (Avril à Mai 2016) et la boratoire d'hôpital de Mostaganem Chigi vara.

IV.2. Techniques et méthodes expérimentales

IV.2.1. Matériels biologiques

IV.2.1.1. Le miel

Notre étude a porté sur deux échantillons du miel, dont deux variétés récolté dans la région de sud Algérien (Ain ouassara). Tous les miels provenaient de la récolte 2015, qui sont conservés dans des flacons en verre, à l'abri de la lumière et bien mélangé, et stocké non dilué à une température ambiante.



Figure N⁰17: Les différentes variétés de miels

IV.2.1. 2. Préparation de propolis solution

La propolis était macéré à froid pour faire un extrait (huile brute propolis 20 g / olive 2 ml) d'huile d'olive .Le mélange est chauffé à 50 ° C pendant 15 min avant les tests microbiologique.

IV. 2.1. 3. Préparation de miel avec huile d'olive propolis.

Le mélange a été agité délicatement avec une spatule jusqu'à ce que le gel homogène. Le mélange a été chauffé à 50 ° C pendant 15 minutes. Pour un essai microbiologique d'un mélange de miel et 20 g de propolis a été faite, dans laquelle le miel est ajouté en une concentration de 25, 50 ou 100%

IV. 2.2. Matériels utilisés**IV. 2.2.1.Appareillages**

- Autoclave (Sanoclave)
- Agitateur magnétique
- Bain- marie
- Balance analytique
- Barreau magnétique
- Etuve (Herocus)
- PH metre
- Spectrophotomètre (Jenway)
- Vortex (Techno Kartell TK 3s)

IV. 2.2.2. Verreries

- Becher
- Boite de pétri de 55 et 90 cm

- Entonnoir
- Erlenmeyer
- Flacon
- Pipette pasteur
- Pipette graduée
- Pissette
- Seringues en verre graduées (1,2 et 5 ml)
- Tubes à essai

IV. 2.2.3. Autres matériels

- Bec benzène
- Etiquettes
- Pince en bois
- Porte tube
- Spatule

IV. 2. 2.4. Les produits utilisés

- Gélose nutritif
- Bouillon nutritif
- King A (gélose et liquide)
- Chapman (gélose et liquide)
- Mac conkey
- Eau distillée
- Eau javel (chlorure de sodium)
- Eau physiologique 0.9%

IV. 2.3. Souches bactériennes testées

Trois souches bactériennes pathogènes ont été étudiées. Deux bactéries Gram(-) : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aureoginosa* et une bactérie Gram(+) : *Staphylococcus aureus*. Avant utilisation, les bactéries sont sub-cultivées d'abord en stries sur milieu de culture liquide puis en milieu de culture solide.



Figure 18 : les trois bactériennes, *P. aureoginosa*, *E. Coli.*, *S. Aureus*.

IV. 2.4 Préparation des solutions du miel

Des solutions des miels ont été préparés immédiatement avant d'examiner en diluant le miel aux concentrations requière (pure), 50% (v/v), 25% (v/v). Tous les échantillons ont été alors incubés pour 30 minutes à 37⁰C.

L'incubation a été effectuée dans l'obscurité parce que le peroxyde d'hydrogène et l'oxydase sont sensibles à la lumière (**White and subers, 1964**).

IV. 2.5 Activités bactériennes

IV. 2.5.1. Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition)

Prendre deux colonies de suspension bactérienne dans un 5ml d'eau physiologie pour obtenir la densité optique à 625 nm dans un intervalle [0,08 – 0,13] → 10⁶UFC.



Figure 19: Préparation les trois bactérienne a densité optique à 625 nm dans un intervalle [0,08 – 0,13] → 10^6 UFC pour la Technique de spectrophotomètre

0.2 ml de la suspension bactérienne a été inoculé dans 4 ml de volume de concentration en miel dans une éprouvette tandis que l'inoculation de 4 ml de volume de milieu de culture (BN) liquide avec 0.2 ml de la suspension bactérienne servait de commande. La densité optique a été déterminée dans un spectrophotomètre à 620 nanomètre avant l'incubation (t_0) et a enregistré. Les cultures ont été incubées pendant 24 heures dans l'obscurité à 37°C . Après 24 heures d'incubation, les densités optiques étaient de nouveau (t_{24}) déterminé et enregistré.

L'inhibition de la croissance pour chaque dilution a été déterminée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = 1 - (\text{DO}_{\text{test}} / \text{DO}_{\text{Control}}) \times 100$$

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = (\text{DO}_{\text{test}} / \text{DO}_{\text{Control}}) \times 100$$

DO: Densité optique

DO_{test}: Densité optique ($t_{24}-t_0$) dilution de miel

DO_{control}: Densité optique ($t_{24}-t_0$) (gélose nutritive)

Les témoins négatifs ont été préparés par ajout des souches testées aux milieux adéquats sans inhibiteur.

IV. 2.5.2. Technique de diffusion en puits

La gélose nutritive (20ml) coulée en boîtes de pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm, estensemencée par écouvillonnage de la surface par la suspension bactériennes avec une densité de 10^6 UFC/ml. Les boîtes sont ensuite mises à sécher pendant 15 minutes à température ambiante. Nous avons aménagé des cavités (puits) de 5 mm, centre à centre. Puis à l'aide d'une pipette dans la gélose, les puits doivent 21 mm, centre à centre, Puis nous avons rempli les puits avec le miel à partir de différentes concentration ensuite les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'action du miel se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. L'activité anti biofilms a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle transparente, le diamètre de la zone d'inhibition déterminée par les différentes concentrations de miel. (El-shaer et ghanem, 1966).

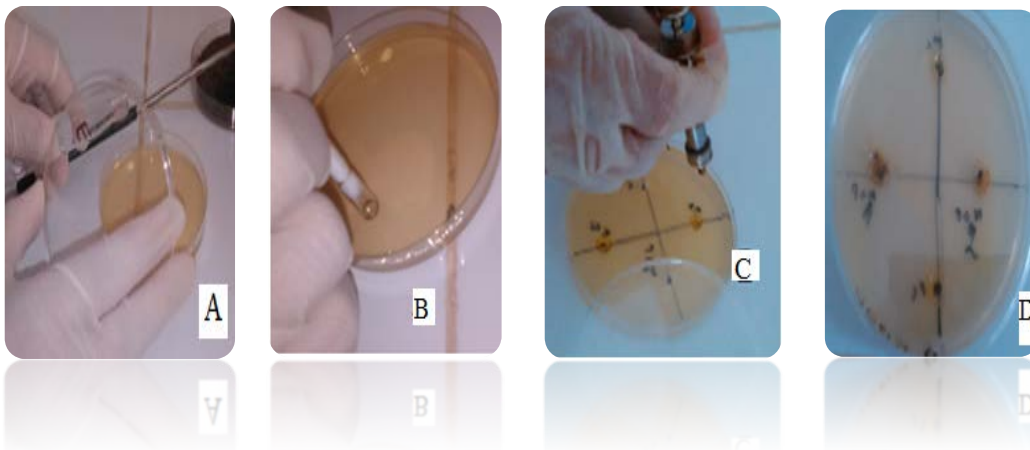


Figure 20 : A, B, C et D les étapes de Technique de diffusion en puits

IV. 2.5.3. Adhésion des bactéries à la surface des cathéters urinaires

Pour favoriser la formation des biofilms sur les cathéters urinaires stériles, 4ml de gélose nutritive et 0.2 ml de suspension bactérienne ont été ajoutés dans des tubes à essais contenant des différentes concentrations du (2 miel-propolis et 2 miel).

