

**Ministere De L'enseignement Superieur Et De La Recherche Scientifique**

**Universite Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem**

**Faculte Des Sciences De La Nature Et De La Vie**

**Departement De Biologie**



**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES**

Présenté par

**Yousfi Khadidja & Zitouni Fatma**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**: PHRMACOGNOSIE & PHYTOTHÉRAPIE**

**THÈME**

**L'effet anti fongique des Api  
produits (miel-propolis) sur  
C.albican.**

Soutenu le 11 /10/2016

**DEVANT LE JURY**

Président	<b>Dr.Hammadi k Professeur</b>	<b>Université de Mostaganem</b>
Encadreur	<b>Dr. Moussa. A MCB</b>	<b>Université de Tiaret</b>
Examineur	<b>Mr Bakouri. H MAA</b>	<b>Université de Mostaganem</b>

*Thème réalisé au Laboratoire de pharmacognosie et phytothérapie*

*Année universitaire : 2015-2016*

Remerciements	
Dédicace	
Abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumé	
Introduction.....	01

*Première Partie : Synthèse Bibliographique*

*Chapitre I : Le Miel*

<b>I.1.</b> Définition .....	02
<b>I.2.</b> Historique .....	02
<b>I.3.</b> Origine de miel.....	02
<b>I.3.1.</b> Nectar.....	03
<b>I.3.1.1.</b> Définition.....	03
<b>I.3.1.2.</b> Composition.....	03
<b>I.3.2.</b> Miellat.....	04
<b>I.3.2.1.</b> Définition.....	04
<b>I.3.2.2.</b> Composition.....	04
<b>I.3.2.3.</b> L'origine géographique.....	04
<b>I.5.</b> Différents types de miel.....	04
<b>I.5.1.</b> Miels monofloraux .....	05
<b>I.5.2.</b> Miel polyfloraux.....	05
<b>I.6.</b> Elaboration du miel.....	05
<b>I.7.</b> Composition du miel.....	05
<b>I.7.1.</b> Composants majeurs.....	06
<b>I.7.1.1.</b> Eau.....	06
<b>I.7.1.2.</b> Hydrate de carbone.....	07

<b>I.7.2.</b> Composants mineurs.....	07
<b>I.7.2.1.</b> Les acides organiques.....	07
<b>I.7.2.2.</b> Les acides aminés et protéines.....	07
<b>I.7.2.3.</b> Les lipides.....	08
<b>I.7.2.4.</b> Les sels minéraux.....	08
<b>I.7.2.5.</b> Les enzymes.....	08
<b>I.7.2.6.</b> L'hydroxyméthyl-furfural (HMF).....	09
<b>I.7.3.</b> Constituants divers.....	09
<b>I.7.3.1.</b> Les vitamines.....	09
<b>I.7.3.2.</b> Les polyphénols.....	10
<b>I.7.3.3.</b> Les Arômes.....	10
<b>I.8.</b> Les propriétés du miel.....	11
<b>I.8.1.</b> Propriétés physiques.....	11
<b>I.8.2.</b> Propriétés électriques.....	11
<b>I.8.3.</b> Propriétés thermiques.....	11
<b>I.8.4.</b> Propriétés optiques.....	12
<b>I.8.5.</b> Propriétés chimiques.....	12
<b>I.8.6.</b> Propriétés biologique du miel.....	14
<b>I.9.</b> Production du miel dans le monde.....	15
<b>I.9.1.</b> Le miel en algérie.....	16
<b>I.9.2.</b> La production national en miel.....	16
<b>I.9.3.</b> Les limite de la production et la commercialisation du miel Algérien.....	17
<b>I.10.</b> La récolte du miel.....	17
<b>I.11.</b> Les facteurs d'altération de miel.....	21
<b>I.12.</b> Stockage et conditionnement.....	23

*Chapitre II : les propolis*

<b>II.1.</b> Définition.....	24
<b>II.2.</b> Etymologie du mot propolis.....	24
<b>II.3.</b> Histoire.....	24
<b>II.4.</b> Utilisation de la propolis.....	25
<b>II.5.</b> Récolte de la propolis par les abeilles.....	27
<b>II.6.</b> La récolte de la propolis par l'apiculteur.....	28
<b>II.6.1.</b> Le classique : grattage des cadres ou des parois de la ruche.....	28
<b>II.6.2.</b> Le système de grille.....	28
<b>II.6.3.</b> L'extraction de la propolis.....	29
<b>II.6.4.</b> Conservation.....	30
<b>II.7.</b> Les différents types de propolis.....	30
<b>II.8.</b> Composition chimique.....	32
<b>II.8.1.</b> Les composés phénoliques et les acides aromatiques.....	33
<b>II.8.1.1.</b> Phénoliques.....	33
<b>II.8.1.2.</b> Les acides organiques.....	33
<b>II.8.1.3.</b> Les Terpènes.....	33
<b>II.8.1.4.</b> Les huiles essentielles.....	33
<b>II.8.1.5.</b> Les vitamines et les oligo-éléments.....	34
<b>II.8.1.6.</b> Les flavonoïdes.....	34
<b>II.9.</b> Description et caractéristiques de la propolis.....	36
<b>II.10.</b> Effet thérapeutique de la propolis.....	36

<b>II.10.1.</b> Les propriétés pharmacologiques de la propolis.....	37
<b>II.10.1.1.</b> Propriété anti- infectieuse.....	37
<b>II.10.1.2.</b> Propriété anti- oxydante de la propolis.....	38
<b>II.10.1.3.</b> Propriétés anti-inflammatoires.....	38
<b>II.10.1.4.</b> Propriétés anti- cicatrisantes et anesthésiques.....	39
<b>II.10.1.5.</b> Propriété anticancéreuses.....	39
<b>II.10.1.6.</b> Propriété digestives.....	40
<b>II.10.1.7.</b> Autres propriétés.....	40
<b>II.11.</b> Caractéristiques physico-chimiques de la propolis.....	41

*Chapitre III : LES BIOFILMS*

<b>III.1.</b> Généralités.....	42
<b>III.2.</b> Définition.....	42
<b>III.3.</b> Etapes de formation d'un biofilm.....	43
<b>III.4.</b> Expression génétique au sein du biofilm.....	44
<b>III.4.1.</b> Rôle de la gangue polymère.....	45
<b>III.5.</b> Organisation d'un biofilm.....	45
<b>III.6.</b> Résistance des biofilms aux agressions externes.....	46
<b>III.7.</b> Impact des biofilms sur leur environnement.....	47
<b>III.7.1.</b> Les biofilms négatifs.....	47
<b>III.7.2.</b> Les biofilms positifs.....	51
<b>III.8.</b> Les méthodes de détections des biofilms.....	52
<b>III.9.</b> Levure du genre <i>condida albicans</i> .....	53
<b>III.9.1.</b> Généralité.....	53

<b>III.9.2.</b> Définition.....	53
<b>III.9.3.</b> Classification.....	53
<b>III.9.4.</b> Structure.....	53
<b>III.9.5.</b> Reproduction.....	55
<b>III.9.5.1.</b> Physiologie.....	55
<b>III.9.5.2.</b> Pathologie.....	55
<b>III.9.6.</b> Ecologie.....	56
<b>III.9.7.</b> Pouvoir pathogène.....	57
<b>III.9.8.</b> Caractères cultureux.....	57

*Deuxième Partie : Partie Expérimentale*

*Chapitre I : Matériels Et Méthodes*

<b>I.1.</b> Lieu et objectif de l'étude.....	58
<b>I.1.1.</b> Objectif de l'étude.....	58
<b>I.1.2.</b> Lieu de l'étude.....	58
<b>I.2.</b> Techniques et méthodes expérimentales.....	58
<b>I.2.1.</b> Matériels biologiques.....	58
<b>I.2.1.1.</b> Le miel.....	58
<b>I.2.1.2.</b> Microorganisme testé.....	59
<b>I.2.2.</b> Préparation de propolis solution.....	60
<b>I.2.3.</b> Préparation de miel avec olive propolis huile.....	60
<b>I.2.4.</b> Matériels utilisés.....	60
<b>I.3.</b> Technique d'ensemencement.....	61
<b>I.4.</b> Preparation des solutions du miel.....	62

<b>I.5.</b> Activités antifongiques.....	62
<b>I.5.1.</b> Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition).....	62
<b>I.5.2.</b> Technique de diffusion en puits.....	63
<b>I.6.</b> Adhésion des bactéries à la surface des cathéters urinaires.....	63

*Chapitre II : Résultats et Discussion*

<b>II.1.</b> L'activité antifongique.....	65
<b>II.1.1.</b> Technique de diffusion en puits.....	65
<b>II.1.2.</b> Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition).....	67
<b>I.2.</b> Discussion .....	68

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

# Dédicaces

*Nous dédions ce modeste travail à :*

- ✚ Nos chers parents pour leurs sacrifices, affection, encouragement et soutien moral et financier.*
  
- ✚ Nos chers frères et sœurs et à toute les familles : YOUSFI et ZITOUNI  
Et Madjaji.*
  
- ✚ Nos chères amies et tous les étudiants de Mostaganem*
  
- ✚ Particulièrement ceux de la promotion Pharmacognosie et Phytothérapie.*

# Remerciement

✚ *Nous remercions Allah le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la volonté, la patience et le courage pour réaliser ce travail à terme.*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre enseignante et promoteur M Ahmed Moussa. Nous sommes satisfaites de vos qualités exceptionnelles de bonne enseignante dont votre simplicité et votre amour du travail, ont fait de vous une enseignante admirable dont l'exemple à suivre. Recevez ici, nos sentiments de gratitude pour votre disponibilité, votre aide, votre patience au long de la réalisation et de la rédaction de ce travail.*

*Nous tenons à remercier M. Hammadi K vous nous faites un très grand bonheur en acceptant de présider notre jury du mémoire.*

*Nous tenons à remercier très sincèrement M. Bakouri H pour avoir accepté de faire partie des membres du jury de notre travail.*

*Nous tenons à remercier toute l'équipe du département de biologie et toutes les personnes avec qui nous avons partagées des bons moments*

**ADN c:** **Acide** desoxyribonucléique

**ARNm :** Acide ribonucléiquemessagé.

**cal/cm. S :** Calorie par centimètre fois Siemens

**C. albicans :** Candida albicans

**CO<sub>2</sub> :** dioxyde de carbone

**C° :** Degré Celsius

**DO :** Densité optique

**E. Coli :** Escherichia coli

**Env :** Environ

**g :** Gramme

**h :** Heure

**HMF :** Hydroxyméthyl-furfural

**Kg :** Kilogramme

**Mn :** minute

**OMS :** organisation mondiale de la santé

**UFC :** unit forming coliny

**V :** variété

**mg/kg :** milligramme par kilogramme

**mg :** milligramme

**mm :** milimètre

**Nm :** Nanomètre

**PH :** Potentiel d'hydrogène

**P. aeruginosa :** pseudomonas aeruginosa

**PIA/PNAG :** polysaccharides intercellular adhesion/Poly-N- acetylglucosamine

**PCB :** polychlorobiphényles

**qx :** Quantité

**t :** Tonne

**µm** : Micromètre

= : égal

> : Supérieur

< : Inférieur

**µg /ml** : microgramme par millilitre

<b>Tableaux 1</b> : Composition du nectar de quelque espèce végétale.....	03
<b>Tableaux2</b> : Listes, non exhaustive de tous les composants d’ déjà rencontrés dans le miel .....	06
<b>Tableaux 3</b> : principaux sels minéraux et oligo-éléments présents dans le miel.....	08
<b>Tableaux 4</b> : la durée nécessaire pour la formation de 40mg hmf/kg de miel en fonction de la température de stockage.....	09
<b>Tableaux 5</b> : vitamines dans le miel, en mg/100g .....	10
<b>Tableaux6</b> : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	10
<b>Tableaux 7</b> : La production nationale en miel.....	17
<b>Tableaux 8</b> : Influence de la richesse en levures sur la fermentation des miels.....	23
<b>Tableaux 9</b> : les types de propolis les plus rependus avec leurs principales familles de composés polyphénolique.....	31
<b>Tableaux 10</b> : Composition analytique de la propolis.....	32
<b>Tableau 11</b> : liste partielle des infections de matériel médical dues aux biofilms.....	50
<b>Tableau 12</b> : liste partielle des maladies infectieuse liée à un biofilm.....	50
<b>Tableau 13</b> : Les diamètres des zones d’inhibition de 02 variétés de miel en mm.....	65
<b>Tableau 13</b> : Les diamètres des zones d’inhibition de 02 variétés de miel en mm.....	66

<b>Figure 1</b> : Transport des hausses en brouette jusqu'à la miellarie.....	19
<b>Figure 2</b> : Désoperculation .....	19
<b>Figure 3</b> : Centrifugation .....	19
<b>Figure 4</b> : A la sortie de l'extracteur .....	20
<b>Figure 5</b> : Filtration.....	20
<b>Figure 6</b> : Les trois filtres nécessaires à la filtration de miel .....	20
<b>Figure 7</b> : Maturateur équipé de filtres .....	21
<b>Figure 8</b> : Intérieur du maturateur après 3 jours de repos .....	21
<b>Figure 9</b> : Mise en pot .....	21
<b>Figure 10</b> : l'aspect de la propolis.....	24
<b>Figure 11</b> : Les abeilles réduisent le trou de vol avec de la propolis.....	26
<b>Figure 12</b> : Grattage de la propolis par l'apiculteur.....	28
<b>Figure 13</b> : une grille plastique de détection varroa.....	29
<b>Figure 14</b> : composition de la propolis.....	33
<b>Figure 15</b> : Etapes de formation d'un biofilm.....	44
<b>Figure 16</b> : Mécanismes de résistance d'un biofilm.....	47
<b>Figure 17</b> : Présence de biofilms sur toutes les surfaces.....	49
<b>Figure 18</b> :Les différentes variétés de miels.....	58
<b>Figure 19</b> : Cathéter.....	59
<b>Figure 20</b> : Candida albicans.....	62
<b>Figure 21</b> : Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition).....	67
<b>Figure 22</b> : Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition).....	68

Le but de cette étude était d'évaluer une formulation antifongique, miel-propolis (P-M), en tant que revêtement potentiel pour empêcher la formation de biofilm sur les dispositifs médicaux comme les cathéters urinaires.

Dans la première partie : Des tests antifongiques de deux miels par méthode de diffusion en milieu solide et technique de spectrophotomètre ont été effectués sur *Candida albicans* deux dilutions ont été préparées allant de 50% (v/v) et 25 % (v/v).

Dans la seconde partie, les deux miels en association avec la propolis ont été testés pour leur effet antifongique et anti-biofilm vis-à-vis des biofilms de 48 heures formés par *C. Albicans*.

Nos résultats ont également montré un effet inhibiteur très important contre *C. Albicans*. : Les Zones d'inhibitions varient entre 0 mm et 12 mm et les pourcentages d'inhibitions entre 0 et 98.92%.

Le P-M présente une impressionnante activité antifongique qui peut entraver de manière significative la formation de biofilms et prolonger la durée de vie du dispositif.

L'effet inhibiteur de ces formules sur le développement bactérien et fongique laisse entrevoir des perspectives d'application dans le domaine médical.

**Mots clés :** Miel, Effet anti fongique, *Candida albicans*, Propolis, Biofilm, DO.

The aim of this study was to evaluate antifungal formulation, honey, propolis (P-M), as a potential coating to prevent biofilm formation on medical devices such as urinary catheters.

In the first part: Antifungal testing of two honeys by diffusion method and solid technique spectrophotometer medium were performed on *Candida albicans*. Two dilutions were prepared ranging from 50% (v / v) and 25% (v / v).

In the second part, both in combination with honey propolis have been tested for their anti-fungal and anti-biofilm vis-à-vis 48 hours biofilms formed by *C. albicans*.

Our results also showed a significant inhibitory effect against *C. albicans*. : The inhibition zones vary between 0 mm and 12 mm and the percentages of inhibition between 0 and 98.92%.

The P-M offers impressive antifungal activity that can significantly impede biofilm formation and prolong the life of the device.

The inhibitory effect of these formulations on the bacterial and fungal development suggests application prospects in the medical field.

**Key Word:** Honey- Propolis- *C. albicans*, Antifungal- DO.

و كان الهدف من هذه الدراسة تقييمها وضعا مضادا للفطريات العسل-العبر (P-M) و طلاء محتمل لمنع تشكيل البيوفيلم على سبيل المثال الأجهزة البولية.

في الجزء الأول: تم إجراء اختبار مضاد لنوعين من العسل عن طريق التقنية المتفوق على تسميتها: طريقة الانتشار في الوسط الصلب و تقنية عمل spectrophotomètre على *C.albican* قما بإعداد اثنين من التخفيفات تتراوح بين 50% (V/V) و 25% (V/V) .

في الجزء الثاني تم: دمج نوعين من العسل مع العبر (PM) تم اختبارها كمضاد للفطريات و مضاد للبيوفيلم وجها لوجه 48 ساعة المتشكلة من قبل *C.albican* .

و اطهرت النتائج التي توصلنا إليها إلى وجود تأثير كايح بشكل كبير ضد *C. albican* إن مناطق التثبيط تختلف بين 0 مم و 12 مم ونسب تثبيط بين 0 و 98.92%.

إن التأثير الكايح من هذه المستحضرات على تطوير البكتيريا والفطريات يشير إلى إمكانية التطبيق في المجال الطبي.

**كلمات مفتاحية:** العسل- النشاط المضاد للفطريات DO, Propolis, *C.albicans*

La recrudescence des affections fongiques 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 levures aux antifongiques est devenue l'un des problèmes les plus importants des thérapeutiques antifongiques. Le traitement des mycoses bénéficie actuellement de nombreux antifongiques actifs et efficaces (**Viguie, 1998**). Les biofilms naturels sont constitués de plusieurs microbes en particuliers les levures et il a été récemment montré que certaines peuvent interférer avec l'incorporation des levures au sein des biofilms (**Valle et al., 2006**).

Les biofilms présentent une grande diversité vis à vis du type du support colonisé (prothèses, Cathéters). Bien qu'il existe diverses méthodes pour le contrôle de biofilms, elles présentent des limitations à éliminer les biofilms de la surface contribuant ainsi à la dissémination des microorganismes résistants (**Ferreira et al., 2010**). Afin d'éviter l'usage de produits synthétiques et chimiques, des méthodes alternatives plus naturelles sont développées. Plusieurs chercheurs se sont intéressés dans les dernières années à l'évaluation des effets du miel et de propolis sur les biofilms visant leur utilisation ou leurs constituants comme désinfectants surtout dans le milieu hospitalier.

Le sud Algérien, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un nombre limités de plantes mellifères y poussent spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Le profil biologique du miel et la propolis de plusieurs pays a été déjà étudié. Jusqu'à présent, très peu d'études portant sur les propriétés antibactériennes du miel et de propolis Algérien ont été réalisées.

Cette partie d'étude a pour but de deux échantillons du miel a différentes concentrations seuls et en association avec la propolis sur *Candida albicans* étant résistantes aux antifongiques en utilisant les techniques préconisées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), et agréés par la majorité des pays dont le nôtre.

## I. Le miel

### I.1. Définition

Dans nombreux pays, la loi fourni une définition légale du miel. Cette dernière a pour objet la protection des consommateurs contre les différents types de fraudes susceptibles d'être pratiqués (**Louveaux, 1968**).

Le codex alimentarius définit le miel comme suit :

« le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles "*Apis mellifera*" à partir du nectar des plantes ou à partir des sécrétions provenant e parties vivantes de plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivantes de plantes, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec es substances spécifiques qu'elles sécrètent elles -même, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche» (**Codex, 2001**).