Les tubes ont a été incubé pendant 24 h à 37°C. L'action de chaque concentration contre les cellules bactériennes adhérees à la surface des cathéters a été évaluée après 24 heures.

1. Résultats

1.1. Tests d'activité antimicrobienne par la méthode spectrophotomètre (Taux d'inhibition (%))

Les résultats sont consignés dans la figure 21, 22, 23, 24 25 et 26. Nos résultats montrent que les miels inhibent les germes testés à des degrés divers avec des pourcentages d'inhibition variant entre 0 et 67 %. Le degré d'inhibition variant en fonction du miel utilisé, du degré de dilution et de la souche testée.

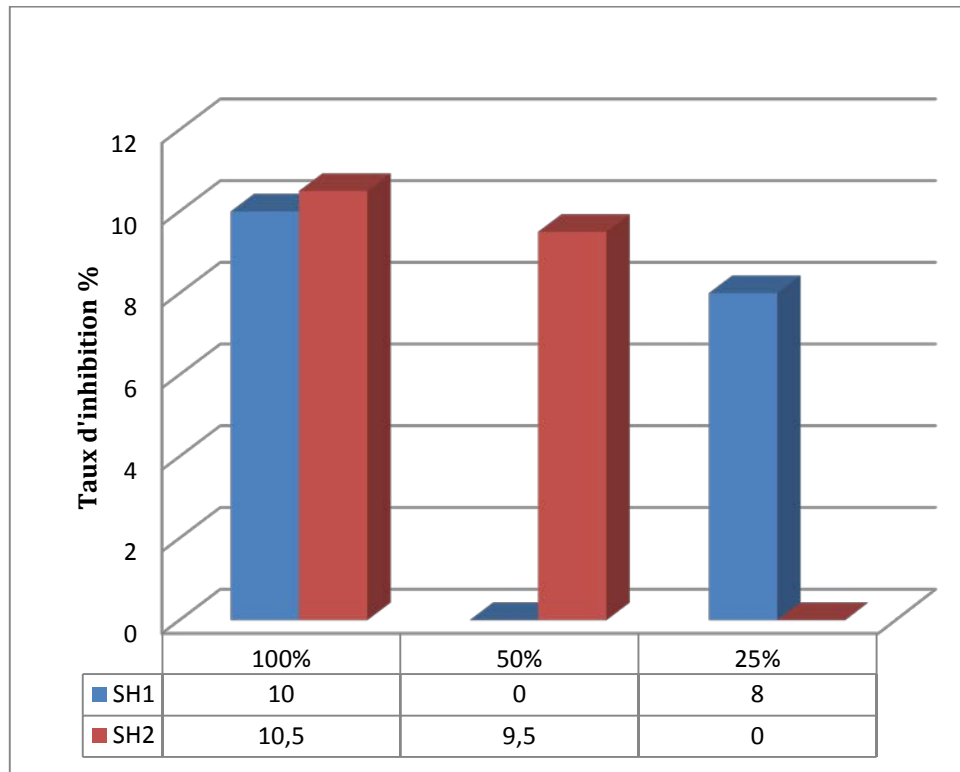


Figure 21 : Les taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *S.aureus*

Les résultats des tests d'inhibition de *S. aureus* montrent que le miel pur est doué d'une faible activité antibactérienne avec des taux d'inhibition allant de 10 à 10.5 %. Les valeurs des taux d'inhibition obtenues grâce aux miels dilués étaient de 0 à 9.5%

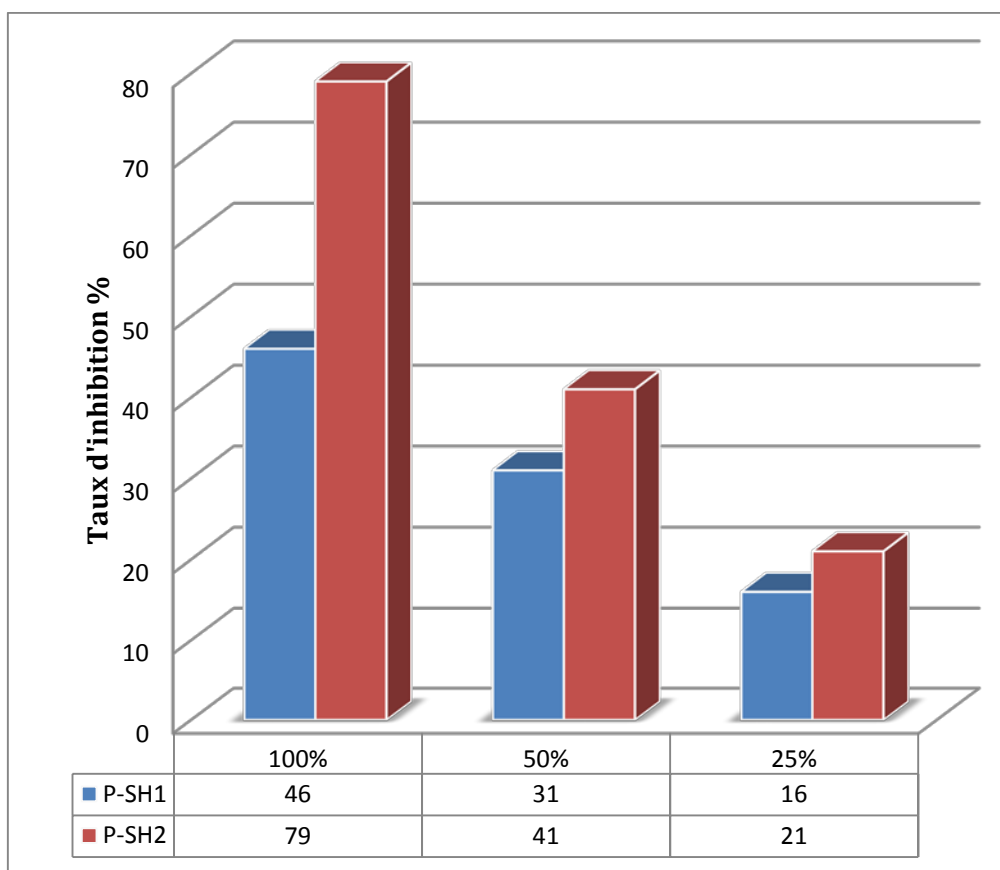


Figure 22 : Les taux inhibition (%) des P-MS vis-à-vis de *S.aureus*

Si l'on considère l'ensemble des résultats, il ressort que les miels et propolis sont pratiquement actifs sur la s souche testée. En effet, les miels purs avec la propolis s'est révélées plus actifs aux miels dilués **Figure 22**

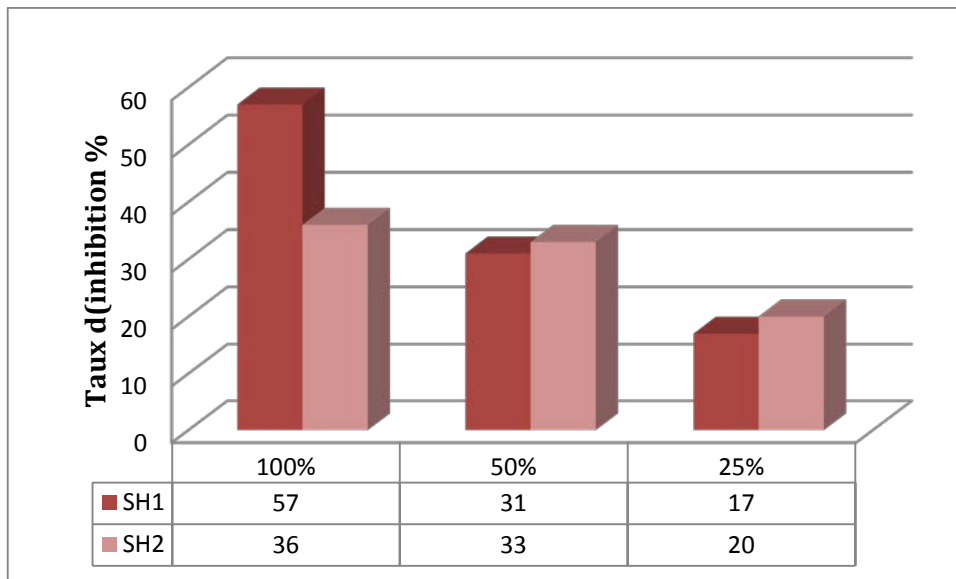


Figure 23 : Les taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *P.aeruginosa*

Les taux d’inhibition les plus élevés ont été observés avec les miels purs, avec un taux moyen de 46,5 %. Le taux moyen d’inhibition obtenue grâce aux miels dilués était de 32 % et 18.5 %. **Figure 23**

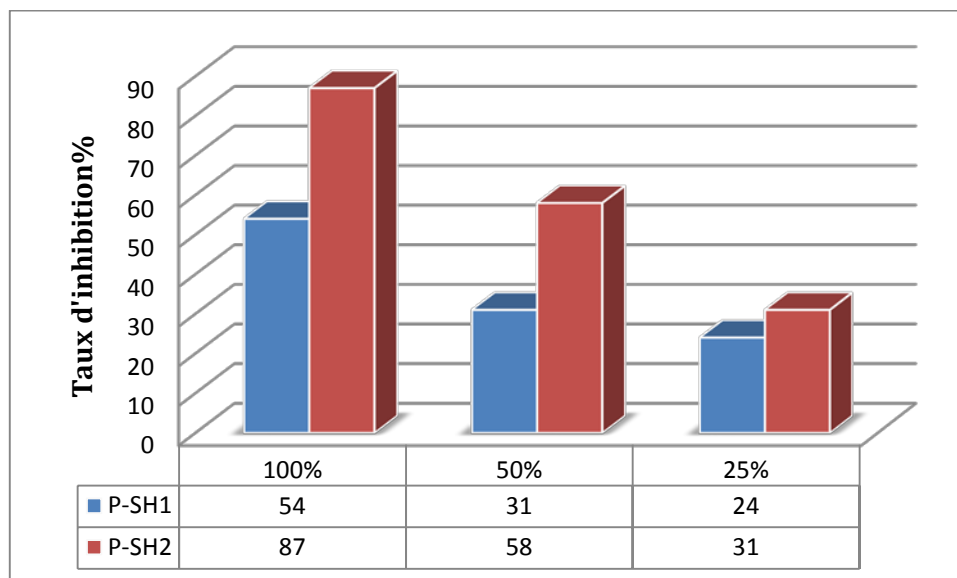


Figure 24 : Les taux inhibition (%) des P-MS vis-à-vis de *P.aeruginosa*

Les résultats des tests d’inhibition de *P. aeruginosa* montrent que le miel pur avec la propolis est doué d’une forte activité antibactérienne avec des taux d’inhibition allant de 54

et 87%. Les valeurs des taux d'inhibition obtenues grâce aux miels dilués étaient de 24 et 58 %.

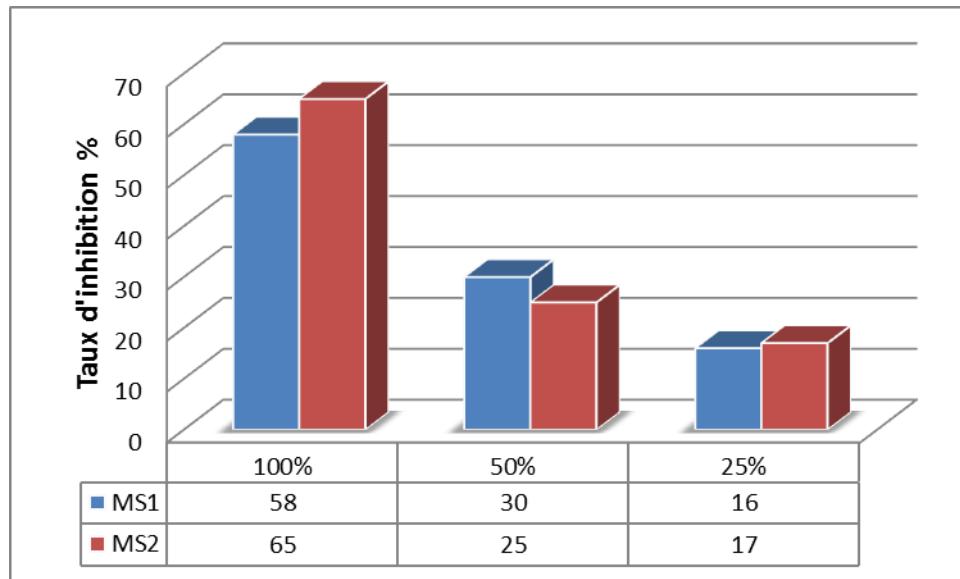


Figure 25 : Les taux inhibition (%) des miels vis-à-vis de *E.coli*

Les résultats le test d'inhibition sont consignés dans la figure 25. L'analyse de ces résultats montre que les taux d'inhibitions sont plus prononcés pour les miels purs par rapport aux miels dilués. Les taux d'inhibition varient entre 22 à 67%.

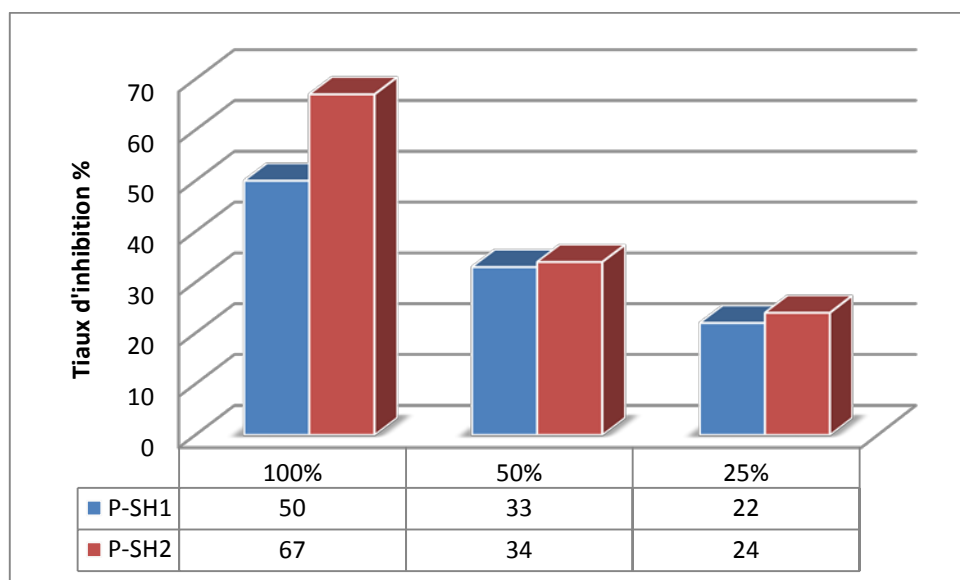


Figure 26 : Les taux inhibition (%) des P-SHs vis-à-vis de *E.coli*

Les résultats des tests d'inhibition de *E.coli* montrent que le miel pur avec la propolis est doué d'une forte activité antibactérienne avec des taux d'inhibition allant de 54 et 87 %. Les valeurs des taux d'inhibition obtenues grâce aux miels dilués étaient de 24 et 58 %.