### I.2. Historique

Les produits de la ruche ont toujours fascine les hommes. Le miel d'abord, qui à constitué pendant des millénaires le millénaire en occident la seule source abondante de matières sucrées dont on pouvait disposer. Mais aussi la cire, première matière plastique connue, dont le principal emploi était l'éclairage. Sans oublier l'hydromel, une des plus anciennes boissons alcoolique de l'humanité, dont on faisait jadis une consommation impressionnante. Quand à la propolis, cette résine que les abeilles récoltent sur les bourgeons des arbres, elle était mal distinguée de la cire, mais on l'utilisait dans le folklore médical pour le pansement des blessures(**Huchet et al, 1996**).

Le miel est donc un aliment que l'humanité connaît depuis la nuit des temps. Les usages qu'en faisaient les anciens étaient très variés, que ce soit en Egypte où, considéré comme source d'immortalité, il servait à conserver la dépouille du pharaon, à Babylone où bill était employé en ophtalmologie et pour les maladies de l'oreille et en Afrique où il joue un grand rôle dans l'alimentation et la pharmacopée pour soigner brûlure, morsures de serpent ou plaies infectées.

Aujourd'hui, le miel est un aliment qui est aussi apprécié quatre fois (**Huchet et al, 1996**)

### I.3. Origine du miel

Les principales variétés de miel se classe en fonction de l'origine :

- miel de nectar
- miel de miellat

Ou en fonction du mode d'obtention :

- miel en rayon
- miel avec morceau de rayon

- miel égoutté
- miel centrifugé
- miel pressé

Le mot miel peut par ailleurs être éventuellement complété par une indication ayant trait à l'origine florale ou végétale, si le produit provient de façon prépondérante de l'origine indiquée, ou par un nom régional ou topographique (**Nacer, 1994**).

### I.3.1. Nectar

#### I.3.1.1. Définition

Le nectar est une solution aqueuse, plus ou moins concentrée, dont les sucres représentent habituellement de 20 à 40% (parfois plus de 80%). Cette solution est produite par des tissus glandulaires spécialisés, ou nectaires généralement localisés au cœur des fleurs. (**Etienne Bruneau, 2003**).

A l'intérieure des fleurs, les tissus nectarifères accumulent les sucres. Cette provision des sucres constitue une réserve qui sera utilisée ultérieurement par la plante pour assurer les premiers stades de développement des fruits et de graines après les racines traversant la plante. (**Bendahou, 2002**).

#### I.3.1.2. Composition

Le nectar est un mélange chimique complexe constitué d'eau, de sucres ainsi que d'autres substances (protéines, lipides, minéraux, etc....) (**Lequet, 2010**). Les principaux constituants du nectar sont l'eau et les sucres (saccharose, glucose, fructose) ; la teneur en eau est fortement variable de 20% à 95%. Le nectar contient aussi des acides organiques, des acides aminés, des protéines, des enzymes des vitamines et des substances aromatiques (**Scheitzer, 2004**).

**Tableau N01** :Composition du nectar de quelque espèce végétale (**Scheitzer, 2004**).

Types de nectar	Nectar de lavande	Nectar de chevrefeuille
Composition	Eau 80%	Eau 76%
	Saccharose 08%	Saccharose 12%
	Glucose 7,5%	Glucose 09%
	Gomme, résidu et pertes 4,5%	Dextrine, gomme Et pertes 03%

### I.3.2. Le miellat

#### I.3.2.1. Définition

Certains miels ne sont pas issus du nectar des fleurs mais du miellat. Ce liquide visqueux, riche en sucres et en acides aminés, est constitué par les excréments liquides des pucerons et ecochenilles.

Ceux-ci le déposent sur les feuilles, et les abeilles à miel viennent le butiner. Résultat : un miel de couleur sombre et au gout prononcé. Ainsi, le miel de sapin est en réalité un miellat, tout comme le miel de chêne ou de forêt (Alix, 2010).

#### I.3.2.2. Composition de miellat

Le miel de miellat présente une couleur ombre foncée. Son gout est agréable, il est très riche en minéraux.

Contrairement aux nectars, les miellats contiennent beaucoup d'éléments indigestes pour l'abeille y compris certains sucres polyholosides (Schweitzer, 2004).

D'après (Bogdanov et al, 2005), le miellat est composé généralement des sucres d'où la composition est très différente des nectars avec présence du glucose, de triholoside comme le mélézitose et même quelque fois de sucres supérieurs.

Le miellat contient aussi de dextrine, de gommes, de protéines et d'acides aminés, de vitamines telles que la thiamine et la biotine et d'acides organiques (acides nitriques et acides maliques) ; la charge minérale est également très importante (Bruneau, 2004).

Leur production est sous la dépendance de nombreux de facteurs écologiques : sol, microclimat, insectes « éleveurs de puceron » comme les formais, ... (Schweitzer, 2004).

#### I.3.2.3. L'origine géographique :

Pour déterminer l'origine géographique des miels, on recourt à la détermination et au dénombrement des grains de pollen (analyse qualitative du pollen) et des composants du miel présents dans les sédiments de celui-ci (Bogdanov et al, 1995). Un instrument important et utile, en plus de la littérature, c'est de recourir à une collection de préparations comparatives de pollen. Pour obtenir des résultats fiables, il faut s'attacher les services d'un expert en pollens, familiarisé avec la melisso palynologie (Bogdanov et al, 1995). Le spectre des différents types de sucres est parfois caractéristique pour certaines sortes de miel. Il n'est toutefois pas toujours possible de déterminer avec sûreté la sorte de miel au seul moyen du spectre des sucres (Bogdanov et al, 1995).

### I.5. Différents types de miel

Les différents types de miels sont définis par leurs caractéristiques sensorielles : la couleur, l'arôme, la saveur, la viscosité et la tendance plus ou moins marquée à cristalliser au cours du processus de conditionnement et de l'entreposage. Les miels diffèrent également entre eux du point de vue de leur composition chimique : acidité, contenu d'hydrates de

carbone, rapport quantitatif entre les différents sucres, teneur en acide organiques, en minéraux et en composés azotés (**Ramirez Cervantes, 2000**). En général on classe les miels selon :

### I.5.1. Miels monofloraux

Issus en majorité d'une seule variété de fleurs, ces miels ont tous une personnalité particulière (**Alix, 2010**). Les miels monofloraux possèdent des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques spécifiques (**Bogdanov, 2003**).

### I.5.2. Miels polyfloraux

Dans le cas des miels «polyfloraux», l'abeille butine plusieurs variétés de fleurs. Ils sont alors désignés par leur origine géographique, leur saison... (**Alix, 2010**). Les miels multi floraux, ou miel toutes fleurs, souvent classés suivant les lieux de récolte (miel de montagne, de forêt, etc....) ou encore suivant les saisons (miel de printemps ou d'été) (**Donadieu, 1982**).

## I.6. Elaboration du miel

Pendant le retour à la ruche, la butineuse qui a entièrement rempli son jabot à l'aide de trompe, commence la transformation du nectar ou du miellat, et leur donne son empreinte personnel (**Alexander Makhloufi, 2003**).

Sous l'effet d'enzymes particulières, principalement la gluco-invertase, le saccharose qui est le principal substituant sucré du nectar ou du miellat, se transforme au niveau du jabot en glucose, fructose (lévulose) qui sont mieux assimilables et passent rapidement dans le sang.

Les abeilles réussissent non seulement à changer la nature du sucre mais également à abaisser la teneur en eau (**Chauvin, 1968**).

L'intervention biochimique est représentée selon l'équation suivante :

Gluco-invertase



## I.7. Composition du Miel

Le miel approximativement 181 composés (**AL-Mamary et al, 2002**). C'est un produit liquide naturel, hautement sucré, avec d'autres composés en quantités tels que les acides organiques, les acides aminés, les protéines, les minéraux, les vitamines (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C), les enzymes, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les pigments (**Nanda et al, 2003 ; Ozcan et al, 2006 ; Bertoncelej et al, 2007**), ainsi que des substances volatiles donnant au miel son arôme. 3% des recommandations journalières en énergie sont apportés par 20g de miel par jour (**Anso, 2012**).

**Tableau N°02** : Listes, non exhaustive de tous les composants d' déjà rencontrés dans le miel (Irlande, 2010).

Carbohydrates (75-80%)	Acide (0,1-05%)	Protéines et Acides Aminés (0,2-2%)	Minéraux (0,1-1,5%)	Vitamines	Autres Constituants
Monosaccharides (70-75%) Fructose Glucose Disaccharides Maltose Isomaltose Saccharose Nigerose Kogibiose ... Autre Saccharides	Acides Glucuronique Acide acétique Acide butyrique Acide citrique Acide formique Acide lactique Acide malonique Acide malique Acide oxalique Acide pyroglutamique Acide succinique Acide fumarique Acide tartarique Acide $\alpha$ kétoglutarique Probablement Présents : Acide glycolique $\alpha$ ou $\beta$ Glycerophosphate Acide 2 ou 3- Phosphoglycerique Glucose 6- Phosphate Acide pyruvique	Différents types de protéine d'abeilles et de la plante d'origine Acides aminés libre : proline lysine histidine arginine Acide aspartique thréonine serine Acide Glutamique Glycine Alanine Cystine Valine Méthionine Isoleucine Leucine Tyrosine Phénylalanine Tryptophane	Potassium Sodium Calcium Magnésium Fer Cuivre Manganèse Chlore Phosphore Sulfure Aluminium Iode Bore Titane Molybdène Cobalt Zinc Plomb Etain Antimoine Chrome Nickel	Acide ascorpique Riboflavin Acide pantothénique Niacin Thiamine Pyridoxine Biotine Acide folique Enzymes $\alpha$ et $\beta$ Amylase Glucoinvertase Fructoinvertytase Glucoseoxydase Catalase Acide Phosphatase	Ester Aldéhydes Cétones alcools ...

### I.7.1. Composants majeurs

#### I.7.1.1. Eau

L'eau est présente en quantité non négligeable puisque sa teneur moyenne est de 17,2%, mais comme le miel est un produit biologique. Cette valeur peut varier. En fait, les abeilles opercules les alvéoles lorsque la teneur en eau avoisine les 18%.

Seuls les miels d'ont l'humidité est inférieure à 17% se conservent bien (**Gonnet, 1982**). Trop humide il risque de se fermenter et sa saveur est affaiblie(**Jeanine, 1993**).

Le codex alimentarius la norme de l'UE prescrit actuellement une teneur en eau maximale de 21%.

### **I.7.1.2. Hydrate de carbone**

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel, mais aussi la plus difficile à analyser (**Huchet et al, 1996**).

Les sucres représentent de 90% à 95% de la matière sèche du miel.

Chaque miel est susceptible de contenir une bonne dizaine de sucres ce sont des mono, di, tri, ou polysaccharides représentent 80% du poids total du miel. Deux d'entre eux : le glucose et le fructose, dominant nettement et représentent près de 80% (**Gletter et al, 2006**) ; les autres sucres peuvent se trouver à l'état de traces ou en quantité plus ou moins importantes, mais toujours dans des proportions qui ne dépassent pas quelques pourcentages (**Gonnet,1982**).

D'autres sucres tels que le maltose (7,2%), le saccharose (1,5%) et quelques oligosaccharides (4,2%) sont présents dans le miel (**Shin etUstunol, 2005**).

### **I.7.2. Composants mineurs.**

#### **I.7.2.1. Les acides organiques**

La plupart des acides organiques du miel proviennent des nectars des fleurs ou des transformations opérées par l'abeille. C'est l'acide gluconique dérivé du glucose qui prédomine. On y trouve une vingtaine d'acides organiques comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide oxalique, l'acide butyrique, l'acide pyroglutamique et l'acide succinique. Des traces d'acide formique (un des constants du venin), d'acide chlorhydrique et d'acide phosphorique sont aussi présentes.

D'autres composés, les lactones, dont la présence est constante, ont également une fonction acide. Le PH peut varier de 3,2 à 4,5 mais il est en moyenne de 3,9 (**Pham-Delegue, M 1999**).

#### **I.7.2.2. Les acides aminés et protéines**

La teneur des protéines varie avec la quantité de grain de pollens dans les miels, ces derniers sont généralement pauvres en protéines (**Bogdanov et al, 2004**).

Ils sont présents en faible quantité dans le miel (0,26%) et la teneur en azote est négligeable, de l'ordre de 0,041%. Il s'agit essentiellement de peptones, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines qui proviennent soit de la plante (nectars, grains de pollen), soit des sécrétions de l'abeille. Il y a également des traces d'acides aminés comme la proline, la trypsine, l'histidine, l'alanine, la glycine, la méthionine, etc. la proline est le plus abondant des acides aminés du miel. La quantité de proline donne une indication sur la qualité du miel et elle ne doit pas être inférieure à 183 mg/kg (**Meda et al, 2005**).

### I.7.2.3. Les lipides

La proportion de lipides est infime sous forme de glycérides et d'acides gras (acide palmitique, oléique et linoléique); ils proviendraient vraisemblablement de la cire (Louveaux, 1985).

### I.7.2.4. Les sels minéraux

Les matières minérales ne sont pas présentes qu'à un taux d'environ 0,1% dans les miels courants, mais sont plus abondants dans les miels foncés. Les sels de potassium représentent près de la moitié des matières minérales, mais on trouve également du calcium, du sodium, du magnésium, du cuivre, du manganèse, du chlore, du soufre, du silicium, du fer ainsi que plus trente oligo-éléments. Leur teneur dépend des plantes visitées par les abeilles ainsi que du type de sol sur lequel elles poussent (Bogdanov et al, 2004).

Le miel de fleurs contient en moyennes de 0,1 à 0,2% de substances minérales, tandis que les miellats se situent aux alentours de 1% (Louveaux, 1985).

**Tableau n° 03** : principaux sels minéraux et oligo-éléments présents dans le miel

([www.produitsapicoles23amiel.fr](http://www.produitsapicoles23amiel.fr)).

mg/kg		mg/kg	
Potassiu	200 à 1500	Chrom	0,1 à 0,3
Sodium	16 à 17	Cobalt	0,01 à 0,5
Calcium	40 à 300	Nickel	0,3 à 1,3
Magnésiu	07 à 130	Aluminium	3 à 60
Fer	03 à 40	Cuivre	0,2 à 6,0
Zinc	0,5 à 20	Cadium	0,005 à 0,15

### I.7.2.5. Les enzymes

Les miels contiennent des enzymes. Celles de l'abeille naturellement. Elles ont permis la transformation des nectars en miels. Les miels de miellats contiennent également les enzymes des aphidiens qui ont rejetés ces miellats (Schweitzer, 2004). Ces enzymes sont les constituants les plus importants du miel. Elles sont responsables de la conversion du nectar et du miellat en miel, par conséquent l'activité des enzymes participe dans la valeur biologique du miel (Vorlova et Celechovska, 2002). La majorité des enzymes trouvées dans le miel proviennent de la sécrétion des glandes hypopharyngiennes de l'ouvrière tels que :

Invertase, glucose-oxydase et amylase. Les enzymes d'origine florale sont les catalases, les phosphatases et les amylases en faibles proportion (Jeffery et Echazaretta, 1996). D'après (Louveaux, 1968), au cours de vieillissement à la température ordinaire, la teneur en enzymes du miel tend progressivement vers zéro.

### I.7.2.6. L'hydroxyméthyl-furfural (HMF)

Il est un très bon indice de dégradation car des valeurs d'HMF supérieures à 40mg/kg sont révélatrices d'une perte de qualité ; en effet, plus la teneur en HMF est faible, plus la qualité de miel s'affirme (**Oudjet, 2012**). Le miel brut ne contient pratiquement pas d'HMF ; cependant sa teneur augmente au cours du stockage en fonction du pH du miel et de la température de stockage (**Bogdanov, 1997**). Il provient d'une dégradation lente du fructose, lequel en milieu acide se décompose et perd trois molécule d'eau ; et que c'est probablement un processus auto (**Karabourniorrti et Zervalaki, 2001**).

**TableauN<sup>0</sup> 04** : la durée nécessaire pour la formation de 40mg hmf/kg de miel en fonction de la température de stockage selon (**White et al, 1994;Hadorn et al, 1962**).

Température (°C)	Durée pour la formation de 40 mg hmf/kg
04	20-80 ans
20	2-4 ans
30	0.5-1 ans
40	1-2 mois
50	5-10 mois
60	1-2 jours
70	6-20 heures

### I.7.3. Constituants divers

#### I.7.3.1. Les vitamines

Le miel en est très pauvre, il s'agit principalement des vitamines B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>9</sub>) qui seraient apportées par le pollen ; de la vitamine C et quelque fois les vitamines A, D et K.

Ainsi, le contenu moyen d'un miel en vitamines 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**).

L'ensemble des recherches effectuées jusqu'à ce jour permet d'affirmer que, si l'on reste dans le cadre des consommations journalières normales, le miel est totalement incapable de couvrir les besoins vitaminiques de l'homme : on peut considérer que les vitamines qu'il apporte, et qu'il semble bien provenir surtout de grains de pollen en suspension puisqu'une filtration poussée les élimine en grande partie, représentent une quantité pratiquement négligeable (**Chauvin, 1968**).

Tableau N<sup>o</sup> 05 : vitamines dans le miel, en mg/100g, (Bogdanov & Matzke, 2003).

<b>Thiamine (B1)</b>	0.0 - 0.01
<b>Riboflavine (B2)</b>	0.02 - 0.01
<b>Pyridoxine (B6)</b>	0.01-0.32
<b>Niacine</b>	0.10 – 0.20
<b>Acide pantothénique</b>	0.02 – 0.11
<b>Acide ascorbique (vitamine C)</b>	2.2 – 2.5
<b>Phyloquinone (vitamine k)</b>	Env. 0.025

### I.7.3.2. Les polyphénols

Parmi les constituants mineurs du miel, les polyphénols tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques jouent le rôle de substances anti-oxydantes naturelles dans notre régime alimentaire (Hertog *et al*, 1993).

Tableau n<sup>o</sup> : 06 : Activités biologiques des composés polyphénoliques (Bahorun, 1997).

<b>Polyphénols</b>	<b>Activité</b>
Acides phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Antibactérienne Antifongique Antioxydante
Coumarines	Protectrice vasculaire et Antioedémateuse
Flavonoïdes	Antitumorale Anticarcinogène Anti-inflammatoire Hypotenseur et diurétique Antioxydante
Anthocyanes	Protectrice capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effet stabilisants sur le collagène Antioxydante Antitumorale Antifongique Anti-inflammatoire
Tanins gallique et catéchiques	Antioxydante

### I.7.3.3. Les Arômes

Ce sont des mélanges de plusieurs dizaines de composés, alcools, cétones, acides, aldéhydes dont l'analyse est compliquée car la composition des arômes n'est pas stable et évolue avec le temps (Bogdanov et al, 2006).

## I.8. Les propriétés du miel

### I.8.1. Propriétés physiques

#### \*La densité

La densité, c'est-à-dire le rapport de la masse d'un miel avec le même volume d'eau, se détermine au pèse sirop ou densimètre (Louveaux, 1968). Un miel récolté trop tôt, extrait dans un local humide ou abandonné longtemps dans un maturateur contient trop d'eau.

Ce défaut se décèle au densimètre ou au réfractomètre (Jean, 2005).

#### \*La viscosité

La viscosité se définit comme la résistance à l'écoulement d'une substance. Dans le cas du miel, elle dépend de sa teneur en eau, de sa composition chimique et de sa température.

La plupart des miels se comportent comme des liquides newtoniens (il n'y a pas de résistance à l'écoulement) ; toutefois, il existe des exceptions notamment pour certains miels qui ont une composition particulière (White, 1975).

### I.8.2. Propriétés électriques

#### \*La conductibilité électrique

Elle est intéressante, car elle permet de distinguer facilement les miels de miellats des miels de nectars, les premiers ayant une conductibilité bien plus élevée que les seconds. Mais il existe des variations importantes suivant la teneur en eau et en minéraux (Bogdanov et al, 2000).