1.2. Technique de diffusion en puits

Les résultats de l'évaluation antibactérienne du miel et synergique des miels à différentes concentrations et l'effet synergique avec la propolis sont repris ci-dessous (**Tableau 10**). Dans ces tableaux sont incluses les valeurs en (mm) des diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruits sous l'action du miel.

Tableau 10 : Les résultats de Technique de diffusion en puits

Mean Zones of Inhibition (diameter mm including well (8 mm))									
Concentrations	<i>S. aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>E.coli</i>		
	100%	50%	25%	100%	50%	25%	100%	50%	25%
SH1	20	15	13	16	14	13	17	12	11
SH2	18	13	11	15	14	12	19	13	11
Propo-SH1	17	12	11	17	11	9	16	13	11
Propo-SH2	18	13	11	19	15	12	18	12	11
Negative control	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les résultats des tests de sensibilité sont consignés dans les **Tableaux 10**. L'analyse de ces résultats montre que les zones d'inhibition sont plus prononcées pour les miels purs par rapport aux miels dilués. En fonction du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne, les différentes bactéries ont été classées : "sensibles" si la zone d'inhibition est supérieure à 12 mm, "modérément sensibles" si elle est comprise entre 6 et 11 mm, "résistantes" si elle est inférieure à 5 mm (**Couquet al.2013**). Il est à noter que les zones d'inhibition pour ce qui est du miel pur est dans tous les cas >14 avec des moyennes de 19 ; 15,5 et 18 mm vis-à-vis de *S.aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa* respectivement. Celle des miels dilués se situe entre 11 et 15 mm avec une moyenne de 13.75 mm.

2. Discussion

Les antibiotiques ont été massivement utilisés durant les dernières décennies pour traiter les infections bactériennes chroniques et aiguës (**Rémy et al, 2016**). Ces agents antibactériens induisent une résistance chez les bactéries et diminuant considérablement l'efficacité des antibiotiques. La persistance des pathogènes dans les cathéters est extrêmement problématique pour la santé des patients et engendre des coûts importants (**Jacobsen et al.2008**).Au cours des dernières décennies, de nombreuses molécules d'origine végétale (contenues en particulier dans les produits de la ruche) permettent un contrôle du développement bactérien en biofilm. C'est le cas avec :le miel et la propolis). Plusieurs travaux ont rapporté les effets bactériostatiques et bactéricides de ces produits et de leurs constituants sur une multitude de bactéries et des champignons pathogènes.(**Veloze et al.2015 ; Ahmed et al. 2014**).De nombreuses méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobiennes des produits de la ruche (miel et propolis) ont été rapportées dans la littérature. La plupart sont basées sur des études *in vitro* utilisant dans la majorité des cas des méthodes de diffusion en agar (test de diffusion sur disque ou test de diffusion en puits) et des méthodes de dilution en agar ou cultures en milieu liquide, taux d'inhibition ou les trois à des fins comparatives, car la performance antimicrobienne dans les trois méthodes peut varier (**Brudzynski et al.2012**). Cependant, le principal inconvénient de ces études *in vitro* est la difficulté de comparer les résultats les uns aux autres en raison de la grande divergence entre les différentes méthodes de tests adoptées ainsi que le type de produit testé. Dans notre étude les échantillons ont montré une activité inhibitrice sur les microorganismes testés, mais à des degrés différents en fonction de la variété de miel, du degré de dilution et de la méthode utilisée.

Les propriétés du produit anti-biofilm d'abeille en tant qu'agent antibiotique naturel ont été largement étudiées. Activités antibactériennes fortes de la propolis et du miel contre les bactéries pathogènes ont été rapportés **Campeau and Patel,2014**. En outre, plusieurs chercheurs ont examiné les effets de miel et de la propolis sur les biofilms. **Campeau et Patel [20]** ont rapporté que le miel Manuka a une interaction synergique avec la vancomycine contre les biofilms de *S. aureus* et une interaction additive avec la gentamicine contre *P. aeruginosa* biofilms. En outre, **Al-waili et al., 2005** a mis en évidence dans une étude l'efficacité d'une préparation à base de miel, cire d'abeille et huile d'olive sur *S.aureus*. Il a démontré que la croissance d'*S.aureus* était inhibée à une concentration de 50 et 60 % de la préparation.

Les effets thérapeutiques de la propolis et du miel sont bien connus. Plusieurs aspects de cette utilisation indiquaient qu'il possède également des fonctions telles que propriétés antibactériennes et anti-biofilm. L'activité biologique du miel et de la propolis sont principalement attribuées aux composés phénoliques tels que les flavonoïdes **Viuda-Martos et al. 2008**. Il a été récemment rapporté que plusieurs flavonoïdes ont réduit la formation de biofilms dans *V. harveyi* et *E. coli* O157: H7 (**Vikram et al.2010**). En outre, différents miels ont été étudiés pour la présence de nitrite / nitrate et l'oxyde nitrique stable (NO) **Al-Waili,2003**. **Barraud et al. (2006)** observe une diminution de la biomasse biofilm et une augmentation de la biomasse planctonique à de faibles concentrations de donneurs de NO. En outre, le miel est une solution saturée ou sursaturée d'hydrates de carbone, dont le fructose et le glucose. **Ansari et, Alexander, 2009**. Les travaux antérieurs de **Dusane et al.,2008** ont signalé que le taux de glucose lauroyle après 48 heures d'incubation avec *P. aeruginosa* et *Pseudomonas aureofaciens* a donné lieu à 51 et 57% de la perturbation de biofilms préformées, respectivement. Carvacrol (thymol isomère) est présent dans l'huile essentielle de propolis algérienne (4,47%) **Segueniet al.(2010)**. Effet antibactérien du carvacrol et du

thymol son isomère contre *E. coli* et *P.aeruginosa* et *E. faecalis* ont été prouvées **Dakshita and Ashish, (2014)**. Plusieurs études ont examiné l'effet de différents types de traitement antimicrobien dans le contrôle de la formation de biofilm sur ces dispositifs (cathéters veineux centraux, les valves cardiaques mécaniques et les cathéters urinaires .Donlan2001. A notre connaissance, ceci est la première fois, rapporte un de nouveaux agents anti-biofilm; (MS et P-MS) sur les organismes testés. P et P-MS présentent d'excellentes propriétés antibactériennes et anti-adhésives contre *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, comme en témoigne notre essais à base d'adhérence.

Conclusion et perspectives

Le présent travail a permis de mettre en évidence l'effet antibactérien et anti-biofilm de deux variétés du miel avec la propolis sur trois germes potentiellement impliqués dans les infections urinaires chez l'Homme. Les résultats obtenus montrent que tous les échantillons ont montré une activité inhibitrice sur les microorganismes testés, mais à des degrés différents en fonction de la variété de miel, du degré de dilution et de la méthode utilisée. Le miel et la propolis (M-P) semblent une stratégie prometteuse pour renforcer notre arsenal contre les infections bactériennes. Le (M-P), constituent des alternatives naturels prometteurs aux traitements classiques. Il serait donc intéressant d'entreprendre des études approfondies afin d'obtenir un forme galénique efficace contre les biofilms.

1. Technique de spectrophotomètre

Tableau 11: La Densité Optique de SH1

SH1							
T ₀				T ₂₄			
Bactéries Concentration	S. aureus	P. .aeruginosa	E .coli	Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli
100%	0.652	0.561	0.731	100%	0.182	0.199	0.35
50%	0.363	0.402	0.453	50%	0.102	0.204	0.199
25%	0.280	0.240	0.258	25%	0.140	0.128	0.126

Tableau 12 : La Densité Optique de SH1+P

SH1+P							
T ₀				T ₂₄			
Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli	Bactéries Concentration	S. aureus	P. .aeruginosa	E .coli
100%	0.945	0.959	0.885	100%	0.487	0.614	0.456
50%	0.688	0.402	0.591	50%	0.381	0.209	0.309
25%	0.346	0.302	0.291	25%	0.188	0.150	0.108

Tableau 13: La Densité Optique de SH2

CH2							
T ₀				T ₂₄			
Bactéries Concentration	S. aureus	P. .aeruginosa	E .coli	Bactéries Concentration	S. aureus	P. .aeruginosa	E .coli
100%	0.944	0.553	0.942	100%	0.421	0.325	0.383
50%	0.490	0.525	0.358	50%	0.206	0.347	0.178
25%	0.321	0.287	0.342	25%	0.238	0.179	0.203

Tableau 14 : La Densité Optique de SH2+P

CH2+ P							
T ₀				T ₂₄			
Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli	Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli
100%	2.015	2.109	2.279	100%	1.217	1.543	1.623
50%	1.339	1.191	1.844	50%	0.926	0.822	1.553
25%	0.786	1.030	0.958	25%	0.576	0.834	0.756

Tableau 15 : la Densité Optique de control

4 ml bouillon nutritif avec 0,2 ml de la suspension bactérien

Tempes Bactéries	T ₀	T ₂₄
P .aeruginosa	-0 .020	0 .631
S. aureus	-0 .037	0.992
E .coli	-0.047	0.830

Tableau 16 : Densité Optique (t₂₄ –t₀) de CH1 et CH1+P

CH1				CH 1+ P			
T ₂₄ -T ₀				T ₂₄ -T ₀			
Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli	Bactéries Concentration	S. aureus	P .aeruginosa	E .coli
100%	-0.470	-0.362	-0.496	100%	-0.458	-0.345	-0.129
50%	-0.261	-0.198	-0.254	50%	-0.307	-0.193	-0.012
25%	-0.140	-0.112	-0.132	25%	-0.158	-0.152	-0.182

Tableau 17: Densité Optique (t₂₄ –t₀) de CH2 et CH2+P

CH2				CH2+ P			
T ₂₄ -T ₀				T ₂₄ -T ₀			
Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli	Bactéries Concentration	S. aureus	P. aeruginosa	E .coli
100%	-0.523	-0.228	-0.559	100%	-0.798	-0.566	-0.656
50%	-0.284	-0.178	-0.207	50%	-0.413	-0.369	-0.291
25%	-0.158	-0.108	-0.139	25%	-0.210	-0.196	-0.202

Tableau 18: La Densité Optique (t24 –t0) de bouillon nutritif

Temps Bactéries	T24-T0
P .aeruginosa	0.650
S. aureus	1.029
E .coli	0.877

Tableau 19: Pourcentage inhibition(%) de CH1 et CH1+P

CH1				CH1+P			
Bactéries	S. aureus	P .aeruginosa	E .coli	Bactéries	S. aureus	P .aeruginosa	E .coli
Concentration				Concentration			
100%	47	57	58	100%	46	54	50
50%	26	31	30	50%	31	31	33
25%	17	17	16	25%	16	24	22

Tableau 20: Pourcentage inhibition(%) de CH2 et CH2+P

CH2				CH2+P			
Bactéries	S. aureus	P .aeruginosa	E .coli	Bactéries	S. aureus	P .aeruginosa	E .coli
Concentration				Concentration			
100%	52	36	65	100%	79	87	67
50%	29	33	25	50%	41	58	34
25%	16	20	17	25%	21	31	24

2. Les milieux de culture utilisent

2.1. La composition et préparation de Chapman

-Peptone.....	10 g	} 111 g par litre de milieu -Autoclavage
-Extrait de viande bœuf.....	1g	
-Chlorure de sodium.....	75,5g	
-Mannitol.....	10g	
-Rouge de phénol.....	0,025g	
-Agar.....	15g	
-PH=7,4		

2.1. La composition et préparation de King A

- Peptone.....	20g	} Dissoudre 51,5g de poudre King A dans un litre d'eau distillée -Autoclave 15'à121C°
-Sulfate de potassium.....	10g	
-Chlorure de magnésium.....	1,5g	
-Agar.....	20g	
PH=7,2		

2.1. La composition et préparation de BN

-Extrait de viande.....1g	}	Dissoudre 31, 5g de poudre dans un litre d'eau distillée
- Extrait de levure.....2, 5g		
-Peptone.....5g		
-Na cl.....5g		
- Agar.....18g		
-PH=7		- Autoclavage

2.1. La composition et préparation de BN

- Peptone.....20g	}	-Dissoudre le poudre dans un litre d'eau distillée
-Lactose10g		
-Seles biliaire.....1, 5g		
-Cristal violet.....0,001g		
-Rouge neutre.....0, 05g		
- Chlorure de sodium.....5g		
- Agar.....15g		
-PH=7,4		- Autoclavage

Références bibliographiques

1. Agladze K, Wang X, Romeo T. (2005): Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol* 187: 8237-8246.
2. Ahmed M, Aissat S, Djebli N.(2014). Preliminary Investigation on antimycotic synergism of raw honey and essential oil of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) *Med Aromat Plants* 3:177. doi: 10.4172/2167-0412.1000177
3. Ahmed M, Djebli N, Aissat S , (2013).In vitro synergistic antibacterial activity of Natural Honey Combined with Curcuma Starch and Their Correlation with Diastase Number, Flavonoid and Polyphenol content. *J Plant PatholMicrob* /dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000152
4. Ahmed M, Djebli N, Meslem A, Aissat S. (2012).Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Negative Bacilli : *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Disease* 211-214 dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60048-6,
5. Ahmed M, Djebli N, Meslem AM, Aissat S. (2012).Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Positive cocci: *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pac J Tro Med.* 773-776. doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60141-2,
6. Ahmed M, Khiati B, Aissat S and Djebli N (2015). Preliminary study on synergistic combinations of raw honey with gentamicin against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* of Veterinary Origin. *Journal of Coastal Life Medicine* 3(5): 374-377
7. Ahmed M, Khiati B, Aissat S and Djebli N (2016). Colour Intensity, Polyphenol Content and Antibacterial Capacity of Unheated and Heat-Treated Sahara Honey. *J Food Process Technol* , 7:6
8. Alencar, S. M., Oldoni, T. L., Castro, M. L., Cabral, I. S. R. Costa-Neto; C.M., Cury, J. A.? Rosalen, P. L., Ikegaki, M. (2007): Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol*, 113 (2): 278-83.
9. Al-Waili NS. Identification of nitric oxide metabolites in various honeys: effects of intravenous honey on plasma and urinary nitric oxide metabolites concentrations. *J Med Food.* 2003; Winter;6(4):359-64.