### I.8.3. Propriétés thermiques

#### \*La conductivité thermique

Le miel est 14 fois moins bon que l'eau (Bruneau, 2002),

La conductivité thermique est une mesure du transfert de chaleur. Elle est aussi désignée en tant qu'indice thermique. La conductivité du miel est relativement faible. Pour un miel liquide, elle est à 12,104 cal/cm. s. degré, pour un miel cristallisé à 12,9,105 cal/cm. s. Degré (Bogdanov et al, 2004).

#### I.8.4. Propriétés optiques

##### ✓ L'indice de réfraction

D'après **Donadieu (1978)**, plus l'indice de réfraction n'augmente, plus la teneur en eau du miel diminue. Il est de 1,47 à 1,50 à la température de 27<sup>0</sup>C.

##### ✓ Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est la caractéristique optique que possèdent les sucres de dévier le plan de la lumière polarisée. Il est utilisé pour distinguer entre les miels de nectar et les miels de miellat (**Gonnet, 1982**).

La majorité des miels de miellat ont des valeurs positives «dextrogyres» tandis que les miels de nectar ont des valeurs négatives «lévogyres» (**Nanda et al, 2003**).

##### ✓ Turbidité

Lorsque les miels sont ramenés à l'état liquide par passage à l'étuve à 65<sup>0</sup>C jusqu'à disparition totale des cristaux de glucose, ils se présentent généralement comme des liquides très transparents. Toutefois, ils contiennent toujours en suspension des éléments figurés (levures, poussières, grains de pollen, colloïdes) qui leur donnent une certaine turbidité (**Marini et al, 2004**).

##### ✓ La Coloration

La couleur du miel va du jaune très pâle au brun très foncé en passant par toutes les gammes de jaunes, d'oranges, de marrons et même parfois de verts. Si le nectar ou le miellat n'ont pas de pigments, les miels liquides seront incolores et les miels cristallisés seront blancs. Dans le cas contraire, la palette de couleur est très large. Les miels de lavande, et de tilleul sont ivoires, les miels de tournesol et de pissenlit sont jaune intenses, les miels de châtaigner, de bruyère, et de miellat sont bruns. On peut même retrouver des pigments verts dans certains miels de saule ou de sapin (**Gonnet, 1982**).

#### I.8.5. Propriétés chimiques

##### ✓ L'hygroscopicité

Un miel à 18% d'eau se trouve en équilibre dans une atmosphère dont l'humidité relative est de 60<sup>0</sup>C et dont la température est de 14<sup>0</sup>C. S'il contient plus de 20% d'eau, le miel dégagera du CO<sub>2</sub> fermentera). (**Huchet, 1996**).

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

### ✓ Acidité

L'acidité est un critère de qualité, dû aux acides organiques présent dans le miel (**Bogdanov, 1999**). La norme européenne pour le miel fixe une valeur maximale de 50 milléquivalent/kg (**Bogdanov, 2005**).

### ✓ pH

Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5 ; elle est due à la présence des acides organiques (**Bogdanov et al, 2004**).

Selon **Schweitzer (2005)**, les miels de nectar, très acides, ont un ph compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellats, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

### ✓ La solubilité

Le miel est soluble dans l'eau et l'alcool dilué. Mais insoluble dans l'alcool fort, l'éther, le chloroforme et le benzène(**Donadieu, 1978**).

#### • Cendre

La teneur en cendre est critère de qualité qui dépend de l'origine botanique du miel : le miel de nectar a une teneur en cendre plus faible que le miel de miellat (**Vorwohl, 1964**).

#### • Hydroxyméthyl furfural (HMF)

On appelle Hydroxyméthyl furfural, ou simplement HMF, un dérivé de déshydratation des hexoses qui se forme dans le miel au cours de son vieillissement, dans un miel conservé à température ordinaire (entre 15 et 20<sup>0</sup>C) (**Kuçuk et al, 2007**).

La détermination du taux d'HMF est la mesure à un longueur d'onde déterminée de la coloration rouge due à l'action de l'HMF d'un miel s'exprime en mg/kg, la limite légale est actuellement de 40 mg/kg max. un miel de bonne qualité ne devrait pas avoir un taux supérieure à 25mg/kg (**Downey et al, 2005**).

#### • Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires dont les principales sources sont les sécrétions végétales. Parmi les structures identifiées dans le miel : les acides phénoliques (acides benzoïques et cinnamiques), les flavonoïques (flavones et les flavanones) en proportions très variables (**Al-Mamary et al, 2002**).

#### • Cristallisation

Les miels à cristallisation rapide se cristallisent le plus souvent très finement, alors que les miels à cristallisation lente ont tendance à avoir une cristallisation grossière (**louveaux, 1968**).

La vitesse de cristallisation dépend surtout du teneur en glucose du miel (**White, 1962**)(**Bogdanov et al, 1997**).

### Le phénomène de cristallisation s'explique par

La teneur en sucres car un miel riche en fructose ne cristallise pas, à l'inverse d'un miel riche en glucose (teneur >28%) qui cristallise très rapidement ;

La température de conservation ;

L'origine botanique (**Oudjet, 2012**).

### I.8.6. Propriétés biologique du miel

Le miel est non seulement un aliment mais on peut le considérer comme un médicament car il possède maintes propriétés biologiques. Ces propriétés sont dues essentiellement à sa composition qui est variable en fonction des plantes butinées, des conditions climatiques et environnementales (**Lobreau-Callen et al, 1999**).

#### • Propriétés anti oxydantes

Les antioxydants jouent un rôle important dans la préservation des aliments et la santé humaine, par désactivation et stabilisation des agents d'oxydation responsables de nombreuses maladies telles que le cancer, la cataracte, le diabète, les maladies cardiovasculaires et les différents processus d'inflammation (**Meda et al, 2005**).

Le miel est utilisé comme source naturelle d'antioxydants qui sont efficaces pour la réduction des risques de ces maladies (**Meda et al, 2005**).

Cependant, cette activité est variable d'un miel à un autre selon la source botanique et la présence de différents composés antioxydants (**Al-Mamary et al, 2002**).

#### • Propriétés antimicrobiennes

Plusieurs facteurs contribuent à l'activité antimicrobienne : la haute pression osmotique, l'oxydation enzymatique du glucose, la faible activité de l'eau et l'acidité (**Cortopassi-LaurinoEtgelli, 1991**).

#### • Propriétés thérapeutiques

Outre leurs qualités énergétiques, tous les miels ont des vertus thérapeutiques communes, plus ou moins marquées selon leur origine florale.

Ainsi, de manière générale et résumée, on peut dire quel miel...

- Combat la fatigue et l'anémie, grâce à sa richesse en sucres et sa capacité à favoriser la fixation des sels minéraux.
- Empêche la prolifération des bactéries, virus et champignons.
- Facilite la digestion, le travail de l'estomac et améliore le métabolisme. Il a aussi un effet laxatif.

- Permet de prévenir l'apparition de certains cancers, maladies cardio-vasculaires et neurogénéralives grâce à la présence d'antioxydants et notamment de flavonoïdes (**Alix, 2010**).

Le secret antiseptique du miel, c'est l'eau oxygénée qu'il produit naturellement ! Cette fabrication découle de la présence d'une enzyme (le glucose-oxydase) utilisée par l'abeille pour opérer la transformation du nectar. Il en reste suffisamment pour qu'en présence d'un peu d'eau une nouvelle réaction chimique s'enclenche : le sucre se décompose en eau oxygénée et en acide glucolique. On connaît le pouvoir antiseptique de la première, tandis que l'acidité entrave également le développement des microbes. Quant au pouvoir cicatrisant proprement dit, il provient à la fois du sucre qui, par osmose, assèche la plaie et d'une ribambelle de composés organiques favorisant l'émission de cytokine et d'interleukine prociatrisantes. (**Lewino, 2009**).

Le miel peut être appliqué sur de plaies infectées qu'il stérilise rapidement sans les effets secondaires des antibiotiques locaux comme il réduit la douleur probablement par réduction du processus inflammatoire local (**Magalon et Vanwijck, 2003**).

#### • Propriétés anti-inflammatoires

Le miel est très visqueux capable ainsi d'absorber l'eau entourant les tissus en inflammation (**Ali, 1989**).

Les flavonoïdes altèrent la synthèse des éicosanoïdes (médiators de l'inflammation).

Ils diminuent le rapport leucotriène/prostacyline en modifiant l'activité lipoygénasique. Le trans-resvératrol montre des effets similaires (**Collin et Crouzet, 2011**).

Le miel est également un très bon anti-inflammatoire, il peut remplacer la prednisolone dans le cas de colites. Il combat également les inflammations intestinales en limitant l'émission de radicaux libres à partir de ces zones lésées (**Bilsel, 2002**).

De nombreuses études semblent indiquer les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**Gonzalez-Gallego et al, 2007**)

### I.9. Production du miel dans le monde

Selon les estimations présentées au group consultatif d'européenne sur l'apiculture, le 26 février, la production mondiale de miel a atteint 1,6 million de tonnes en 2011 (+5% par rapport à 2010).

Le premier producteur mondial est la chine (446.000 t), suivie par la Turquie (94000 t), l'Ukraine (70.000 t) et les Etat- Unis (67.000 t).

L'UE à 27 a produit (217.000 t) en 2011, Les principaux producteurs étant l'Espagne (34.000 t), L'Allemagne (26.000 t), la Roumanie (24.000 t), la Hongrie (20.000 t) et la France (16.000 t).

Les exportations mondiales proviennent de deux régions en particulier. L'Asie (32%) et l'Amérique du sud (30%). L'UE exporte 27,7% de sa production et importe 36% de sa consommation de miel en provenance principalement de Chine, d'Argentine et du Mexique.

### **I.9.1. Le miel en algérie**

L'activité apicole, selon le **Ministère De L'agriculture et Développement Rural (2012)**, est intimement dépendante des ressources mellifères dont dispose le pays et qui sont très riches et variées. L'apiculture est prés- dominante dans les régions suivantes :

**Zone de littoral** : miel d'agrumes et eucalyptus ;

**Zone de plateaux** : **kabylie** ; le miel de toutes fleurs, lavande, carouste sauvage et bruyère ;

**Hauts plateaux** : miel de sainfoin, romarin et jujubier ;

**Maquis et forêts** : miel toutes fleurs et miellat.

### **I.9.2.La production national en miel**

La production nationale en miel est estimée en moyenne à 33.000 qx pour l'année 2011 avec un rendement de 4 à 8kg/ruche, ce qui est très faible par rapport aux potentialités mellifères qu'offre notre pays.

En 2011 l'Algérie a introduit plus de 150.000t de miel de chine, d'inde et d'Arabie saoudite.

Tableau N° 7 : La production nationale en miel.

Année	Quantité (qx)	Rendement Kg/ruche	Taux de consommation	Prix Da/kg
2005/2006	25 430	4 à 6	90 g/habitant /an	1200-2000
2007/2008	30 000			
2009/2010	40 610	4 à 8		2000-3000
2011	33 000			

Source : Ministère de l'Agriculture et développement rural (2012).

### I.9.3. Les limites de la production et la commercialisation du miel Algérien

Plusieurs facteurs expliquent cette limitation, tels que :

- L'absence de législation régissant l'activité apicole algérienne ;
- La cherté et parfois l'absence des médicaments vétérinaires utilisés pour les abeilles.
- L'utilisation non réglementaire et anarchique des pesticides par les agricultures dans les

Régions où l'apiculture est très répandue ;

- La perte de la flore mellifère (incendies, construction dans les zones agricole..) ajoutée aux conditions climatiques défavorables et instables (la sécheresse...)
- La transhumance non pratiquée ;
- Le problème de circuit de commercialisation pour le miel ;
- La concurrence rude des miels importés.

### I.10. La récolte du miel

La technique de récolte décrite ci- après est celle utilisée par la plupart des apiculteurs amateurs. **Piel-Desruisseaux J1965**, décrit avec précision les différentes étapes ainsi que les moyens (outils, machines et locaux) et méthodes de travail les plus efficaces en tenant compte du personnel disponible.

**• Pose des hausses**

La récolte de miel se prépare dès la pose des premières hausses. Lorsque la colonie est suffisamment développée (ruche occupée par 7 ou 8 cadre de couvain), l'apiculteur dépose une hausse sur le corps de la ruche. Le moment de la pose des hausses est important et dépend de la situation géographique, du climat et de l'environnement botanique.

Une pose prématurée risque d'entraîner une mortalité larvaire préjudiciable au développement de la colonie ou une ponte de la reine dans cette hausse et non plus dans le corps de ruche.

Une pose tardive favorise l'essimage par manque de place dans la ruche. Il est possible d'empiler plusieurs hausses en s'assurant que la structure corps-hausse soit stable. (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).

**• Sélection es cadres de miel à récolter**

Lors de la récolte, il est important de ne sélectionner que les cadres parfaitement operculés. Un tri parmi les cadres est effectué régulièrement au cours de la saison apicole afin de disposer les cadres operculés dans les hausses situés en haut de la ruche, et les cadres les plus vides dans la hausse la plus proche du corps de ruche afin de faciliter son remplissage (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).

**• Mise en place d'un chasse-abeilles**

Deux jours avant la récolte, il est conseillé de placer un chasse-abeilles entre le corps et les hausses à récolter afin de limiter le nombre d'abeilles présentes dans les hausses. Les abeilles restantes seront balayées délicatement le jour de la récolte.

Pour des raisons de sécurité évidentes, il est en effet important de ramener à la miellerie le moins d'abeilles possible (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).

**• Transport**

Les hausses pleines de cadres de miel operculés doivent être transportées (figure 02) proprement, et solidement arrimées jusqu'à la miellerie et pendant le déchargement (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).

**• Centrifugation**

Une fois libérés de leurs opercules, les cadres dans la centrifugeuse, en les répartissant de manière équilibrée selon leur poids. La rotation s'effectue ensuite de manière progressive jusqu'à ce que tout le miel contenu dans les alvéoles soit projeté



**FigureN° 01** : Transport des hausses en brouette jusqu'à la miellarie.

#### • Désoperculassions

Avant d'extraire le miel d'un cadre, il est indispensable de retirer la fine pellicule de cire qui obstrue les alvéoles remplies de miel grâce à un couteau ou une griffe à désoperculer en acier inoxydable (figure 03).

Les déchets de cire obtenus sont mis de côté dans un bac spécial afin de permettre la récupération de la cire (pour en faire des bougies par exemple) et du miel qu'elle emporte avec elle (pour l'utiliser comme nourriture pour les abeilles)(**Piel-Deruisseaux J, 1965**).



**Figure N°02** :Désoperculation



**FigureN° 03** : Centrifugation

#### • Centrifugation

Une fois libérés de leurs opercules, les cares sont placés ans la centrifugeuse, en les répartissant de manière équilibrée selon leur poids. La rotation s'effectue ensuite de manière progressive jusqu'à ce que tout le miel contenu dans les alvéoles soit projeté contre les parois (figure 04). Le miel glisse le long des parois, s'accumule au fond de l'extracteur et est récupéré par l'apiculteur après ouvertures de la vanne (figure 05) (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).

**• Filtration**

Le miel est ensuite récupéré et transvasé dans le maturateur muni de filtres de diamètres décroissants (figure 04 et 05). En effet, à la fin de l'extraction, le miel contient de nombreux débris et impuretés, en particulier de cire ou de pollen, qu'il est nécessaire d'éliminer.

**FigureN° 04** : A la sortie de l'extracteur**FigureN°05** : Filtration**FigureN°06** : Les trois filtres nécessaires à la filtration de miel.**• Maturation et Ecumage**

Le miel est laissé au repos pendant trois à quatre jours à une température de 20<sup>0</sup>c dans un maturateur hermétiquement fermé afin que l'ensemble des impuretés remonte à la surface et constitue une écume qui sera retirée (figures 08 et 09)(Piel-Deruisseaux J, 1965).

**• Conditionnement**

Après ouverture du couvercle du maturateur puis de la vanne située en partie déclinée, les pots (dont les modèles seront décrits plus loin) sont remplis un à un et fermés immédiatement (figure 10) (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).

**• Etiquetage**

Tous les pots de miel destinés à la vente se verront préciser leur poids et leur origine florale selon les règles d'étiquetage que nous étudierons plus l'oins (**Piel-Deruisseaux J, 1965**).



**Figure N°07** :Maturateur équipé de filtres



**Figure N°08** :Intérieur du maturateur après 3 jours de repos



**Figure N°09** : Mise en pot

**I.11. Les facteurs d'altération de miel**

Comme tout produit d'origine ou végétale, le miel dans sa complexité est susceptible de subir des altérations qui lui feront perdre une partie de ses qualités alimentaires et gustatives. Les facteurs pouvant provoqués une altération du miel sont nombreux (**P.Polus, 2007**).

### • La Température

La température qui convient à la fermentation du miel est voisine de 16<sup>0</sup>C (P.Polus, 2007). en dessous de 10<sup>0</sup>C et au dessus de 26<sup>0</sup>C, cette fermentation n'est pas possible. Ce qui fait que le traitement thermique du miel peut accélérer certaines réactions chimiques.

Susceptibles d'altérer sa qualité au cours de l'entreposage (Ramirezal, 2000). Quelque étude a montré que la température est le principal élément qui doit être contrôlé pour avoir un miel de bonne qualité winkler cité par (Ramirez et al, 2000). Mais le comportement des miels durant l'entreposage diffère selon le type de miel (Ramirez et al, 2000).

Il est connu que la chaleur de la lumière altèrent le glucose oxydase et diminuent ainsi la production d'eau oxygénée" (Bogdanov et Blumer, 2001), et il ajoute que " la température au cours de l'entreposage a une influence importante sur l'activité enzymatique qui diminue en fonction de la durée d'entreposage et, de la teneur en HMF qui elle, augmente.

### • La lumière

La lumière réduit les propriétés antibiotiques du miel, les indices de peroxyde de miel de fleurs en particulier sont fortement réduits lors du stockage à la lumière, ils ne diminuent que de moitié à l'obscurité. Les inhibines non peroxydes ne s'altèrent que légèrement en raison de la lumière et d'un long stockage (Bogdanov et Blumer, 2001).

### • La fermentation

P. Polus (2007) souligne qu'un miel parfaitement mûr et dont la teneur en eau ne dépasse pas 17% est un milieu dans lequel les micro-organismes capables de provoquer la fermentation du miel ne savent pas se développer, même les levures qui s'attaquent aux sucres. Toujours selon lui la fermentation du miel se produira donc lorsque la teneur en eau est élevée, lorsque la température est suffisante et lorsque le miel contient des germes de fermentation capables de s'y développer.

Seul les miels dont la teneur en eau est inférieure à 18% de bonne conservation (Gonnet, 1982 et Bogdanov, 1995) revoit ce chiffre l'germent à la hausse puisque selon lui la teneur en eau ne devrait pas dépasser 19g/100g de miel, étant donné que dans le cas contraire, il existe un risque de fermentation à la surface.

Si l'on se réfère à (Stephen, 1946) cet écart d'une unité n'est pas à prendre à la légère, en effet, selon cet auteur la teneur en levures augmente de cinq fois dans le cas d'un accroissement de la teneur en eau de 1g/100g ; en dessous d'une teneur de 17g/100g le risque de fermentation est très faible.

Vu ces propriétés très hygroscopiques, le miel absorbe l'humidité de l'air quand celle-ci est très élevée d'où la nécessité de la conserver dans des récipients étanches (Bogdanov, 1999).

**P. Polus, 2007** dits qu'en effet on a constaté qu'une mauvaise cristallisation du miel est favorable à sa fermentation.

**Tableau N°08** : Influence de la richesse en levures sur la fermentation des miels (**Chauvin, 1968**).

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

#### • Le vieillissement

**p. polus, 2007** affirme que même dans les conditions normales de conservation, un miel vieillit mais sans bonifier. Ce vieillissement est principalement dû à l'action des enzymes et aussi à des modifications chimiques lentes.