10. Anderson GG, O'Toole GA. (2008): Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*; 322:85–105.
11. Andrieux. J. P ; (2003) : Du nectar au miel. Apiculture, membre du comité de rédaction Agriculture. Biodiversité et abeilles. France. Pp : 05.
12. Ansari AA, Alexander C. Effects of natural honey (produced by *African scutellaria* in Guyana) against bacteria (*P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus*) and fungus (*C. albicans*) *World J. Dairy Food Sci* 2009;4:73–77.
13. Apfelbaum. M, Romon. M, Dubus. M ; (2004) : diététique et nutrition, 6^{ème} édition : Masson, paris. Pp : 345-346.
14. B. Rémy , L. Plenerb, M. Eliasc, D. Daudéb, ,E. Chabrièrea .Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques ? *Ann Pharm Fr* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2016.06.005>.
15. Bankova, V., Dyalgerov, A., Popov, S. (1987) : A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. F Naturforsch*, 42: 147-151.
16. Bankova, V (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Altern Med*, 2: 29-32.
17. Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188(21), 7344–7353 (2006).
18. Beatriz et al., (2009) : Yacine, Z. (2014): Effet Anti-inflammatoire de l'extrait de la Propolis Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master en Nutrition et santé; Université de Mostaganem.
19. Behlau, I. & Gilmore, M. S. (2008): Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol* 126: 1572-1581.
20. Belas, R. 2013. When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Mol Microbiol* 90:1-5.
21. Belhout. A ; (2001) : Etude des caractéristiques physico-chimiques et spectre pollinique de quelques miels d'Algérie, mémoire de fin d'étude d'Institut National d'Enseignement Supérieur d'Agronomie-Mostaganem.
22. Belkebeche Zakaria et Benaïssa Mohammed ; (2007) : Analyses physico-chimique et chromatographie du miel de cinq régions de l'ouest Algérien (Mostaganem Mascara Temouchent Tlemcen et Saida).
23. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. (2008): *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 249-289.

24. Beloin. C., Roux; A & Ghigo, J. M. (2008) : *Escherichia coli* biofilms. *Cur Top Microbiol Immunol* 322: 249-289.
25. Biri M ; (1986) : L'élevage moderne des abeilles, édition : Devecchi. S. a. paris. Pp : 91-101.
26. Bjarnsholt, T., M. Alhede, S. R. Eickhardt-Sorensen, C. Moser, M. Kuhl, P. O. Jensen, and N. Hoiby (2013): The in vivo biofilm. *Trends Microbiol* 21:466-74.
27. Bogdanov. S, Bieri. K, Gremaud, (2005): Miel monofloraux suisses, Centre de recherches apicoles, Station de recherches en production animale et laitière : 52-55p.
28. Bogdanov. S, Bieri. K, Gremaud. G, (2004): produits apicoles, pollen, Agroscope Liebefeld-Posieux, Station fédérale de recherches en production animale et laitière (ALP), Centre de recherches apicoles, Liebefeld-Berne, 6. 37 p.
29. Bogdanov. S, Bieri. K; Kilchenman, V; Gallmann, P; (2005): schweizer sortenhonige. *ALP forum* 23 d: 3-55.
30. Bogdanov. S, Ruoff. K, Oddopl, (2004): physicochemical methods for the characterization of unifloral honeys. *Apidologie* 35.17 p.
31. Bogdanov. S. Gallmann. P, Stangaciu et Theodore. C. T ; (2006): produits apicoles et santé. *ALP forum*, N° 41 F p : 15.
32. Boles BR, Horswill AR. (2011): Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends Microbiol* 19: 449-455.
33. Boudjreda, I., Bouras, N., Khadra, H., Kharroubi, M. (2013): Effet de Antibactérien de la Propolis sur Certaines Espèces Bactériennes, *Microbiologie Appliquée et Biotechnologie*; Université de Mostaganem.
34. Boyanova L, 2006: In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria., 12(4): 173-177.
35. Bozcuk Erdem G., Imez S. (2003) : Inhibitory effect of bursa propolis on dental caries formation in Rats Inoculated with *streptococcus sorbinus*. Haccettepe University Ankara Turkey.
36. Broudiscou LAURENT., PHILIPPE Papon., Yves., Broudiscou., Anne F. (1997): Maintenance of rumen protozoa populations' in adual out flow continous fermenter F. *Sci. Food Agrec*, p75, 273.
37. Bruneton J, (1999): *Pharmacognosie : phytochimie des plantes médicinales*. 2eme édition. tech et doc. lavoisier (paris). Ressources médicinales de la flore française. Tome 2

38. Campeau MEM, Patel R. Antibiofilm activity of Manuka honey in combination with antibiotics, Hindawi Publishing Corporation. *Int. J. Bacteriol* 2014; 7 Article ID 795281.
39. Cardile, V., Panico, A., Gentile, B., Borrelli, F., Russo, A. (2003): Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*, 73: 1027-1035.
40. Carmichael, I., I. S. Harper, M. J. Coventry, P. W. Taylor, J. Wan, and M. W. Hickey. (1998): Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. *JAppl Microbiol* 85 Suppl 1:45S-51S.
41. Castolda, S., Cappaso, F. (2002) : propolis an old remedy used in moden medicin. *Fitoterapia*, 73: 51-56.
42. Centers for Disease Control and Prevention Public Health Reports. 2007. Healthcare-associated infections and deaths in U.S. In *Hospitals*, Eds Monina Klevens R, Mars-Avril,
43. Ceri H, Olson ME, Turner RJ. (2010): Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother*; 11:1233–1237.
44. Codex Alimentarius, (2006) : projet pour une révision des normes relatives au miel.
45. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999): Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*.;284:1318–1322.
46. Costerton, J. W., G. G. Geesey, and K. J. Cheng (1978): How bacteria stick. *Sci Am* 238:86-Costerton, J. W., and H. M. Lappin-Scott (2003): Introduction to microbial biofilms. 1995, p. 1-11. *In* H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge.
47. Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-22.
48. Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, and G. James (1994): Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176:2137-42.
49. Crane, E. (1997): *Bees and beekeeping: science, practice and world Resource*. Cornstock publ., Ithaca, NY., USA. 593Pp.
50. Cuellar A., Rojas Henandez, N. H. and Martinez, J. (1990): p (New antimicrobial structure from propolis collected in Cuba) *Reviste Cubana de farmacia*, 24(1): 51-58.
51. Dakshita J. Sinha and Ashish A. Sinha¹. Natural medicaments in dentistry. *Ayu*. 2014; 35(2): 113–118.
52. Donadieu Y (1984), et Gonnet (1982) :pollen thérapeutique naturelles. 5éme Ed Maloine S.A .Paris.31p.

53. Donadieu Y. (1981): La gelée royale, 5^e ed., Maloine SA. Editeurs, Paris f honeybees.
54. Donadieu. Y, (1978) : le miel thérapeutique 2^{ème} ED Maloine S. A. Paris. 28p.
55. Donlan RM, Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerg Infect Dis* 2001; (7):2:277-281
56. Donlan, R. M., and J. W. Costerton (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-93.
57. Donlan, R. M., and J. W. Costerton. (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-93.
58. Dusane DH, Rajput JK, Kumar AR, Nancharaiah YV, Venugopalan VP, Zinjarde SS. Disruption of fungal and bacterial biofilms by lauroyl glucose. *Lett. Appl. Microbiol.*2008; 47(5), 374–379.
59. Ernst E., Pettler Mh., Stevinson E., White A., Eisenberg D. (2005): Médecine alternatives le guide critique, Edition Française de la coordination scientifique p 175.
60. Etienne Bruneau ; (2003) : Les produits de la ruche LE TRAITE RUSTICA de l'Apiculture 2002, Edition Rustica, Paris Deuxième édition : février 2003 p : 354.
61. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. (2005): *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6: 17-39.
62. Filloux, A. & Vallet, I. (2003): Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Med Sci (Paris)* 19: 77-83.
63. Fitzgerald JR. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends Microbiol* 20: 192-198.
64. Flemming H-C, Wingender J. (2010): The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*; 8:623–633.
65. Flemming, H. C., and J. Wingender. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623-33.
66. Fredot. E ;(2007) : connaissance des aliments. ED : TEC et DOC. Lavoisier (PARIS).284p.
67. Gardana. (2007): La propolis et les abeilles.
68. Ghedia K., Goetz, P., Le jeune, R. (2005): Propolis *Phytothérapie*, 7 :100-105.
69. Ghisalberti, E. (1979): Propolis: areview., *Bee Worde* 60 (2): 59-84.
70. Ghisalberti, E. L. (1979): *Bee Worde*.
71. Gonnet. M, (1982) : Le miel ; composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture. Pp : 1- 18-31.