Avec le temps les miels brunissent, ils perdent du glucose et du lévulose mais augmentent en maltose et en saccharose. On constate aussi une augmentation en H.M.F. et de l'acidité en générale. On constate également une disparition des arômes, tandis que la granulation augmente par fusion de plusieurs petits cristaux en un seul forcément plus gros. Le vieillissement du miel le rapproche donc d'un sucre ordinaire et lui enlève ces qualités commerciales. A ce point de vue un miel ne doit pas dépasser un an.

#### I.12. Stockage et conditionnement

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

### II.1.Définition

La propolis est un ensemble de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistances visqueuses (**Magan et Sulimanovic, 1982**), recueillit sur certain parties (bourgeons et écorces essentiellement) de végétaux (certains arbres principalement) par les abeilles (**Crane E, 1997**).

Les abeilles utilisent la propolis dans la construction et la réparation de leur urticaire pour les ouvertures et les fissures d'étanchéité et d'aplanir le marché intérieur murs et comme une barrière protectrice contre les envahisseurs extérieurs comme les serpents, lézard, ....etc. ou menaces contre les intempéries comme le vent et la pluie (**bankova v, 2000**).

### II.2.Etymologie du mot propolis

L'origine du mot propolis est associée au grec *pro* qui signifie « devant, en avant de », et polis, « la cité », ce qui que ce produit naturel est utilisé pour la défense de la ruche (**Bogdanov S, 2010**).



**Figure N°10** : l'aspect de la propolis (**Bogdanov S, 2010**).

### II.3.Histoire

Depuis la plus haute antiquité, l'homme s'est intéressé aux abeilles et à ses produits : le miel, le pollen, la cire, la gelée royale et la propolis. Cette dernière est considérée dans l'herboristerie traditionnelle comme un remède utile pour combattre les infections de toutes sorte (**Cardile et al ., 2003 ;Castolda et Cappaso,2002 ;Hikmet et Mercan, 2006**).

Elle était également connue des grecs anciens puisque Aristote la présentait, dans son histoire des animaux, comme un « remède aux affections de la peau, plaies et suppuration ».

Depuis 6000 ans elle est utilisée par les prêtres égyptiens pour la momification des cadavres en induisant avec de la propolis les bandelettes des momies, pour leur assurer une meilleure conservation, et pour soigner et anesthésier les caries dentaires (**Alexander, 1984**).

A Rome, Chaque légionnaire Romain en possédait une petite quantité sur lui en moment des campagnes militaire (**Donadiou, 1981**) et elle se vendait plus cher que le miel.

Au XI<sup>e</sup> siècle, la propolis était recommandée pour cicatriser les blessures de flèches (médecin Iranien Avicenne). Les plaquettes du Moyen-âge européen décrivent les préparations médicales à base de la propolis pour les traitements des maladies de la bouche et de respiration (**Bankova V et al ., 2000**).

En Europe, on trouve quelques traces de son usage, dans le traitement des plaies aux 18 et 19<sup>ème</sup> siècle (**Dobrowolski et al, 1991**).

Elle connut un regain de popularité au XIX<sup>e</sup> siècle lorsque les médecins de l'armée anglaise l'employèrent pour désinfecter les blessures et faciliter leur cicatrisation durant la Guerre des Boers en Afrique du sud (**Wollenweber E et al ., 1990**).

## **II.4.Utilisation de la propolis**

### **• Utilisation de la propolis par les abeilles**

A l'intérieur de la ruche, elle est utilisée par l'abeille comme un mastic, un ciment ou un baume pour (**Jean- Proste et Yeves, 2005**).

\_ Assurer une meilleure isolation thermique.

\_ Obtenir les fissures.

\_ Réduire l'ouverture de trou de vol dans les régions à climat froid.

\_ Recouvrir les corps étrangers (souris, cétoines, frelons, ...etc.) qu'elles ne peuvent pas évacuer.

\_ Réparer les rayons et renforcer les minces parois des alvéoles en l'incorporation à la cire que l'abeille sécrète ;

\_ Stériliser les alvéoles avant la ponte.



**FigureN°11** : Les abeilles réduisent le trou de vol avec de la propolis (**Krell, 1996**).

- **Utilisation de la propolis par l'homme**

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

#### **Cosmétique**

La propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et la cosmétique (**Lejeune B et al. 1986**). Ses effets sur la régénération et la rénovation des tissus ont été bien étudiés. Avec ses caractéristiques bactéricides fongicides, elle offre de nombreux bénéfices dans diverses applications (**R. Krell., 1996**).

#### **Médecines**

La propolis, grâce à son large spectre d'action (Le bien être de la bouche (**Bruschi et al., 2006**) (**Park et al., 1998**), L'ensemble de la sphère interne (**Khayyal et al., 2003**) (**Nostro et al., 2003**) (**Fuliang et al., 2005**), Stress oxydant (**Favier, 1997**), Les soins dermatologiques (**Lejeune et al., 1998**) et l'hygiène de la peau(**Krell, 1996**). Elle est utilisée dans divers traitements tels que :

- Les problèmes cardio- vasculaire ;
- Appareil respiratoire (pour diverses infections) ;
- Soins dentaire ;
- Les ulcères ;

- Les infections des muqueuses et les lésions ;
- Le cancer ;

Elle est utilisée aussi dans le soutien et l'amélioration du système immunitaire (**Neumann D et al, 1986**).

- **Usage vétérinaire**

En URSS sous l'égide de l'institut de recherche vétérinaire et médicale KAZAN, les laboratoires effectuent des recherches sur l'emploi de la propolis dans le but de renforcer l'immunité des animaux aux épidémies et parasites. Les résultats en 1965 démontrent que la propolis accroît le mécanisme de défense, provoque la formation d'anticorps, accroît la phagocytose, contribue à l'augmentation des protéines du sang en favorisant leur régénération.

- **Technologie alimentaire**

Les activités anti-oxydantes, antifongique et antibactériennes de la propolis lui offre une place de choix dans ce domaine. Généralement bénéfique sur la santé humaine (**Krell, 1996**).

La propolis peut être utilisée comme préservatifs en matériel d'emballage de nourriture (**Mizuno et al. 1987**). Elle est aussi utilisée pour la prolongation de la vie d'entreposage en congélation des poissons (**Donadieu, 1981**).

## **II.5. Récolte de la propolis par les abeilles**

La récolte de la propolis est faite par un nombre relativement restreint d'abeilles ouvrières butineuses spécialisées dans cette activité (**Lavis, 1975**).

Cette récolte, dépend de nombreux facteurs dont les plus importants sont comme suit :

- **Saisonnier**

Elle a lieu en début de saison au printemps, mais le plus souvent à l'approche de l'automne au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage. Il faut cependant que les journées soient encore chaudes, et c'est au moment où le soleil est le plus chaud que les abeilles l'exploitent le plus car la propolis est alors tendre et malléable (**Flageul, 1991**).

### • Climatique

Les abeilles « récolteuses » de propolis dé ploient en général leur activité au cours des journées chaudes (température le plus souvent supérieure à 20°C) (**Brunet, 2006**).

La butineuse attaque d'abord les substances résineuses ou gommeuses avec ses mandibules, puis étire la particule saisie jusqu'à la rompre, et elle constitue progressivement une petite pelote de propolis (plus petite que celle de pollen, ce qui est normal puisque le pollen est plus léger à volume égal) logée dans ses pattes postérieures (3<sup>ème</sup> paire) qu'elle ramène à la ruche où des abeilles magasinères vont la stocker ou l'utiliser immédiatement s'il y a nécessité de le faire (**Ducerf, 2006**).

## II.6. La récolte de la propolis par l'apiculteur

L'apiculteur utilise diverse technique pour récolter la propolis pour obtenir une propolis relativement propre :

### II.6.1. Le classique : grattage des cadres ou des parois de la ruche

De préférence par temps froid où la propolis dure et friable se détache mieux.

Ce procédé a pour inconvénient de fournir une propolis souillée de nombreuses impuretés qu'il faut éliminer par la suite (**Domerego, et al. , 2007**).



**FigureN<sup>0</sup> 12:** Grattage de la propolis par l'apiculteur

### II.6.2 Le système de grille

La mise en place de différents dispositifs (notamment celle d'une grille moulée en matière plastique souple ou en acier inoxydable posée au dessus des rayons de la ruche, dont les abeilles s'empresent d'obturer les orifices avec de la propolis) qui permettent une récolte

facile de propolis pauvre en cire et en impuretés, donc de bien meilleure qualité (Mustsaer et al, 2005).

Grace à ce système, parfaitement maitrisé par les apiculteurs professionnels spécialisés dans la production de propolis, il en est recueilli ainsi environ 300 grammes par ruche et par an (Domergo et al, 2007)



**FigureN°13** : une grille plastique de détection varroa (Domergo et aL, 2007)

### II.6.3.L'extraction de la propolis :

Pour une production artisanale à usage personnel on peut utiliser l'une des 2 méthodes suivantes de purification :

La méthode la plus rapide consiste à faire chauffer doucement la propolis dans de l'eau.

Aux environs de 65°C la cire va commencer à fondre et étant d'une densité plus faible que l'eau elle va monter en surface accompagnée de pas mal d'impuretés. Il est alors facile de faire la séparation. L'inconvénient du chauffage est une altération de certaines propriétés chimique de la propolis (Bozcuk et L Mez, 2003).

L'autre méthode consiste à faire macérer la propolis pilée dans l'éthanol (alcool éthylique) titré à 70° ou 80° (pas plus) .On fait macérer 1 volume de propolis dans 3 volumes d'alcool pendant deux semaines en remuant très régulièrement , le tout à l'abri de la lumière . Après ce délai on filtre et on ne garde que la partie liquide. Le problème de cette méthode, en dehors de sa lenteur, est que la cire est aussi en partie dissoute dans l'alcool. De plus, la teinture mère obtenue le gout et l'odeur de l'alcool, ce qui n'est pas adapté à tous les usages (Broudiscou et al, 1997).

#### **II.6.4. Conservation**

La propolis se conserve assez facilement dans de bonnes conditions impérieuses spéciales pour la plupart de ses présentations, mais il paraît 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 : l'onguent par exemple) (**Caillas, 1947**).

Certaines expériences ont montré par ailleurs que le stockage de longue durée de la propolis ne semble pas diminuer sa teneur en composants chimiques, ni son activité antibactérienne, nous pensons malgré tout, que pour en obtenir les meilleurs effets et résultats possibles, il vaut toujours mieux l'utiliser, chaque fois que faire se peut, la plus fraîche qui soit (**Donadieu, 1981**).

#### **II.7. Les différents types de propolis**

Il existe plusieurs types de propolis qui sont fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone géographique, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille tout cela explique que l'on va trouver des propolis de couleur jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés qualifiées de vertes ou de rouges.

L'abeille va aller chercher sa résine dans son écosystème et c'est bien de cet écosystème qui va dépendre la composition de la propolis (**Burdock GA, 1998**).

**Tableau N°09** : les types de propolis les plus rependus avec leurs principales familles de composés polyphénolique

Type de propolis	Origine géographique	Origine botanique	Principaux constituants	References
Ambrée à brune	Europe, Amérique du nord, régions non tropicales de l'Asie, Nouvelle-zélande	Populus spp et principalement p.nigra L.	Flavones Flavanones Acides phénols et ses esters et sesquiterpènes	Bankova et al., 1992 Bankova et al., 1991. Greenaway, 1990.
Verte du Brésil	Zone tropicale du Brésil	Baccharis spp. Principalement B. dracunculifolia DC	Dérivés prénylés de l'acide coumarique. Acides diterpéniques Lignanes	Park Yk et al., 2002
Bouleau	Nord de la Russie	Butula, verrucosa	Flavone, flavonol, flavanones et sesquiterpènes	Bankova et al., 1992
Propolis rouge	Cuba Brésil Mexique	Dalbergia Ecastophillum	Isoflavones, isoflavanes, flavonoides et benzophenones Isoprenylées	Tomas- Barberan et al., 2008.
Propolis rouge	Cuba Venezuela	Clusia rosia	Isoflavones, isoflavanes, flavonoides et benzophenones Isoprenylées	Tomas- Barberan et al., 2008.
Méditerranéenne	Sicile, Grèce, Malte, Crète, Turquie	Famille des cupressaceae	Acides diterpéniques et principalement de type labdane	Popova Met al., 2011.
Pacifique	Zone Pacifique, Taïwan (Okinawa, Indonésie)	Mascaranga Tanarius	Prényl-flavanones	Bankova et al., 1992

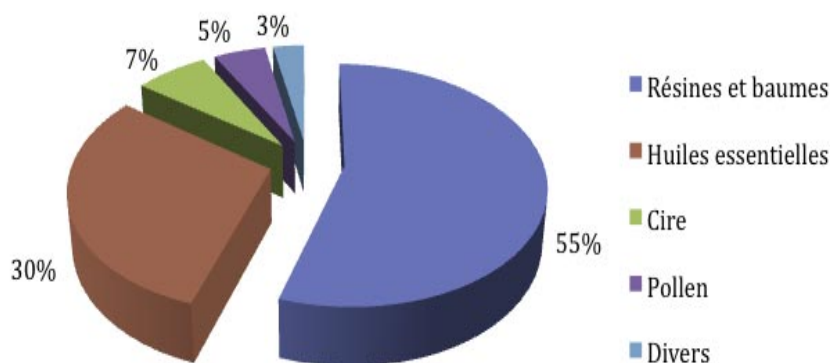
## II.8.Composition chimique

La composition chimique de la propolis recueillie dans la ruche est variable selon la source végétale visitée par les abeilles. De nombreuses substances qui s’y retrouvent de façon constante et relativement stable, constante vérifiée et confirmée par des travaux d’analyse chromatographique affectés sur de nombreux échantillon (**Boyanova et al, 2005**).

De manière générale, la propolis que l’on trouve dans la ruche est composée de :(**Ducerf, 2006**).

**Tableau N°10** : Composition analytique de la propolis

Composition en ordre	Composition par groupes	Références
Résines	<b><u>45-55%</u></b> Flavonoïdes, acides phénoliques et leurs esters	(Bancova et al., 1987 ; Nagy.,1989 ; Omar., 1989).
Cire et acides gras	<b><u>20- 30%</u></b> La cire d’abeilles et des plantes	(Papay., 1987).
Huiles essentielles	<b><u>10%</u></b> Produits volatiles	Tosi et al., 2006).
Pollen	<b><u>5%</u></b> Protéines (6 acides aminés libres $\geq 1\%$ ) arginine et proline jusqu’à 46% du totale	(Gabrys. , 1986).
Autres composés et minéraux	<b><u>5%</u></b> 14 traces de minéraux, silice, fer et zinc sont les plus communs. Il ya aussi : Au, Ag, Cs, Hg, La, Sb ; Acide benzoïque et ses esters, vitamines, sucres, Cétone, Lactones,...etc	(Bankova et al., 1987 ;Cuellar and Hernandez., 1987).



**Figure N°14** : composition de la propolis (Boyanova et al., 2005).

La propolis purifiées, pour ne garder que les éléments actifs, est composée de flavonoïdes, de composés phénoliques, d'acides aromatiques, d'acides organiques, de terpènes, d'huiles essentielles, de vitamines et d'oligo-éléments (Vassya S et al, 2000).

### II.8.1. Les composés phénoliques et les acides aromatiques

#### II.8.1.1. Phénoliques

Molécules organiques comprenant un noyau aromatique (benzène) et au moins un groupement alcool (OH) (Marcucci M, 1995).

#### II.8.1.2. Les acides organiques

La propolis est également composée d'acides organiques qui ont des propriétés conservatrices, antiseptiques, anti- inflammatoires et anti- coagulants (Bozcuk et Lmez, 2003).

#### II.8.1.3. Les Terpènes

Hydrocarbure présent dans les essences naturelles d'origines végétales, dont la molécule comprend x séquences de 5 atomes de carbone et de 8 atomes d'hydrogène.

#### II.8.1.4. Les huiles essentielles

La propolis contient plusieurs huiles essentielles qui sont antiseptiques et aromatisantes par exemples le guianol, l'anéthol et le pinène (Bozcuk et Lmez, 2003).

### II.8.1.5. Les vitamines et les oligo-éléments

Une vitamine est une substance organique nécessaire (en dose allant du microgramme à plusieurs milligrammes par jour) au métabolisme des organismes animaux et donc de l'homme. Les vitamines sont des indispensables compléments des échanges vitaux.

Les oligo-éléments sont une classe de nutriments éléments minéraux purs nécessaires à la vie d'un organisme, mais en quantité très faibles. On appelle oligo-éléments les éléments chimiques qui représentent une inférieure à 1mg/kg (**Bankova et al, 1987**).

### II.8. 1.6.Les flavonoïdes

#### \*Définition

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent de fortes propriétés antioxydants. Elles sont responsables de la couleur des aliments. Les flavonoïdes améliorent la fonction de la vitamine C et protègent de l'oxydation. On les trouve dans une grande variété de fruits et de légumes et ils ont des effets bénéfiques pour le cœur, les artères, le foie, le système immunitaire, le tissu musculaire et le système nerveux (**Allerget et Bouloc, 2006**).

#### \*Structure chimique

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques  $C_6$  reliés par une chaîne en  $C_3$ . Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone (**Allerget et Bouloc, 2006**).

#### \* Les flavones

- **Aglycones** : lutéolol : dans le thym, la sauge officinale, apigénol dans la bière, la ciboule, la marjolaine,
- **Hétérosides** : lutéolol 7-O-glucide, dans les feuilles et les graines de céleri
- **Dérivés méthoxylés** : tangéretine, nobilétine, dans le jus d'orange ;

#### \* Les flavonols

Réputés être les antioxydants les plus efficaces des flavonoïdes, très nombreux

- **Les aglycones** : environ 380, kaempférol, dans les capres, quercétol, myricétol dans la bière ;

- **Hétérosides** : nombreux dans les produits alimentaires comme le kaempférol 3-O-glucoside dans les framboises, les haricots communs.
- **Les dérivés méthoxylés** : rhamnétine.

**\* Les dihydroflavonols ou flavanonol**

Sans double liaison entre C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> par rapport au précédent

- **Aglycones** : dihydroquercétol dans l'origan américain *lippia graveolens*
- **Hétérosides** : dihydroquercétol 3-O-rhamoside, dans le vin

**\* Les flavanones**

Dérivés aussi 2,3-dihydrogènes

- **Aglycones** : surtout présents dans les agrumes : ériodictyol dans la marjolaine ; naringétole ;
- **Hétérosides** : naringine, le pomelo
- **Les dérivés méthoxylés** : homoeriodictyol dans *l'Herba Santa*

**\* Les aurones**

2- benzylidène- coumaranones, hispidol, Aureusidin

**\* Les chalcones**

Au cycle pyranique ouvert

- **Aglycones** : butéine, dans les fèves. Des hétérosides, des dérivés méthoxylés ; xanthohumol dans le houblon et la bière.

**\* Les dihydrochalcones :**

- **Aglycones** : phlorétine dans les feuilles de pommier
- **Hétérosides** : phloretin 2'-O- xylosyl-glucoside dans les naringines dihydrochalcone à la saveur sucrée intense ; néohespéridine dihydrochalcone édulcorant.

## **II.9. Description et caractéristiques de la propolis**

La couleur de la propolis est très variable selon ses origines végétales et la période de la récolte. Elle peut varier du jaune clair au brun très foncé presque noir en passant par toutes les nuances de brun plus ou moins rougeâtre ou verdâtre (**Ducerf, 2006**).