72. Gout. J; (1998): Le monde du miel et des abeilles. Edition Delachaux et Niestlé. S. A.
73. Grange, J. M. & Davey, R. W. (1990): Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med* (83): 159-60.
74. Grange, J. M. & Davey, R. W. (1990): *Journal of the Royal Society of Medicine*.
75. Gregory SR. (2002): Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. 8(1): 77-83.
76. Grunberger, D. and 7 others. (1988): Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phynethyl ester isolated from propolis
77. Hall-Stoodley L, Stoodley P(2009): Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*; 11:1034–1043.
78. Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95-108.
79. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ, Allan ND, Olson ME, Ceri H. (2010)Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: A miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc*; 5:1236–1254.
80. Hashimoto, T., Ase, K., Sawamura, S., Kikkawa, U., Saito, N., Tanaka, C; & Nishizuka, Y. (1988): Postnatal development of a brain-specific subspecies of protein Kinase C in rat., *J. Neurosci* (8): 1678-1683.
81. Hausen, B. M., Wollenweber, E., Senff, H. &Post, B. (1987):Propolis allergy. II. The sensitizing properties of 1,1- dimethylallyl caffeic acid ester., *Contact Dermatitis* (17): 171-177.
82. Henrici, A. T(1933): Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol* 25:277-87.
83. Huchet. E, Coustel. J, Guinot. L, (1996) : les constituants chimiques du miel. Méthode d'analyse chimique. Département de science et l'aliment. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. France. 16p.
84. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirliff ME. Com-plicated catheter-associated urinary tract infections due toEscherichia coli and Proteus mirabilis. *ClinMicrobiol Rev*2008;21:26—59.
85. Jasprica, D., Mornar, A., Debelijak, Z., Smolcic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan; K., Balog, T., Sobocanes, S., Sverko, V. (2007): In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and blood cells. *J. Ethnopharmacol*, (110): 548-554.

86. Jean ; Prost, P., Le Conte, Y. (2005): Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher. *Ed Lavoisier*.
87. Jeanine. F ; (1993) : Le miel, définition, origines propriétés et composition. 2^{ème} édition. *But. Tech. A pic*, Vol.18, N° 3, P 147-152.
88. Jolivet-Gougeon, A., and M. Bonnaure-Mallet (2014): Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov Today Technol* 11:49-56.
89. Kalogropoulas, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V. (2009): Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial propolis extracts from Greece and Cyprus. *F. Chem*, (116): 452-461.
90. Kaplan, J. B. (2010): Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 89: 205-218.
91. Karatan E, Watnick P. (2009): Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*; 73:310–347.
92. Katrina Brudzynski, Kamal Abubaker, Danielle Miotto. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry* 133 (2012) 329–336.
93. Kedzia, B. & Holderena, E. (1986): Investigations on the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*., *Herba Pol* (32): 187-195 (in Polish).
94. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. (2008): Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 128: 298-303.
95. Kleessen, B., and M. Blaut. (2005): Modulation of gut mucosal biofilms. *Br J Nutr* 93 Suppl1:S35-40.
96. Kolankay, D., Selmano, G., Sorkun, K., Bekir, S. (2002): protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *F. Chem*, (87): 213-217.
97. Krell, R. (1996) : Value-added products from beekeeping. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, FOA Agricultural Services. Bulletin 124.
98. Laffont. G ; (2000) : les bienfaits du miel. Ed : Michel Laffont, 212p.
99. Leopoldini, M., Russo, N., Chiodo, S., Toscano, M. (2010): Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agri. F. Chem*, (54): 6343-6351.
100. Lewis K (2008): Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top.*

- Microbiol. Immunol. 322: 107- 131.
101. Lewis K. (2008): Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*; 322:107–131.
102. Logerot Jacques., Martin Laurence Binet Marie-Neige., Taufour Remy., Nicolas Jean-Luc., le prince Laurent. (2003):Info agricole Edition Fédération des centres de gestion Agréés Agricoles F. C. G. A. A. n° 85-13p.
103. 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.
104. Louveaux. J, (1968) : L'analyse pollinique des miels, in *Traité de biologie de l'abeille*. Tome 03. Edition Masson et Cie, pris. Pp 324-361.
105. Louveaux. J, (1985) : Les produits de la ruche. in « les abeilles et leur élevage », p165-199.
106. Louveaux. J, (1985) :Les abeilles et leur élevage. 2^{ème} édition. OPIDA, P 18-19, 168-172.
107. Macfarlane, G. T., and S. Macfarlane. (2000): Growth of mucin degrading bacteria in biofilms. *Methods Mol Biol* 125:439-52.
108. Macfarlane, S., B. Bahrami, and G. T. Macfarlane. (2011): Mucosal biofilm communities in the human intestinal tract. *Adv Appl Microbiol* 75:111-43.
109. MacLean RJC, Bates CL, Barnes MB (2004): Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. *Microbial biofilms*, ASM Press, 379-413.
110. Manikis et Thrasylvoulou ; (2001) : La relation entre les caractéristique physiques et chimiques des miels et leur paramètre de cristallisation *Apiacta* 36(2). Pp : 418.
111. Marquele FD et al, *J Pharm Biomed Anal* (2005): Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations., 39(3-4), 455-462.
112. Martini MC and Seiller M (2006) : Actifs et additifs en cosmétologies. 3ème édition, Lavoisierp338-350.
113. Martini MC and Seiller M (2006) : Actifs et additifs en cosmétologies. 3ème édition, Lavoisier p338-350
114. Maryadele, J., O'Neil, Ann Smith, Patricia, E. Heckelman, Susan Budavari. (2001): *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and*

- Boilogs, 13th edition, MERCK & COINC, 2564p. (ISBN 0911910131), Monograph number 7928.
115. McLaughlin-Borlace, L., F. Stapleton, M. Matheson, and J. K. Dart (1998): Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *J Appl Microbiol* 84:827-38.
116. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. (2006): Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B* 53: 326-332.
117. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. (2006): Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J* 171: 398-407.
118. Meresta, L. & Meresta, T. (1985): An attempt to use propolis extract in the treatment of mastitis of cows., *Med Weter* (41): 489-492 (in Polish), *Apic Abstr* (1988) 39(3).
119. Mlagan, V. & Sulimanovic, D. (1982): Action of propolis solutions on *Bacillus larvae*., *Apiacta* (17): 16-20.
120. Monzur ; (2008) : article publier en anglais dans le journal Muslim Technologiste sous le titre « Bees and the miracles of hony » et apparut en ligne dans le site Ummah.
121. Morris, C. E., J. Monier, and M. Jacques (1997): Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 63:1570-6.
122. Moudir Naima, (2004):Les plyphénols de la propolis algérienne. Thèse de magister en chimie. Université Mohamed Boudiaf, M'sila.
123. Nacer. C ; (1994) : Influence d'un biotype sur le rendement et la qualité d'un miel. INFSA de Mostaganem. Mémoire de fin d'étude d'Institut Science d'Agronomie-Mostaganem.
124. Nagy, M. (1989): Constituent of propolis Czechoslovak origin. *Chemical papers*. (42): 691-696.
125. National Honey Board.A ; (2005) : hony . A reference guide to nature's sweetener. National Honey Board, USA. Pp: 08.
126. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SE, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. (2006): Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 118: 133-140.

127. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. (2002): Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*; 66:86–92.
128. Otto, M. (2008): Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322:207-28.
129. Papay, V. (1987): Chemical and pharmacological study of propolis from locations. *Acta pharmac. Hung*, (57): 143-151.
130. Periasamy, S., N. I. Chalmers, L. Du-Thumm, and P. E. Kolenbrander. (2009): *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Appl Environ Microbiol* 75:3250-7.
131. Phillippe. J. M ; (1999) : Le guide de l'apiculture, 3^{ème} édition. Edition EDISOUD LACALAD. Pp : 209-216.
132. Popravco, SA. (2005): Composition chimique et activité biologique de propolis.
133. Prost. P. J ; (1987) : apiculture, connaitre l'abeille conduire le ruche. Ed : Lavoisier paris 6^{ème} édition p : 309-316.
134. Prost. P. J et Conte. Y. L ; (2005) : apiculture, connaitre l'abeille, conduire le ruche. Ed : TEC et DOC Lavoisier ; paris 7^{ème} édition. Pp : 382-385-387-682.
135. Raoul, A. (1992): La route du miel: le grand livre des abeilles et de l'apiculture. *Ed Nathan*.
136. Ravazzi ; (2007) : Elever des abeilles et du miel. Alison Benjamin et Brian Mc Callum.
137. Rodriguez-Navarro, D. N., M. S. Dardanelli, and J. E. Ruiz-Sainz (2007): Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272:127-36.
138. Ross, P., B. (1990): The effects of propolis fractions on cells in tissue culture. M. Phil. Thesis, University of wales college og Cardiff, U. K.
139. Rupnik, M., M. H. Wilcox, and D. N. Gerding. (2009): *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7:526-36.
140. Schmidt, J. O. and Buchmann, S. L. (1992): Other products of the hive. In: The hive and the honeybees J. M. graham, ed. Dadant & sons, Hamilton, Illinois, USA. 927-988.

141. Segueni N, Khadraoui F, Moussaoui F, Zellagui A Gherraf N, Lahouel M and RhouatiSVolatil constituents of Algerian propolis Ann Biol Res, 2010; 1 (2) :103-107
142. Silici, S., Kultuca, S. (2005): Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. ethnopharm*, (99): 69-73.
143. Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg. (2000): *Quorum-sensing* signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407:762-4.
144. Smedley, J. G., 3rd, and B. A. McClane. (2004): Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect Immun* 72:6914-23.
145. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2008 Aug;57(Pt 8):966-73. doi: 10.1099/jmm.0.47668-0.
146. Smith TC, Pearson N. (2011): The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 327-339.
147. Sosnowski, Z. M. (1984): Method for extracting propolis and water soluble by propolis powder obtained there by and cosmetic and pharmaceutical preparations containing same.
148. Stevin, A. (1996): La recherche de la propolis.
149. Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187-209.
150. Tenke, P., Kovacs, Jackel, M. & Nagy, E. (2006): The role of biofilm infection in urology. *World Urol* 24: 13-20.
151. Tournefeuille le 7 décembre (2014): La propolis : définition, récolte, propriétés et utilisation.
152. Tozi, E. A., Ciappini, M. C., Cazzolli, A. F., Tapiz, L.M. (2006): Physico-chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *APIACTA*, (41): 110-120.
153. Van Houdt R, Michiels CW. (2005): Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*
154. Vecchi. S A ; (1999) : Le grand livre des abeilles, l'apiculture moderne, édition de vecchi s.a Paris : 124-154.

155. Veloz JJ, Saavedra N, Lillo A, Alvear M, Barrientos L, and Salazar LA. Antibiofilm Activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* Is Influenced by the Year of Collection. *BiomedRes Int* 2015 ; Article ID 291351, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/291351>
156. Vikram A, Jayaprakasha GK., Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *J. Appl. Microbiol* 2010; 109:515–527.
157. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci.* 2008;73(9):R117-24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x.
158. Wade Carlson., Joan A., Friedrich Pho. (1999): Propolis power plus the health promoting properties of the amazing beehive energizer, edition Keats good health guides.
159. Yacine, Z. (2014): Effet Anti-inflammatoire de l'extrait de la Propolis Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master en Nutrition et santé; Université de Mostaganem.
160. Zobell, C. E (1943): The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* 46:39-56.
161. Assie, Descottes B. (dir.). Toulouse III (2004) : Thèse d'exercice : Médecine. Toulouse : Le miel comme agent cicatrisant. 115 p.
162. Goethe ; P (2009) : Le miel comme traitement local désinfectant et cicatrisant des plaies. *Phytothérapie*, , vol. 7, n°2, p. 91-93.

Résumé

Dans la première partie de la présente étude, on a procédé à l'évaluation de l'effet antibactérien et anti-biofilms de deux variétés du miel de Sahara (Sud Algérien) vis-à-vis de trois (03) isolats bactériens incluant deux bactéries Gram (-) et une bactérie Gram (+).

Des tests antibactériens de deux miels par technique de diffusion en puits et technique de spectrophotomètre ont été effectués sur trois (03) isolats bactériens. Deux dilutions ont été préparées allant de 50% (v/v) et 25%. **Résultats:** Les Zones d'inhibitions varient entre 9 mm et 20 mm et les pourcentages d'inhibitions entre 0 et 87%.

Dans la seconde partie, les deux miels en association avec la propolis ont été testés pour leur effet antibactérien et anti-biofilms vis-à-vis des biofilms de 24 heures formés par *S. aureus*, *P. aureginosa* et *E. coli*. Toutes les préparations ont montré une efficacité anti-biofilms spectaculaire dans l'élimination de la totalité des biofilms.

Mots-clés: Antibacterien; Antibiofilm; propolis, Miel

ملخص:

في الجزء الأول من هذه الدراسة، قمنا بتقييم مفعول مضادة للبكتيريا ومضادة للبيوفيلم لنوعين من عسل الصحراء (جنوب الجزائر) لمواجهة ثلاثة (03) عزلات بكتيرية بما في ذلك اثنين غرام (-) وبكتيريا غرام (+).

تم إجراء اختبارات مضادة للجراثيم اثنين من العسل بتقنية انتشار حول الجب و تقنية مقياس الضوء الطيفي باستخدام ثلاثة عزلات بكتيرية مع تحقيضين نسبة 25% (v/v) ونسبة 50% (v/v) لنوعين من العسل.

النتائج: مناطق تثبيط تختلف بين 9 مم و 20 مم ونسب تثبيط بين 0 و 87%.

في الجزء الثاني، تم اختبار نوعين من العسل مختلفين في تركيبة مع propolis من أجل دراسة أهمية مفعول مضاد الجراثيم ومضاد للبيوفيلم وجها لوجه مع الأغشية الحيوية لمدة 24 ساعة التي شكلتها مع *S. aureus*, *P. aureginosa* et *E. coli*. وأظهرت كافة الدراسات فعالية في القضاء الهائلة في مكافحة بيوفيلم على كل الأغشية الحيوية.

كلمات مفتاحية: مضاد للبكتيريا، مضاد للبيوفيلم، العسل.