La consistance est elle aussi très variable en fonction de la température. Elle est friable en dessous de 15 degré et devient très molle et malléable autour de 30 degré. Au dessus elle est collante et fond vers 60 à 70 degrés. Fondue au bain marie une partie visqueuse se dépose tandis que qui surnage une partie cireuse (liquide). Elle peut être utilisée en apiculture pour fabriquer un attirail essaim (**Ducerf, 2006**).

La saveur de la propolis est souvent plutôt acre voire amère. En aucun cas c'est un produit agréable au goût. Quant à son odeur elle est plutôt agréable surtout lorsqu'elle est chauffée du fait des résines aromatique qu'elle contient.

La composition de la propolis est très variable et très complexe du fait de ses origines végétales et l'évocation des divers acides, aldéhydes coumarine et flavonoïdes suffit à faire apparaître la complexité de ce produit. Il n'y a donc pas une mais, de multiples propolis (**Donadieu, 1987**).

La propolis est insoluble dans l'eau mais elle est soluble partiellement dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, etc., et seul un mélange adéquat de différents solvant permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (**Donadieu, 1987**).

La structure microscopique de la Propolis est maintenant assez bien connue grâce à un récent et important travail de Colette JEANSON et Philippe MARCHENAY, réalisé au microscope électronique à balayage, et portant sur des échantillons en provenance de la France entière. Leurs résultats montrent que l'on retrouve toujours les mêmes microstructures, et en nombre très limité, pour des propolis d'origines fort différentes, ce qui tendrait à prouver, d'après ces autres, le rôle très important des abeilles ouvrières dans la formation de la structure de cette substance (**Donadieu, 1987**).

## **II.10. Effet thérapeutique de la propolis**

Les substances naturels issus d'abeilles ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, cosmétologie et en pharmacie (**Small Field, 2001**).

Un intérêt progressif dans l'utilisation de la propolis dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement. La propolis est reconnue pour nombreuses activités biologiques : anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti-oxydantes et antibactérienne.

Ces activités sont attribuées en partie à la présence des flavonoïdes et les phénols (**Ary et al, 2005**).

### **II.10.1. Les propriétés pharmacologiques de la propolis**

#### **II.10.1.1. Propriété anti- infectieuse**

Elle active les fibrocytes et inhibe l'histaminosécrétion des mastocytes (**Ghedira et al, 2009**).

##### **\_ Activité antibactérienne**

La propolis est bactéricide efficace pour les germes : *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Escherichia faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria innocua*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, et enfin *Pseudomonas aeruginosa* (**Silici et al. 2007 ; Vardar-Unlu et al .2008 ; Silici et Kutulka, 2005 ; Li-Chang Lu et al. 2005 ; Uzel et Sorkun, 2005**).

##### **\_ Activité antifongique**

La propolis a des effets antimycosiques, contre les germes appartenant au genre *Candida* et contre les levures (**Ghedira et al. 2009**).

##### **\_ Activité antivirale**

La propolis est également antiherpétique (**Ghedira et al. 2009**).

##### **\_ Activité antimicrobienne**

La propolis est dite « antibiotique naturel » grâce à ses effets bactéricides et bactériostatiques sur de nombreuses souches microbiennes (**Boyanova et al, 2005**).

Notamment certains *Staphylocoques*, *Streptocoque*, *Salmonelles*, *Bacillus*, *Proteus*, et *Escherichia coli*.

En outre, elle exerce aussi une activité antifongique sur certaines espèces de champignons pathogènes particulièrement *Candida albicans* (**Krou et al, 2007**).

L'activité antimicrobienne de la propolis est due à la présence des substances flavonoïdes dans le 3, 5,7 trihydroxyflavone constitue la active (**Chauvin, 1968**).

La propolis joue également un rôle majeur dans le taux relativement faible de contamination bactérienne dans la ruche ou d'autre cavités habitée par les abeilles (**Ernst et al ., 2005**).

Et permet aussi de protéger leur larve contre les bactéries, virus et champignons (**Cohen et al ., 2004**).

### II.10.1.2. Propriété anti- oxydante de la propolis

Les radicaux libres sont des molécules dont la structure a été modifié suite à une agression physiologique ou environnementale, elles contiennent un électron libre très réactif qui se lie à l'oxygène cette oxydation endommage les cellules et les molécules d'ADN et provoque en conséquent plusieurs pathologies comme le cas de maladies cardiovasculaire, du cancer et du diabète.

L'organisme se protège avec les enzymes antioxydants mais la production radicalaire devient rapidement plus forte que l'élimination dès 25 à30 ans, il est conseillé de supplée à ce manque par une alimentation appropriée et /ou des compléments alimentaires (**Rasir, 2006**).

La propolis a un pouvoir antioxydant, du à sa concentration élevé en flavonoïdes, qui sont capable de détruite les radicaux libre en protégeant les lipides et autres substances comme la vitamine C5, et alors permet de prévenir des maladies cardiovasculaires, de certains cancers, du diabète et d'autre trouble liés au vieillissement (**Ary et al, 2005**).

### II.10.1.3. Propriétés anti-inflammatoires

L'inflammation est de loin le type de réponse le plus connu que le corps emploie comme mécanisme de défense à l'encontre de son environnement agressif.

La réponse inflammatoire est un processus transitoire, sa résolution est assuré par des mécanismes de contre régulation, impliquant la synthèse d'hormone anti-inflammatoires (glucocorticoïdes, catécholamines) celle de médiateurs locaux (cytokines, neuropeptides) et l'accumulation de facteurs intracellulaires de régulation négative (**Kreamer et al ., 2003**).

Certains travaux de recherche portant sur l'action anti-inflammatoire de la propolis. Parmi eux sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se

métabolise respectivement en prostaglandine et leucotriènes, induisant ainsi des phénomènes inflammatoires (Logerrot et al, 2003).

#### II.10.1.4. Propriétés anti- cicatrisantes et anesthésiques

La propolis est un anesthésique puissant, les études ont montré que cette résine est 3 fois plus anesthésique que la cocaïne et 52 fois plus puissante que la procaine dans les testes sur les cornées de lapin.

De plus son action anti cicatrisante a été vérifiée plusieurs fois pendant les guerres et très employée dans les hôpitaux russes.

Plus récemment, le pouvoir anti cicatrisant a été vérifié sur des blessures expérimentales chez le mouton, et d'après cette étude, l'application d'un extrait alcoolique de la propolis accélère le processus d'anti cicatrisant et de régulation tissulaire.

De se fait la propolis est aujourd'hui largement utilisé dans les cas d'escarre en cosmétologie et dans les produit destinés à lutter contre le vieillissement cellulaire. Cette activité serait en partie due à la présence d'acide aminé telles l'arginine et la proline, dont leur rôle est connu dans le processus de régénération de la peau avec l'âge et les conditions climatiques.

Les cellules cutanés se reproduisent moins ou elles sont trop sollicité, il s'ensuite une altération des tissus, puis une déshydratation et vieillissement de la peau.

En apportant outre, les acides, les vitamines et les oligo-éléments ainsi que les contributions à augmenté la perméabilité de ces tissus et par conséquent la propolis joue un rôle nutritif notable dans l'intégrité cutané (Logeront et al, 2003).

#### II.10.1.5. Propriété anticancéreuses

L'extrait de la propolis possède une activité anti cancéreuse, car elle capable de transformer (in vitro), les cellules humaines de l'hépatite et de carcinomes, et est capable de les inhiber (Matsueno, 1992).

Les substances de la propolis qui ont cet effet cytotoxique sont :

-**La quercitrine** : qui inhibe la croissance cellulaire en interrompant certaines phases du cycle cellulaire et bloquant les sites récepteurs des hormones (Larocca, 1994).

- **Les flavonoïdes** : permet d'inactiver le TPA (tissu-type plasmagène activator) ; une molécule de la matrice cellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire.

\_ **La clérodance dytherpénoïque** : a une particulière et sélective toxicité sur les cellules des tumeurs.

La propolis a également 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 cellules qui ont un effet sur les cultures cellulaires cancéreuses chez l'humain et l'animal, comme le carcinome, mélanome, le colon et les cellules de carcinomes des reins, sont l'acide caféique et le phényléster (**Grumberger et al, 1988**).

Il a été démontré aussi que l'Artepillin C, isolé de la propolis à un effet cytotoxique sur les cellules de carcinome gastrique et muqueux (in vitro).

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes à savoir, la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres.

En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène (**Scutt, 1987**), et inhibe l'activité du collagénase (**Makimura, 1993**).

#### **II.10.1.6. Propriété digestives**

Elle protège l'estomac contre des lésions induites par l'éthanol. L'extrait de la propolis protège la muqueuse gastrique du stress oxydatif.

L'ester phényléthylique du CAPE de la propolis atténue les symptômes de la colite induite par le peptidoglycane-polysaccharide bactérien en inhibent les NE-kappa B produites dans les macrophages, réduisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires. (**Ghedira et al., 2009**).

#### **II.10.1.7. Autres propriétés**

Beaucoup d'autres propriétés biologiques, y compris la régénération des tissus, l'activité hépatoprotective, action immunomodulatrice, etc. (**Marcucci, 1995**).

## **II.11. Caractéristiques physico- chimiques de la propolis**

### **\* Caractéristiques organoleptiques**

- **couleur** : la couleur est de jaune clair au brun très foncé, presque noire en passant par toutes les gammes des bruns (brun jaune, brun vert et brun rouge), sa variance selon l'origine.
- **Saveur** : Elle est souvent amère et acre.
- **Arome** : elle est agréable douceâtre, elle varie selon l'origine.

### **\* Consistance**

Selon la température ; elle est dure et friable à 15° C, molle et malléable à 30° C, et coulante et gluante entre 30 et 60°C (**Krell, 1996**).

### **\* Solubilité**

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

### **\* Densité**

Elle est de l'ordre 1,2 en moyenne.

### III.1 Généralités

Présents partout et depuis toujours, les biofilms sont un challenge pour les chercheurs. Décrits généralement, comme une communauté de microorganismes associée à une surface et entourée par des exopolysaccharides, interpénétrée par des canaux d'eau. Les étudier représente un double intérêt : Celui d'éradiquer les biofilms nuisibles, qui sont une menace pour la santé humaine, de par leur responsabilité dans les infections nosocomiales ainsi que certaines maladies respiratoires ; sans oublier le problème récurrent des industries agroalimentaires, de contamination de leurs machineries. L'autre intérêt réside dans les possibilités d'applications multiples dans l'alimentation, l'industrie navale, et même le revêtement des maisons.

### III.2.Définition

Les biofilms bactériens sont des communautés microbiennes complexes qui ont un effet significatif sur la santé humaine (**Shank's et al. ,2006**). Le plus souvent, on définit un biofilm bactérien comme un ensemble de micro colonies bactériennes adhérant à un substrat biologique ou inerte en agrégats entourés d'une matrice protectrice visqueuse (**Sadhana et Vijay ,2003 ; Agle ,2007 ; Jounne, 2008 ; Arwa et al, 2010**). Cette dernière est composée de polysaccharide et de protéines (**phillips, 2011**). Ainsi que de petites quantités de lipide et d'acides nucléiques (**jouenne, 2008**). Le biofilm peut se composé d'une seule espèce ou plusieurs espèces (**phillips et al, 2011 ; spyridon et al, 2009**).

Le biofilm est parcouru par une multitude de pores et canaux aqueux qui constituent un système circulatoire primaire, assurant ainsi l'acheminement des nutriments jusqu'aux bactéries et l'évacuation des produits de dégradation. Au sein des biofilms, des gradients très marqués apparaissent. Ces gradients d'oxygène, de substrats, de pH ou autre, conduisent au développement de communautés bactériennes (**jounne, 2008**).

Populations de microorganismes enchâssées dans une matrice polymétrique, sécrétée par les microorganismes eux-mêmes. Les biofilms peuvent se développer sur des surfaces inertes (comme les cathéters) aussi bien sur des tissus vivants (cavité buccale). Ces organismes présentent une résistance caractéristique qui serait due notamment à un métabolisme modifié, par le fait qu'ils se trouvent dans un biofilm, et à une variabilité phénotypique parmi les cellules (**Jouenne, 2008**).

### III.3. Etapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm se déroule en cinq grandes étapes résumées dans la figure 2 :

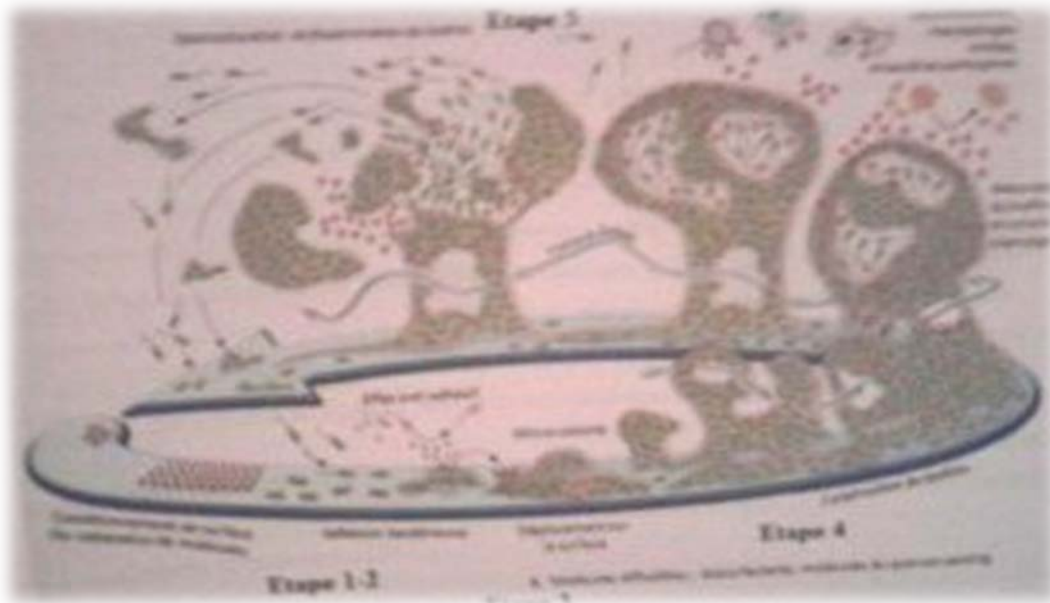
**-Etapes 1-2 :** des bactéries planctoniques isolées évoluant librement dans un milieu liquide se fixent sur une surface (adhésion réversible) et s'organisent en amas (**Jouenne, 2008**). Tout commence par une compétition entre les microorganismes disséminés dans un fluide qui vont chercher à adhérer en premier à une surface ; provenant le plus souvent de l'érosion ou la dissémination d'un biofilm voisin, ces cellules microbiennes en suspension vont subir la gravité, l'agitation brownienne, l'hyperhydrodynamisme des fluides, ce qui va favoriser leur contact avec les surfaces, par ailleurs certaines cellules sont capables d'avoir un mouvement actif autonome dans un liquide nageant à l'aide de longues structures protéiques en rotation : les flagelles (**Briandet et al., 2012**). Il est à signaler que lorsque la force ionique du milieu est élevée, l'adhésion est favorisée grâce aux forces de Vander Waals (**Branger et al., 2007**).

**-Etape 3 :** les bactéries s'ancrent de façon irréversible sur la surface via des appendices cellulaires et des exopolymères (**Jouenne, 2008**). Pour se faire les cellules vont employer des appendices tels les cils, les flagelles et même les curlis (**Pelmont, 2005**). Les cellules ainsi déposées sur une surface migrent les unes vers les autres en utilisant des filaments rétractiles « les pili de type IV », ce processus dépend des propriétés de surfaces mais aussi d'un changement d'expression génétique (**Pelmont, 2005**). Le but étant de sentir et quantifier ces congénères ; les bactéries sont en effet capables de sentir la présence des autres bactéries de même espèce : c'est la détection du quorum (Quorum Sensing). Chaque bactérie produit une petite molécule diffusible spécifique à son groupe, qu'elle est capable de détecter dans l'environnement. A partir d'un seuil critique de ces messagers (et donc une concentration seuil en bactéries), l'expression génétique dans cellule bactérienne s'en trouve bouleversé, ainsi chez *pseudomonas aeruginosa* par exemple, la détection d'une forte concentration d'une homosérine lactone, déclenche le passage d'un biofilm plat et sensible vers un biofilm extrêmement résistant et de structure plus complexe (**Briandet et al., 2012**).

**-Etape 4 :** le biofilm arrive à maturation, son volume augmente via multiplication cellulaire et une synthèse importante d'exopolymères ; le biofilm est traversé par des courants de liquides (nutriments, molécules signal...) (**Jouenne, 2008**).

**-Etape 5 :** en fin de maturation, un certain nombre de cellules retournent à l'état planctonique et peuvent former plus loin un nouveau biofilm ; ce détachement étant induit par une carence

nutritionnelles et des conditions environnementales défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène pour un biofilm épais, ou modification de la nature d'un nutriment (Jouenne, 2008).



FigureN° 15 : Etapes de formation d'un biofilm (Briandet et al ., 2012).

#### III.4.Expression génétique au sein du biofilm

La formation d'un biofilm par des bactéries est un style de vie qui implique l'expression différentielle de gènes, comparée au mode de vie planctonique (Beloin et Chigo, 2005).

Il y a une grande variété de gènes, impliqués dans ce changement phénotypique ; il n'existe pas un système génétique unique (standard) pour la formation de biofilms chez les bactéries, Cette variation permet au biofilm une grande stabilité face au stress externe (Nasr et al ., 2012 ;Lim et al., 2013).

Des gènes vont s'exprimer, d'autres vont être réprimés ; ces derniers sont soit fonctionnellement remplacés par d'autres gènes soit tout simplement bloqués, surtout pendant les premiers stades de la formation du biofilm (Beloin et Chigo, 2005).

- a) **La mobilité** : C'est la première fonction qui disparaît, les gènes codants pour la synthèse des composants flagellaires sont réprimés dès que la bactérie atteint une surface (Sauer, 2003).

- b) La synthèse d'adhésines :** Des adhésines de surface sont produits pour assurer la fixation de la bactérie sur son support ce qui implique l'activation de familles de gènes impliquées dans l'adhésion inter-bactéries au début de la structuration du biofilm **(Praat et Kolter, 1999)**.
- c) La synthèse des polysaccharides :** les gènes responsables de la production des polysaccharides de la matrice s'activent. La matrice riche est composée d'exopolysaccharides associés solidement les aux autres, comme les PIA/PNAG (polysaccharides intercellular adhesion/Poly-N- acetylglucosamine) polymères codés par les *ica* ABCD ; chez les bactéries Gram négatif. On retrouve aussi l'acide colanique (chez *Escherichia coli*), l'alginate, le glucose et le mannose (chez *Pseudomonas* ssp) **(Beloïn et Chigo, 2005)**.
- d) Le ralentissement métabolique :** Pendant cette phase beaucoup de gènes sont inactivés, les cellules du biofilm sont dites en hibernation **(Beloïn et Chigo, 2005)**.

Malgré que dans un biofilm on ne retrouve que des microorganismes unicellulaires, il présente une multifonctionnalité et diversité qui ressemble à celles d'un seul organisme pluricellulaire, **(Peter et al, 2011)**.

#### III.4.1. Rôle de la gangue polymère

Les EPS, de part leurs propriétés physico-chimiques, jouent le rôle de barrière filtrante, soit par interaction avec le composé, soit par piégeage. Le chlore, couramment utilisé comme désinfectant, pénètre faiblement dans un biofilm mixte de *klepsiella pneumoniae* et *p. aeruginosa*. Au sein de cette gangue existent aussi des microenvironnements correspondants à des zones carencées en nutriments, en oxygène ou présentant des valeurs locales de pH extrêmement basses. L'existence de ces zones peut expliquer l'inefficacité de certains antibiotiques comme les bêtalactamines ou les aminosides, efficaces respectivement sur les bactéries en croissance et cultivées en aérobiose **(Jouenne, 2008)**.

#### III.5. Organisation d'un biofilm

Le biofilm possède des structures en trois dimensions ; la plus étudiée est dite architecture « en champignon », visible dans la figure2, décrite depuis les années 90 et retrouvée chez *Pseudomonas aeruginosa* **(Jouenne, 2008)**.

D'une longueur de 30µm, ces biofilms peuvent croître sur leur support aussi bien de haut en bas que de bas en haut. Ils sont cohésifs et peuvent supporter les d'arrachement induites

par un flux modéré tel que le sang dans une veine. Cette architecture engendre une inégalité des cellules à accéder aux nutriments et à l'oxygène (**Briandet et al, 2012**).

### III.6. Résistance des biofilms aux agressions externes

Les propriétés physiques, chimiques, biologiques et phénologiques d'un biofilm lui confèrent une résistance exceptionnelle par rapport aux cellules planctoniques de la même espèce face aux métaux lourds, aux agents antibactériens ou chlore (**Jouenne, 2008**).

Les processus de résistance, regroupés dans la figure 3, sont multiples et dépendent étroitement du consortium microbien ainsi que du mécanisme d'action de l'agent antimicrobien appliqué (**Briandet et al, 2012**).

Au sein d'un biofilm, les cellules en surface ont une activité métabolique importante et sont donc en croissance exponentielle. Ce n'est pas le cas dans les strates profondes où les bactéries n'ayant pas suffisamment accès aux nutriments n'expriment aucune activité de synthèse protéique détectable ; on parle alors de métabolisme ralenti « Slow Growth » ; or les agents antibactériens sont plus actifs sur des cellules en divisions. C'est le cas de la vancomycine utilisée contre les infections à *Staphylococcus aureus*, en s'insérant dans la paroi des bactéries gram positif pour empêcher la division cellulaire ; en absence de cette fonction, l'antibiotique perd son efficacité (**Briandet et al., 2012**).

Aujourd'hui, il est admis que le phénotype biofilm reflète des altérations de l'expression génique des bactéries adhérentes (**Phillip et al, 2011**). La densité et la proximité spatiale des cellules dans un biofilm favorise l'échange de gènes entre les cellules et l'apparition de mutants résistants à beaucoup d'agents antibactériens (**Briandet et al., 2012**).

Les exopolymères qui constituent un gel organique (une gangue) ont des propriétés physico-chimique qui leurs confèrent un rôle de barrière filtrante, soit par interaction avec le composé, soit par piégeage (**Jouenne, 2008**). La densité de cette matrice diffère d'un biofilm à un autre, cependant le rôle de tamis est conservé et les gros éléments ne pourront pénétrer efficacement le biofilm. Certains agents antibactériens de petites tailles sont ralentis voir stoppés dans la matrice ; surtout lorsqu'ils sont chargés positivement. Les entités fortement cationiques interagissent avec les groupements anioniques de la matrice et restent figées sur place, c'est le cas des ammoniums quaternaires qui sont des désinfectants très largement utilisés dans le secteur médical et industriel (**Briandet et al., 2012**).

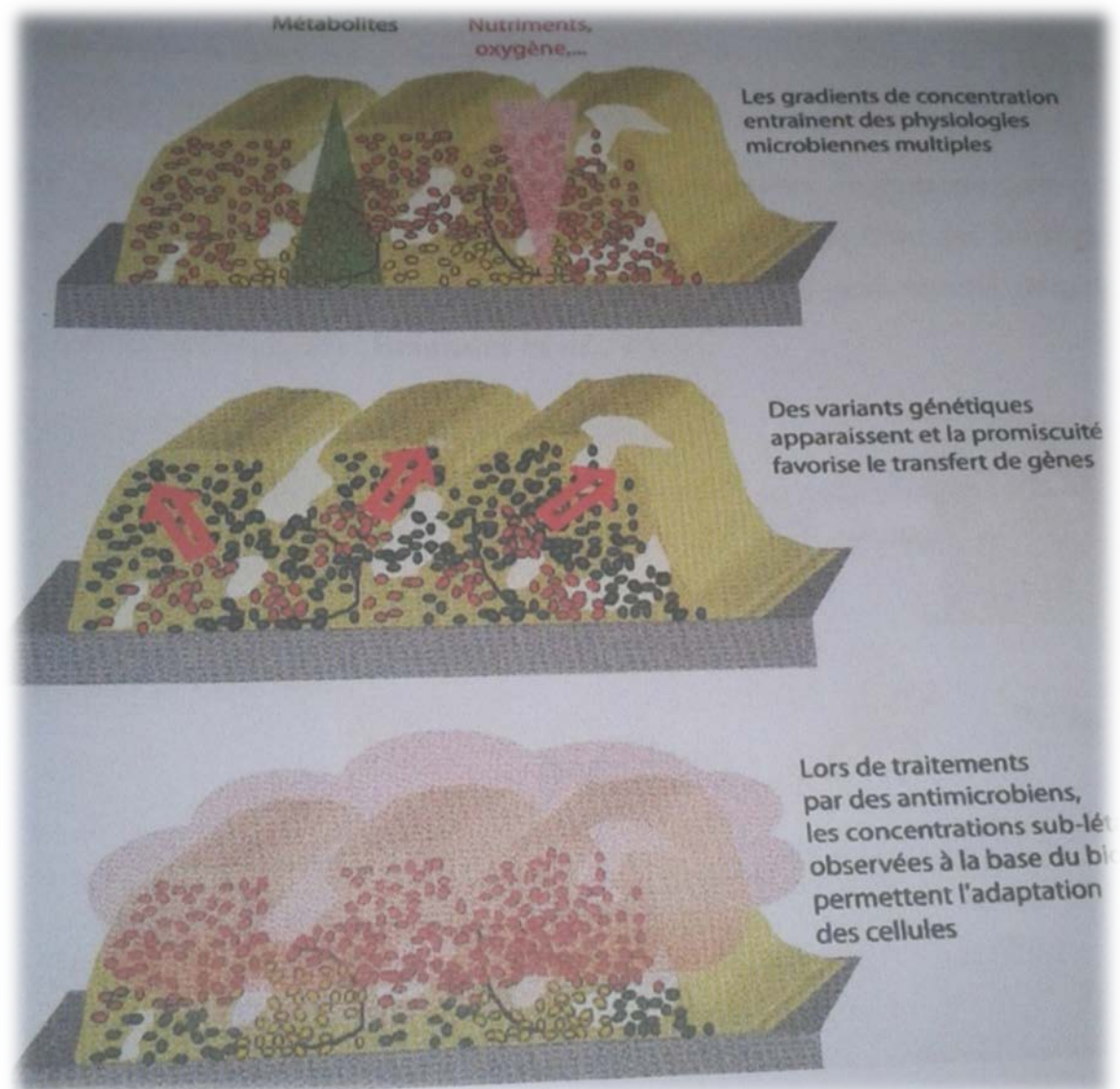


Figure N°16 : Mécanismes de résistance d'un biofilm (Briandet et al., 2012).

### III.7. Impact des biofilms sur leur environnement

Les biofilms sont partout : sur la surface de la peau, des intestins, des pierres, des maisons et jusque dans les nuages. Leur impact est différent selon qu'ils soient positifs ou négatifs ; des exemples sont bien illustrés dans la figure 3.

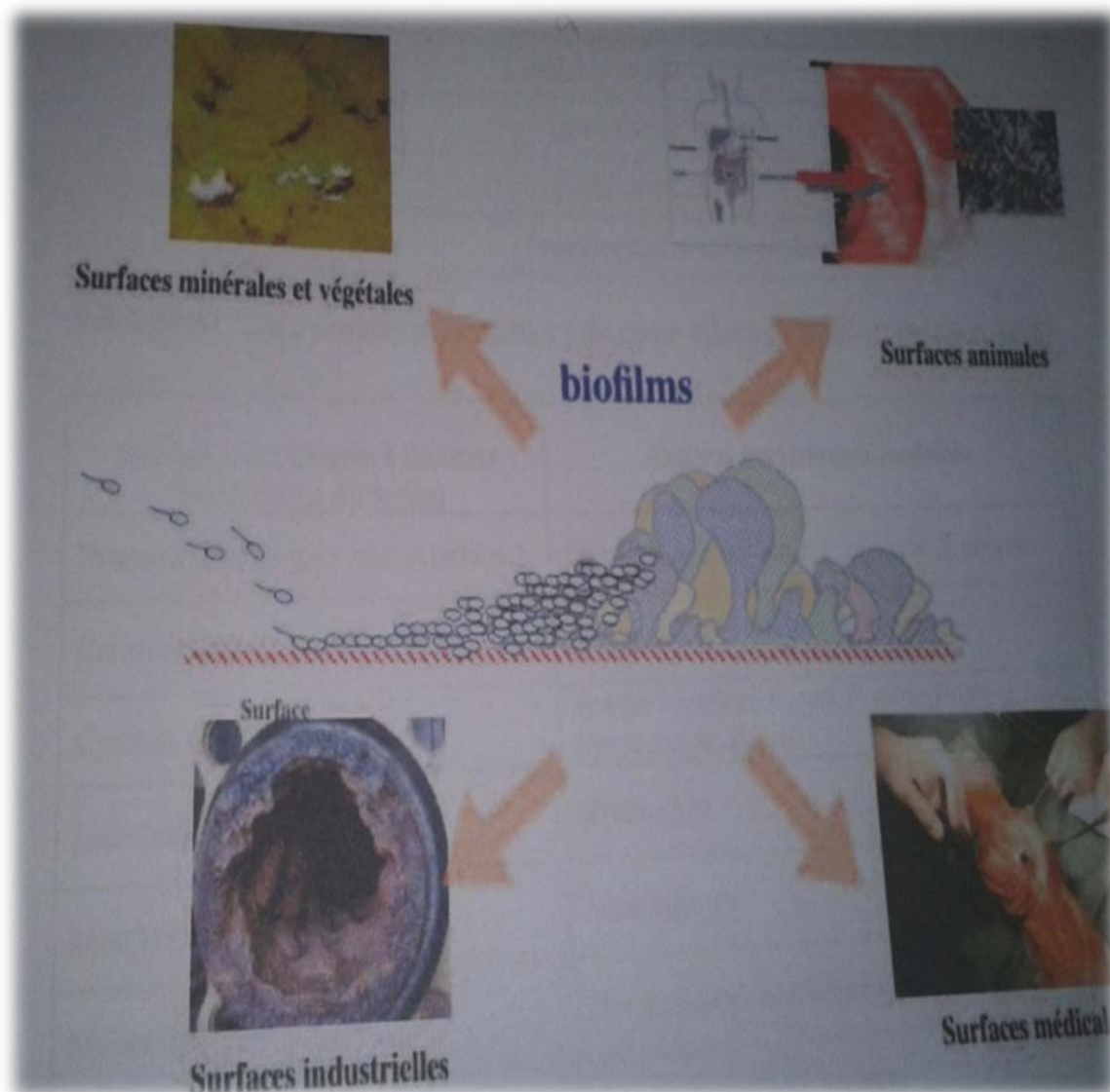
#### III.7.1. Les biofilms négatifs

**Dans le domaine industriel :** Le milieu agroalimentaire est très touché, le problème est présent dans tout les secteurs : laiterie, transformation de viandes, brasserie...etc. Tout

équipement non stérilisé abrite des microorganismes pouvant provoquer une infestation par biofilms et cela en quelques heures et devenir résistant aux agents extérieurs et induire une contamination (**Agle, 2007**).

En plus du problème de santé, ils provoquent un surcoût de la production, notamment lorsqu'ils sont présents dans les échangeurs thermiques dont ils altèrent les performances et causent une contamination bactérienne dans le produit fini.

Les biofilms dégradent toutes les surfaces : paroi en béton, tuyauterie...etc ; cette bio-corrosion est liée à la présence de bactéries sulfato-réductrices dans les biofilms et à titre d'exemple elle est responsable d'un surcoût de 5 milliards d'euro annuel dans les secteurs industriels et maritimes français (**Briandet et al ., 2012**).



**Figure N°17** : Présence de biofilms sur toutes les surfaces (**Roux et Chigo, 2006**).

**Dans le domaine médical :** Que se soit de la plaque dentaire aux infestations sur matériel médical et implants, comme le démontre le tableau 4, le problème biofilm persiste. Il a été montré que les biofilms étaient impliqués dans 60% des infections nosocomiales et dans toutes les infections prothétiques (**Jouenne, 2008**). Les maladies infectieuses à biofilms sont regroupées dans le tableau 5. Les traitements antibiotiques classiques ne sont pas efficaces contre eux (**Riemann et Cliver, 2006**). Le biofilm est la première cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (**Agle, 2007**).

**Tableau N°11** : liste partielle des infections de matériel médical dues aux biofilms (Jouenne, 2008).

<b>Matériel médical</b>	<b>Espèces bactériennes associées</b>
Cathéters veineux centraux	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Pacemakers	<i>Staphylococcus aureus</i>
Prothèses orthopédiques	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>
Sondes d'intubation	Nombreuses bactéries et champignons
Sondes urinaires	<i>Eschirichia coli</i> et autres Gram négatifs
Stérilets	<i>Eschirichia coli</i>
Sutures	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>
Valves aortiques	<i>Staphylococcus aureus</i>
Verres de contact	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i>

**Tableau N°12** : liste partielle des maladies infectieuses liées à un biofilm (Jouenne, 2008).

<b>Maladies infectieuses à biofilms (pathologies associées)</b>	<b>Espèces bactériennes associées</b>
Bronchites chroniques (mucoviscidose)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>S. aureus</i>
Caries dentaires	<i>Streptococcus</i>
Cystites, pyélonéphrites	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Endocardites	<i>Streptococci</i>
Kératites	<i>P. aeruginosa</i> ,
Mélioïdose	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Péritonites	<i>E. coli</i> , <i>Bacteroides fragilis</i>
Prostatites	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococci</i> , <i>Enterococci</i>

Zones peu accessibles au nettoyage et à la désinfection (Robinson, 2002). Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures, et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de

devenir résistantes aux agents extérieurs engendrant d'éventuelles contaminations (biofilms composés de bactéries pathogènes comme listeria ou salmonella) (Agle, 2007).

### III.7.2. Les biofilms positifs

Il existe plusieurs exemples de biofilms positifs

- **Traitement des eaux et dépollution** : Dans des stations d'épuration dites à boues activées, les bactéries s'auto-agglomèrent en floccs (biofilm sans support) pour traiter les pollutions azotées et phosphorées ; sans oublier les biofiltres sur support : pouzzolane, argile expansé, polystyrène et souvent grains de sable ; leur rôle est d'éliminer les composés organiques volatiles des effluents gazeux, les hydrocarbures des océans et des mers pollués (Briandet et al, 2012).

Ils sont aussi un indicateur de pollution des cours d'eau par des substances toxiques car ils accumulent les polluants éventuels sur de longues périodes et donnent des indications sur le degré de pollution chronique de leur habitat (Jouenne., 2008).

La digestion anaérobie (fermentation des résidus organiques) des déchets agricoles, ordures ménagères, boues de stations d'épurations permet de créer du méthane recyclable et donc de produire du biogaz (Briandet et al, 2012).

- **Emergence d'une physiologie «biofilm»**

Il est aujourd'hui admis que le phénotype «biofilm» reflète des altérations de l'expression génique des bactéries adhérentes (Philipset al ., 2011). Le développement de nouvelles approches dites «postgénomiques», telles que les puces à ADN, la protéomique et l'hybridation soustractive de ADN c, ont permis aujourd'hui de commencer à dresser un inventaire des différences d'expression génique chez les bactéries organisées en biofilm et les bactéries en suspension cependant, des différences notables ont été observées au niveau quantitatif entre les approches protéomique (consistant à identifier et quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné) et transcriptomique (consistant à identifier et quantifier les ARN m exprimés) (Jouenne, 2008).

Ainsi, alors que la protéomique suggère qu'un grand nombre de protéines sont différemment exprimées chez les bactéries des biofilms soit entre 15 et 50% de modification du protéome, les résultats obtenus par puces à ADN montrent qu'une faible proportion du génome (entre 1 et 15 %) présente des modifications significatives d'expression.

Ces différences peuvent bien sûr s'expliquer par la faible corrélation entre la quantité d'ARN m et de protéine (**Jouenne, 2008**).

### III.8. Les méthodes de détections des biofilms

Il existe de nombreuses méthodes d'études des biofilms, les plus utilisées sont :

- **Méthode de la gélose au rouge-Congo (Congo Red Agar)**

Cette méthode décrite par (**Freeman et al 1989**), s'appuie sur l'utilisation d'un milieu cerveau-cœur gélosé supplémenté de 5% de saccharose et d'une solution de Rouge Congo (0.8g/l), après incubation de l'inoculum à 37°C de 24 à 48 heures, les colonies formant un biofilm apparaissent cristallines avec noircissement du milieu en dessous (**Mathur et al ., 2006**).

- **Méthode de coloration au Violet de Gentiane**

La méthode de (**Christensen et al 1982**). S'appuie sur la coloration du biofilm attaché à un support par violet de gentiane, le contenant peut être un tube en verre ou une microplaquette en polystyrène à fond plat ; après incubation de l'inoculum pendant 24 heures à 37°C, le support est vidé et rincé avec un tampon de phosphate salin à pH 7.3 puis teint au violet de Gentiane ( 0.1%) pendant quelques minutes puis rincé une dernière fois à l'eau désionnifiée l'intensité du biofilm peut être appréciée par une lecture de la coloration présente dans chaque puits de la microplaque au spectrophotomètre à longueur d'onde de 570nm (**Hassen et al., 2011**).

- **Méthode du « biofilm Ring Test® »**

Une poudre magnétique est ajoutée à une culture bactérienne dans un bouillon, et incubé à 37°C pendant 24 heures dans une microplaque avec des puits à fond plat. Cette méthode nécessite un dispositif spécial, liquide de contraste ajouté au bouillant après l'incubation et une boîte spéciale appelée « blok test » pour assurer la magnétisation de la plaque. Le résultat est mesuré et apprécié en faisant passer le blok test dans un scanner spécial pour avoir une image des puits. L'absence de biofilm est révélée par un rond de poudre magnétique immobilisée au fond des puits ce qui n'est pas retrouvé en présence d'un biofilm qui empêcherait cette immobilisation. Le taux d'immobilisation est mesuré par le scanner pour donner la densité du biofilm (**Crémet et al ., 2013**).

### III.9. Levure du genre *condida albicans*

#### III.9.1. Généralité

Le *condida albicans* est un champignon saprophyte qui vit chez certaines personnes sans perturber aucunement la santé. C'est ce qu'on appelle un portage sain.

C'est la levure la plus fréquente et la plus pathogène, Elles peuvent provoquer chez l'homme et l'animal des dénomme globalement candidoses. (**Iarpent, p, 1990**).

#### III.9.2. Définition

Le *condida albicans*, souvent associé à un champignon microscopique, est un micro-organisme de la famille des levures que l'on retrouve normalement dans l'organisme humain en quantité relativement limitée. A l'état normal, cette levure vit en harmonie sur les muqueuses de nos organes digestifs, dans notre bouche, notre estomac et nos intestins sans y causer le moindre trouble. (**Céline Arsenault ,2001**).

*Condida albicans* est l'agent étiologie le plus fréquent, c'est une levure cosmopolite, saprophyte d'un organisme hôte, homme ou animal (**S, Agbo-codeau, A.guedj, 2005**).

#### III.9.3. Classification

(**Chabasse et al 1999**), font leur classement qui on l'est résumé comme suite :

- Règne : fungie
- Division : fungi imperfectif (deuteromycotina) ;
- Classe : Blastomycète
- Ordre : Cryptococcale ;
- Genre : Candida ;
- Espèce : Candida albicans ;

#### III.9.4. Structure

Selon (**Kobayashi et al, 1999**), les levures de *C. albicans* son des cellules eucaryotes, possèdent une paroi cellulaire rigide riche en polysaccharide antigénique (glucane, manane et

phosphomanane, liée à des peptides), en chitine et en protéine dont certains sont des enzymes (Guiraud, 2003).

D'après (Fradin. C et Hube. B, 2006), sous la paroi on retrouve une membrane simple et fragile qui entoure le cytoplasme dont cette dernière retient l'ensemble des composants cellulaires.

#### \* Aspect macroscopique

En culture, les *C. albicans* sont ovoïdes ou sphériques forment des colonies qui ressemblent aux colonies bactériennes (Kobayashi et al, 1999).

Elles sont blanches ou crémeuses, lisses brillantes (S. Morsa, 2000).

#### \*Aspect microscopique

Les *candidas albicans* sont des levures ovoïdes à bourgeonnement multiple avec une taille de (3-6) (6-10)  $\mu\text{m}$  (Hélène K, 1995).

Après quelques jours en culture, la levure *candida albicans* produit des pseudomycélium ou des vrais mycélium avec la formation d'une structure spéciale (chlamydospores) terminale ou latérale, rondes ou ovales (Camille Delarras, 2007).

#### \* Caractère morphologiques

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15  $\mu\text{m}$ , et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro et in vivo* *Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie (Vazquez & Balish., 1997), se reproduit de façon asexuée par bourgeoisements (Coste et al ., 2003).

Certains paramètres tels que le pH, la température ou la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique de cette levure. Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés.

- ❖ La forme blastospore, ronde ou ovalaire, mesurant de 2 à 4  $\mu\text{m}$  avec parfois un bourgeon de formation ;
- ❖ La forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600  $\mu\text{m}$  de longueur et de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filiment mycélien. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient

la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants.

- ❖ La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des organes de l'hôte (Coste et al, 2003).

### III.9.5. Reproduction

*Candida albicans* est dit levure imparfaite dont leur reproduction sexuée inconnue (Chabasse et al, 1999). *Candida albicans* est une espèce di morphique qui se multiplie par bourgeonnement ou scissiparité (Camille Delarras, 2007).

#### III.9.5.1. Physiologie

Sur un milieu sabouraud, pendant 24 heures à 48 heures et à température de 25-37C<sup>0</sup>. *C. albicans* donne des colonies blanchâtre et crémeuse.

Après 24h sur milieu PCB, notre espèce apparait sous forme filamenteuses (Camille Delarras, 2007).

Selon (Camille Delarras 2007), *C. albicans* est aérobies strictes, peut cultiver à un pH compris entre 4-7,5.

Sa physiologies est représentée par sa production d'enzyme et son utilisation des substrats carbonés et azotés. qui se fait par l'auxanogramme, soit par le myogramme (fermentation des sucres) (Patrick Bonsée, 1994 ; Camille Delarras, 2007).

#### III.9.5.2. Pathologie

Dans certaines conditions, les *C. albicans* peuvent devenir pathogène opportuniste, elles se transforment de l'état saprophyte à l'état parasitaire sous l'influence de certains facteurs (S. Morsa, 2000).

Selon (S. Morsa 2000), les facteurs favorisant sont :

- **Facteurs locaux**

-humidité, hypersialie ou xérostomies.

-macération (contact de longues durées avec l'eau, obésité...).

-pH acide de la peau, chaleur, transpiration.

-Mauvaise hygiène

-Transpiration

#### • Facteurs généraux

-diabète, trouble de l'immunité (sida), chimiothérapie.

-irritation chronique.

-chirurgie : digestive, cardiaque, greffes d'organes.

#### • Facteurs physiologies

-grossesse, âge (âge extrême de la vie, les nouveau-nés).

-médicaments.

-antibiotique.

-corticoïde.

-oetrospogest.

-les somnifères.

-prise de contraceptifs.

Les hémopathies concernant le polynucléaire neutrophyle qui constitue la barrière de défense contre l'infection du *candida*.

### III.9.6. Ecologie

*Candida albicans* est considéré chez l'homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne (M. Develoux, S. Bretagne 2005). Est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains la levure se répartit différemment en fonction des sites de prélèvement : peau (3%), vagin (13%), tractus ano-rectal (15%), cavité buccale (18%),

estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléo (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets.

*Candida albicans* peut aussi être isolé de manière exceptionnelle dans la nature (sol, plante, atmosphère, eau...) mais cela résulte en général d'une contamination fécale (**M. Develoux, S. Bretagne 2005**).

### III.9.7. Pouvoir pathogène

Le *C. albicans* est l'espèce la plus pathogène, la connaissance des facteurs de virulence, des mécanismes pathogènes et de résistance à l'infection reste imprécise. Le *C. albicans* est un agent pathogène opportuniste qui a besoin d'un changement immunitaire, local ou général, pour provoquer une inflammation. Il est responsable de la candidose vulvo-vaginale. (**Uppuluri et al ., 2009**)

*C. albicans* est quatrième cause de septicémie dans les hôpitaux des Etats-Unis. Il est la cause principale des infections fongiques.

*C. albicans* est la principale espèce fongique ayant la capacité de former des biofilms sur presque tout dispositif médical (**Uppuluri et al ., 2009**), ainsi que sur les surfaces épithéliales, tel que les surfaces gastro-intestinales, bronchial, le tractus génitale et sur la peau.

### III.9.8. Caractères culturels

En 24 à 48 heures, on obtient des colonies blanches, crémeuses, lisses en milieu sabouraud incubé à 37 C°.

## **I.1. Lieu et objectif de l'étude**

### **I.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, une levure *candida albicans*.

### **I.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 - Mai 2016).

## **I.2. Techniques et méthodes expérimentales**

### **I.2.1. Matériels biologiques**

#### **I.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 N°18:** Les différentes variétés de miels

### **I.2.1.2. Microorganisme testé**

Le microorganisme utilisé dans cette étude est de germe pathogène isolé cliniquement .Leur prélèvement et leur isolement se faisaient en respectant les normes d'hygiène et en utilisant le milieu de culture sélective adéquate.

Le germe sélectionné pour cette étude est :

- Levure : *Candida albicans*

Ces isolats nous ont été fournis par laboratoire d'hôpital de Mostaganem Chigi vara

Après le prélèvement du cathéter, son extrémité distale est sectionnée, puis placée immédiatement dans un tube stérile contenant 5 ml sabouraud liquide en suite ce tube est incubé à 37<sup>0</sup>C pendant 48 heures.



**Figure N<sup>o</sup> 19:** Cathéter

**I.2.2.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.

**I.2.3.Préparation de miel avec olive propolis huile**

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%.

**I.2.4.Matériels utilisés****\* Appareillages**

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

**\* 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

**\* Autres matériels**

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

**\* produits utilisés**

- Gélose sabouraud
- Eau distillée
- Hypochloride de sodium
- Eau physiologique 0.9%

### **I.3. Technique d'ensemencement**

Dans une zone stérile, sur des boîtes contenant le milieu sabouraud solide avec une épaisseur de 4 mm bien séchées à l'aide d'une pipette pasteur stérile on prélève quelque échantillon et fait' ensemencement est incubé à 37<sup>0</sup>C pendant 48 heures.

On fait un repiquage de ces souches sur la gélose sabouraud pour obtenir des cultures jeunes.



Figure N°20 : *Candida albicans*

#### I.4. Préparation des solutions du miel

Des solutions des miels ont été préparées 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 37°C.

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

#### I.5. Activités antifongiques

##### I.5.1. Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition)

Prendre deux colonies de suspension fongiques dans un 5ml d'eau physiologie pour obtenir la densité optique à 625 nm dans un intervalle [0,08 – 0,13] → 10<sup>6</sup>UFC.

0.2 ml de la suspension fongique 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 sabouraud liquide avec 0.2 ml de la suspension fongique servait de commande. La densité optique a été déterminée dans un spectrophotomètre à 620 nanomètre avant l'incubation (**t<sub>0</sub>**) et a enregistré. Les cultures ont été incubées pendant 48 heures dans l'obscurité à 37°C. Après 48 heures d'incubation, les densités optiques étaient de nouveau (**t<sub>48</sub>**) déterminé et enregistré.

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

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

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

**DO:** Densité optique

**DO<sub>test</sub>:** Densité optique (t<sub>48</sub>-t<sub>0</sub>) dilution de miel

**DO<sub>control</sub>:** Densité optique (t<sub>48</sub>-t<sub>0</sub>) (sabouraud liquide)

Les témions negatives ont été prepares par ajout des souches testées aux milieux adiquats sans inhibiteur.

### **I.5.2. Technique de diffusion en puits**

La gélose sabouraud (20ml) coulée en boites de pétri de 90 mm de diamètre sur une épaisseur de 4 mm, estensemencée par écouvillonnage de la surface par la suspension fongique avec une densité de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Les boites 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 boites sont incubées à 37°C pendant 48 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 déférentes concentrations de miel. (**El-shaer et ghanem, 1966**).

### **I.6. Adhésion des bactéries à la surface des cathéters urinaires**

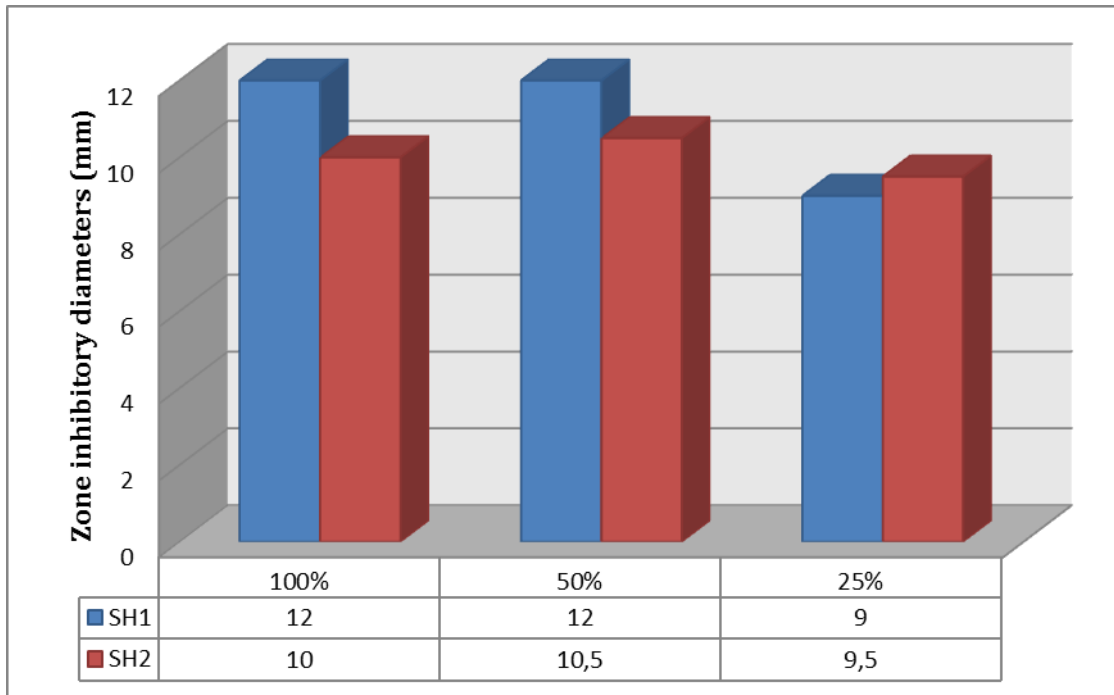
Pour favoriser la formation des biofilms sur les cathéters urinaires stériles, 4ml de sabouraud liquide et 0.2 ml de suspension fongique ont été ajoutés dans des tubes à essais contenant des différentes concentrations du (miel-propolis). Les tubes ont a été incubé

pendant 48 h à 37°C. L'action de chaque concentration contre les cellules bactériennes adhérees à la surface des cathéters a été évaluée après 48 heures.

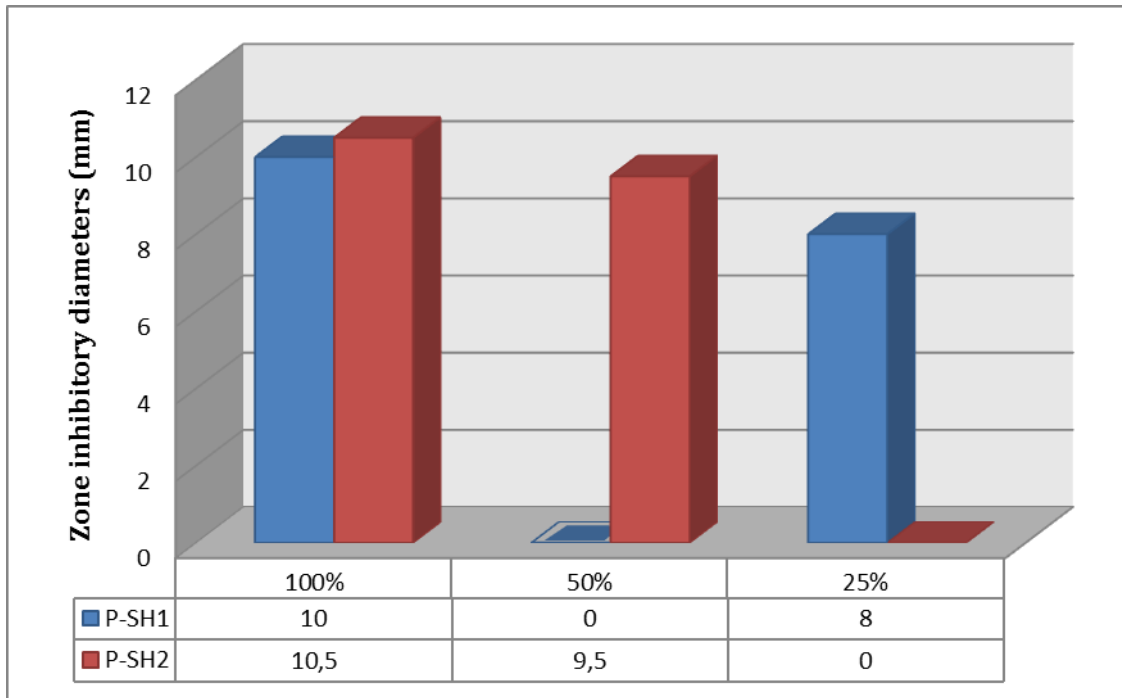
II.1.L'activité antifongique

II.1.1.Technique de diffusion en puits

Tableau N°13 : Les diamètres des zones d'inhibition de 02 variétés de miel en mm.

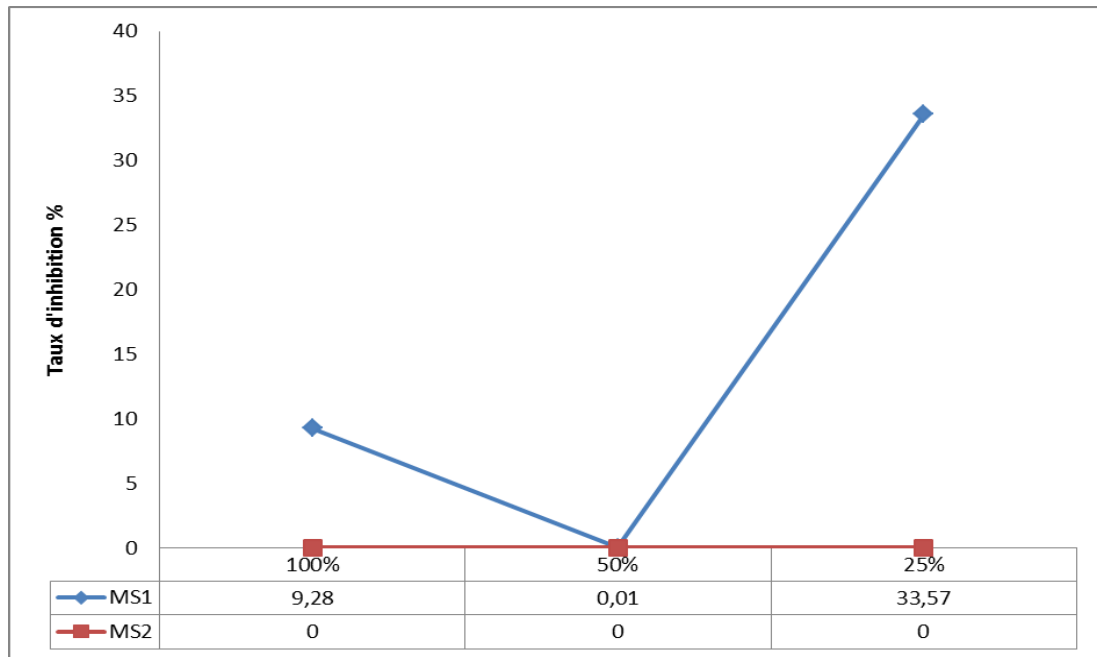


*C. albicans* testée dans notre étude était sensible à l'action du miel évalué avec un diamètre d'inhibition allant entre 9 et 12mm.

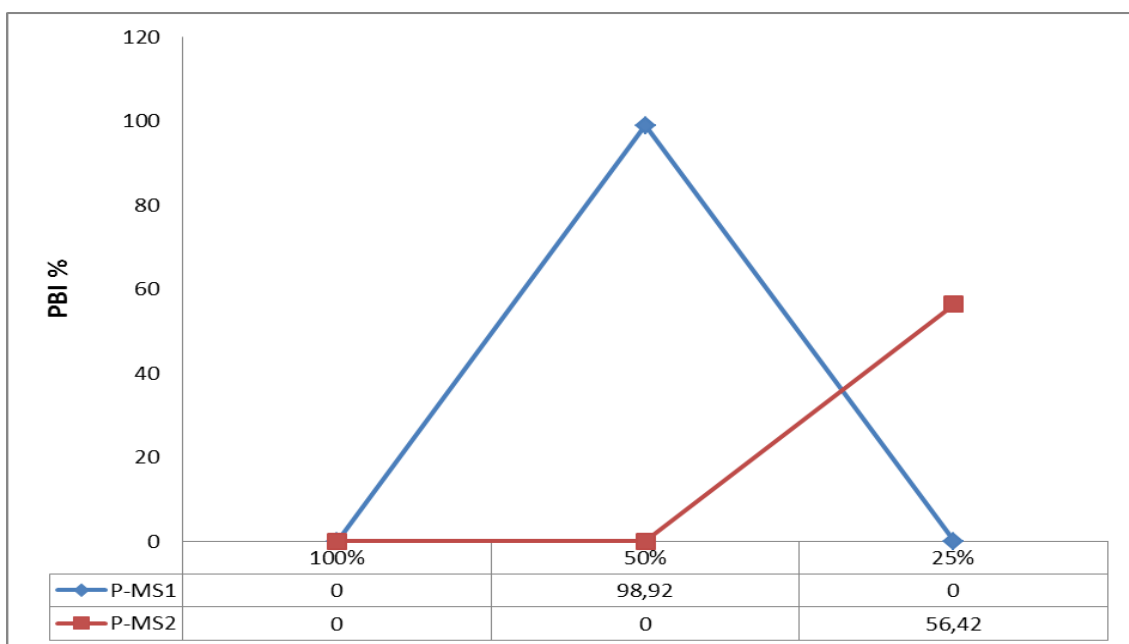


Les résultats émanant des tests montrent une diminution du pouvoir inhibiteur du miel en présence de propolis. Les valeurs des diamètres d'inhibition allant entre 0 et 10.5mm

II.1.2. Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition)



Les résultats relatifs à la croissance des levures étudiées soumises à l'action des différentes concentrations du miel testées sont illustrés dans la (figure...21) Les concentrations sont exprimées en % (v/v). Le miel (MS1) à inhibé la croissance de *C. albicans* par contre le miel (MS2) qui s'est révélée inefficace sur cette levure.



Les résultats émanant des tests montrent une augmentation du pouvoir inhibiteur du miel (MS2) en présence de propolis. Le pourcentage d'inhibition valeurs des diamètres d'inhibition allant entre 0 et 56.42% (**figure ... 22**).

En fonction des diamètres des zones d'inhibition d'isolat testée on a classé les miels en trois catégories : ceux non actifs, ceux à activité moyenne et ceux à forte activité antifongique (**tableau 1**).

Selon les résultats obtenus on a constaté que les diamètres des zones d'inhibition varient en fonction du miel et de la concentration. La plupart des concentrations se sont montré un effet vis-à-vis *C.albicans* avec des diamètres  $\geq 10$  mm dans la plupart des cas. Les travaux **d'Ahmed et al. 2014** ont révélé que le miel Algérien a ont montré une forte activité contre *C.albicans*.

D'après ces résultats on constate clairement que le diamètre des zones d'inhibition varie en fonction de type de miel et en fonction de la concentration. En effet, le miel (MS2) à 100 % à présenter un diamètre d'inhibition la plus élevé (12 mm), suivis par le miel (MS2) 10 mm.

Alors que les diamètres des zones d'inhibition les plus faibles sont enregistrées pour les concentrations 25% avec des valeurs comprises entre 9 et 9.5 mm. En accord avec ces résultats, plusieurs travaux affirment que le miel plus est dilué plus il est moins faible (phénomène de fermentation).

L'activité *in vitro* de miel a fait l'objet de nombreuses études, Cette activité de la plupart des miels semble être le résultat de plusieurs facteurs :

L'osmolarité élevée qui est considérée comme un précieux outil dans le traitement des plaies cutanées, car elle prévient la croissance des levures et renforce la cicatrisation (**ARCHER et al. 1990**).

Le pH bas du miel associé à l'effet osmotique de ses sucres fut longtemps considéré comme les principaux facteurs antifongique (**YATSUNAMI et ECHIGO, 1984**). Mais certaines études ont montré qu'il n'existait aucune corrélation entre le pH du miel et son activité antifongique (**BOGDANOV, 1997**).

Cependant si le miel est dilué, particulièrement par les fluides du corps, le pH ne sera pas ainsi un inhibiteur efficace de beaucoup d'espèces microbiennes de par l'effet tampon exercé par ces fluides (**MOLAN, 1995**).

Dans notre cas la forte teneur en eau de la gélose réduit l'osmolarité et exerce un effet tampon sur le pH du mélange. Il y a, de façon prédominante, l'action du peroxyde d'hydrogène qui est produit par la glucose-oxydase du miel et aboutit à la dissolution des sucres sous forme de peroxyde d'hydrogène et d'acide gluconique à partir de glucose, d'oxygène et d'eau, donc une fois le miel est dilué. Ainsi, seuls de très faibles quantités de peroxyde d'hydrogène, insuffisantes pour engendrer une activité antifongique, sont retrouvés dans le miel pur.

L'activité antifongique du miel réduite lors de l'exposition à la lumière et à la chaleur (**WHITE et. et 1964**) ou par l'ajout de catalase ou de peroxydase (**WHITE et, al 1963**). **White et al (1964)** ont ainsi montré qu'après dilution, la production de peroxyde d'hydrogène par le glucose oxydase dans le miel en une heure pouvait augmenter d'un facteur 2500 à 50 000. Malgré tout, les concentrations en peroxyde d'hydrogène retrouvées dans le miel après dilution restent faible (1mmol/L) (**MOLAN P.C.1992**), soit environ 1000 fois moins que les concentrations retrouvées dans les solutions antiseptiques d'eau oxygénée à 3% (**COOPER R.A, MOLAN P.C.1999**).

Par ailleurs, le glucose oxydase étant sensible à la lumière et la chaleur (**DIMINS et al, 2006**), lorsqu'un miel est utilisé pour son activité peroxyde, il est indispensable de s'assurer qu'il ait été conservé à l'abri de la lumière et qu'il n'ait subi aucun traitement thermique. Cette activité antifongique du miel n'est pas le seul fait de l'eau oxygénée car il contient également d'autres substances inhibitrices (substances phytochimiques, la nature des fleurs sur laquelle sont allées butiner les abeilles), car en fonction des espèces florales,

les miels auront des substances inhibitrices différentes, ce qui explique les particularités thérapeutiques de certains miels (ALCARAZ A, KELLY J. 2002).

Il est difficile de comparer les résultats obtenues dans cette étude car ils proviennent de nombreux auteurs utilisant les miels d'origines florale et géographique variées, dont le mode de conservation est souvent inconnue et mettant en oeuvre les tests microbiologiques qui ne sont pas tous basés sur la même méthode. Mais, au vu de l'ensemble des résultats obtenus, on peut tout de même conclure que la plus part des miels possèdent une activité inhibitrice remarquable *in vitro*.

Plusieurs travaux ont mis en évidence des procédures de désinfection permettant d'éliminer les biofilms à cathéters, car ces biofilms représentent des réservoirs potentiels d'agents infectieux.

Cette recherche a démontré (miel-propolis) réduit la croissance de *C.albicans*. L'application de (miel-propolis) en tant que revêtement d'un dispositif médical (cathéter urinaire) pourrait avoir un effet sur la dégradation de biofilm. Pour ce faire, il faudra également développer des essais standardisés permettant d'évaluer ces synergies potentielles.

- **Agbo-codeau, S., geudj, A., 2005.** Mycoses buccales. Edition:Elsevier.paris.pp83.http // France. Elsevier.com/direct/EMC STO/.
- **Agle, M., 2007.** .biofilm in the food industry. Chapt01. USA : blackwell publishing.
- **Ahmed moussa (2007):** evaluation in vitro de l'effet synergique de lamidon sur l'activité antifongique du miel, en relation avec l'indice de diastase vis-à-vis de deux pathogène : *candida albicans* et *aspergillus niger*.
- **Allam M. Abdelmonem, Salah M. Rasheed and Cabeer Sh Mohamed (2012):** bee-honey and yagourt: a novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. Archives of gynecology and obstetrics.2012, doi: 10.1007/s00404-2242-5.
- **Alexander, F., 1984.** Apiculture Aujourd'hui. Eds. Rustica. Paris.
- **Alexander, M., 2003.**l'apiculture d'aujourd'hui 2<sup>ème</sup> édition dargaud éditeur.pp 91-125.
- **Allegret, S., Boulocp., 2006.** Le chauve industriel production et utilisation collectif. Ed. France agricole, 64p.
- **Ali, A., T, 1989.** « The pharmacological characterization and the scientific basis of the hidden miracles of honey», Saudi medical journal. Vol.10, n 03, p177-179.
- **Al mammary, m., Al-meeri, A., al-Habori, M., 2002.** «Antioxidant activites and total phenolics of different types of honey», Nutrition Research.n<sup>0</sup> 22, p 1041-1047.
- **Alix, Lefief-Delcourt., 2010.** Le miel malin : tous les bienfaits au quotidien de cet ingrédient délicieux et 100% naturel, ed. Le duc.s, p21-22-36.
- **Anso, J., 2012.** «Du miel à volonté», dur à avaler.n<sup>0</sup> 1 (mars 2012), p 09.
- **Ary fernandes J., Elaine C.B., Joyce E., Cristina B ., Ricardod D.O ., Maria de lourdes R.S.C., Augusto C.M. ; 2005.** Propolis anti-Staphylococcus aureus activity and synergism withantimicrobial drugs Men Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vol. 100 (5) : 563-566.
- **Bahorunt, T., 1997.** Substances naturelles active, la flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de maurice. Amas, food and agricultural research council, réduit, maurituis, p83.
- **Bancova, V., Dyalgerov, A., Popov, S., and Marekov, N.L., 1987.** A.GC/MS study of the propolis phenolic constituents. Z.F. Naturforschung, 42 :147-151.

- **Bankova, D.A, Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., 1991.** A study on the origin of bulgarian propolis. *Apiacta* 40 : 13-17.
- **Bankova, D.A., Popv, S., Evstatieva, L., et al. 1992.** Propolis produced in Bulgaria and Mongolia : phenolic compound and plant origin. *Apidologie* 23 : 79-85.
- **Bankova, V., Castro, SL., & Marcucci, MC., 2000.** Propolis : Récent progrès de la chimie et de l'origine des plantes, *Apidologie* ; 31 : 3-15.
- **Beloin, C., Ghigo, J., M., 2005.** Finding gene –expression patterns in bacterial biofilms. *TRENDS Microbiology*. 13(1).16-19.
- **Bendahou, H., Hasnet. (2002)** : contribution à l'étude de l'influence de durée de conservation sur la qualité de miel dans la wilaya de mascara, mémoire d'ingénieur en science alimentaire, centre universitaire, de mascara 22 p 28.
- **Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., Golob, T., 2007.** Evaluation of the phenolic.
- **Bilsel, Y., Bugra, D., Yamaner, S., Bulut, T., Cekibvas, U., Turkoglu, U., 2002.** Could honey have a place in colitis therapy, effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation? *Dig surg* n 19, p 309-311.
- **Bogdanov, S., Bieri, K., Figar, M., Figueredo, V., Iff, D., Kanzing, A., 1995.** miel: definition et directives pour l'analyse et l'appréciation. Centre Suisse de recherche apicole, station de recherche laitières, libefeld, ch-3003 berne.
- **Bogdanov, S., Bieri, K., Figar, M., Iff, D., Kanzig, A., Figueredo, V., Stokli, H., et Zucher, K., 1995.** Miel definition et directives pour l'analyse et l'appréciation centre Suisse de recherches apicoles Station fédérale de recherche laitières, liebefeld, CH-3003 Berne, édition : MSDA.PP : 1-37.
- **Bogdanov, S., 1997.** Nature and origine of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel wissenschard and technology*, 30, p748-753.
- **Bogdanov, S., 1999.** stockage, cristallisation et liquefaction du miel. Centre suisse de recherche apicoles, p 05.
- **Bogdanov, S., Luliman, C., Martin, P., Russmann, H., 2000.** «Honey quality methods of analysis and international regulatory standards», review of the work of the international honey commission. Swiss bee research centre.
- **Bogdanov, S., Blumer, P., 2001.** propriétés antibiotiques naturelles du miel rsa98 (3) 107-114 (2001).

- **Bogdanov, S., Imdrof, A., Charriere J-D., Flurip , Kilchenmann ,V., 2003.** Qualité des produits apicoles et sources de contamination. Centre suisse de recherché apicoles. Station fédérale de recherché laitières, liebefeld, CH-3003 Berne p : 1-2-3. Traduction Evelyne Fasnacht (partie 1) et Michel dubois (partie 2).
- **Bogdanov, S., Bierri, k., Gremaud, G., Iff, d., Kanzing, A., Stockl, H., Zurcher, K., 2004.** produits apicoles : 23 a miel, revues par le groupe d'experts «produits apicoles». (bogdanov s. président). Agroscoop liebefeld-posieux, station fédérale de recherches en production animale et laitière (alp), centre des recherches apicoles. Liebefeld-bern ; édition : msda. P1-37.
- **Bogdanov, S. K., Bieri, P., Gallmann, 2005.** Miels monoflorauxcsuisses.
- **Bogdanov, S., Bierib, Figarm, Iffd, Kanzing ., A, Figueiredo, V. ,Boukra ,I., Amara, k., Aggad, H., 2006.** Synergistic effect of starch on the antibactetrial activity of honey against staphylococcus aureus.1<sup>st</sup> international conference on the medical uses of honey. Usm, kota bharus, Malaysia. 26-28 august 2006.
- **Bogdanov, S., 2010 .**Propolis : biological properties and medical applications. The propolis book chap2.
- **Boyonova, L. I., 2005.** Activity of bulgarian propolis against 94 *helicobacter pylori* strains in vitro by agar- well diffusion, agar dilution and disc diffustion methods. Journal of medical microbiology (54), 481-483.
- **Bozcuk Erdem, G., Imez, S., 2003.** Inhibitory effect of bursa propolis on dental caries formation in rats inoculated whith *Streotococcus Sorbinus*. Hasettepe University Ankara Turkey.
- **Burdock, GA., 1998.** Review of the biological properties and toxyicity of bee propolis (propolis).food Chem toxicol 36 : 347-363.
- **Branger, A., Richer M-M., Roustel, S., 2007.**Microbiochimie et Alimentation. Educagri Paris. 343 :166-168.
- **Briandet, R., Fehner, L., Naiitali, M., 2012.** Biofilms, quand les microbes s'organisent. Ed : Quae. 21-37.
- **Broudiscou laurent – philippe., papon Yves., broudiscou anne F., 1997.** Maintenance of rumen protozoa population in a dual outflow continous fermenter.J Sci food agric, 75,273-280.
- **Bruneton, J., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie : plants médicinales, Eds. Technique et documentation Lavoisier, Paris.

- **Bruneau, E., 2004.** Les produits de la ruche. Ed. rustica.p354-384.
- **Bruneau, E., 2002.** Les produits de la ruche. In le traité rustica de l'apiculture.paris, Rustica, p 354-384.
- **Bruneau, E., 2004.** Les produits de la ruche. Ed. Rustica. P354-384.
- **Brunet Jean, L., 2006.** Les insectes et la santé, p92-93-124.
- **Bruschi, M., L., Lara, E.,H et al. 2006.** Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticules containing propolis against oral pathogens. Dev Ind Pharm. Feb ; 32 (2) :229-38.
- **Caillais, A., 1947.** Les produits de la ruche. Le miel, la cire, la propolis. (Chez l'auteur, 2, rue saint- Gilles, 78-Bois d'Arcy, 3<sup>e</sup> édition.
- **Camille, Delarras., 2007.** microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition : TEC. Paris. pp : 321-322-331-332.
- **Cardile, V., Panico, A., Gentile, B., Borrelli, F., Russa, A., 2003.** Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. Life sci, 1027-1035.
- **Castolda, S., Capaso, F., 2002.** Propolis and old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73, Suppl. 1 :51-56.
- **Céline, Arsenault ., 2001.** Malaises et maladies le *candida albicans*. pp : 01-02
- **Chabasse, D., Guigen, C.L., Audonneau, N., 1999.** mycologie médicale, édition : masson, paris. Pp : 38-39, pp : 52-53, pp : 149-161 et pp : 174-186.
- **Chauvin, R., 1968.** Traite de la biologie de l'abeille. Tome3, 4,5.edition masson et cie. Paris, France.12-70p.
- **Chauvin, R., 1968.** Traite de la biologie de l'abeille. Tome3, 4,5.edition masson et cie. Paris, France. 31-87-92p.
- **Chauvin, R., 1968.** Les glandes cirières et la cire. Biologie et physiologie générale in traité de biologie de l'abeille. Tome Ed masson et cie. P536.come.D (1992) les animaux et le froid. ed hermann, paris.
- **Chauvin, R., 1968.** L'abeille et la fleur in traite de biologie de l'abeille (t3). Edition masson et ci, pans : p95, 268-7,293-4-9,304-6-7.
- **Chauvin, R., 1968.** Traité de la biologie de l'abeille, masson et cie, éditeurs, paris. Pp : 66-81 et 277-319.
- **Clément, H., 2003.** Le traité rustica de l'apiculture. Editions rustica. Paris, France.04-503p.

- **Codex alimentarius Commission Standards (2001):** codex stan 12-1981, rev.1 (1987), rev 2.content, antioxidant activity and colour of slovenian honey.food chemistry, n0105, p822-828.
- **Cohen, HA ., varsano ,J., kahan ,E., 2004.** La phytothérapie peut-elle protéger les jeunes enfants des infections des voies respiratoires ? arch pediatri adolescent Med ; 158 :217-21.
- **Collin, S., Crouzet, J., 2011.** Polyphénol et procédés te & doc, paris, lavoisier, 2011, p55.
- **Cortopassi- Laurino, M., Gellid, S., 1991.** Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles, africanisées apis mellifera et de méliponinés du Brésil. Apidologie, n 22, p 61-71.
- **Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M.D., Cassaing, S., Lepert, J.C., Balard, P., Chalmenton, S., Bernard, J., Orfila, C., Seguela, J.P.and Pipy, B. 2003.** PPAR gamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity*. 19 : 329-339.
- **Cuellar, A., Rojas Hernandez, N.M., 1987.** Chemical components of Cuban propolis. *Revista cubana de farmacología*, 21(3) : 365-372.
- **. Crémet, L., Corvec, S., Batard, E., Auger, M ., Pagniez ,F., Dauvergne, S., Caroff , N ., 2013.** comparaison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Echerichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*, 75(3) : 252-255.
- **Crane, E., 1997.** L'importance passée et actuelle des produits de la ruche à l'homme. *Produits de la ruche : les propriétés, les applications et l'apithérapie*. Plenum press, New York, pp 1- 14.
- **Develoux, M.S., Bretagne, 2005.** candidoses et levures diverses.emc (Elsevier sas, paris), maladies infectieuses, 8-602-a-10, 2005.pp:02.
- **Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi ,S.A., Dandiya P.C. 1991.** Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. ethnopharmacol.* 35 ,77-82.
- **Domago Gaele., Imbert, Christian, Blanchard., 2007.** Les remèdes de la ruche ED Alpheu.
- **Donadieu. Y., 1978.** Le miel, thérapeutique naturelle. Paris. 2<sup>ème</sup> édition maloine : p17-8,20-5.

- **Donadieu, Y., 1981.** La gelée royale, 5<sup>e</sup> éd., malione S.A. Editeurs. Parisfhoneybees( Apis mellifera) ; 55 (10) : 1528- 31.
- **Donadieux, Y., 1981.** Les thérapeutiques naturelles : la propolis, Eds. Technique et documentation Lavoisier, paris.
- **Donadieu, Y., 1982.** Pollen : thérapeutique naturelles. 5<sup>ème</sup> ED Maloin S. A Paris.31p.
- **Donadieu, Yves., 1987.** Les produits de la ruche pour votre santé.Vence, éditions donadieu.
- **Domego, Gaelle I., Christian B., 2007.** Les remèdes de la ruche ED Alpheu.
  
- **Downey, G., Hussey, K., Kelly, J., Walshe, T., Martin, P., 2005.** Preliminary contribution to the characterization of artisanal honey produced on the island of irland by palynological and physic-chemical data. Food chemistery, n 91, p 347-354.
- **Ducerft, G., 2006.** Guide ethnobotanique de phytothérapie. Edition promonature.
- **Ernst, E., pittler, MH., Stevinson, E., White, A., Eisenberg, D., 2005.** Medecine alternatives le guide critique, Edition Française de la coordination scientifique p175.
- **Etienne, B., 2003 :** les produits de la ruche le traite brustica de l'apiculture 2002, Edition Rustica, paris Deuxième édition : février 2003 p : 354.
- **Favier, I., 1997.** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Laboratoire de biochimie des pathologies oxydatives (GREPO), faculté de pharmacie et laboratoire de biochimie C, CHU de Grenoble, 38700 la Tronche. Annales de biologie clinique. Volume 55, Numéro 1, 9-16.
- **Ferreira AG, Leão RS, Carvalho-Assef AP, Folescu TW, Barth AL, Marques EA.** Influence of biofilm formation in the susceptibility of Pseudomonas aeruginosa from Brazilian patients with cystic fibrosis.APMIS. 2010 Aug;118(8):606-12. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02636.x.
- **Flaguel, B., 1992.** Les remèdes naturels des quatre saisons Ed C terre vivante, paris, 1992.
- **Fradin, C., Hube, B., 2006.** Transcriptional profiling of *candida albicans* in blood. Revue n<sup>o</sup>02. Volume 01. Edition: Features. Pp: 80.
- **Freeman, J., Falkiner F.R., Keane C.T., 1989 .**New method for detecting slime production by coagulase negative Staphylococci. J .Clin. Pathol. ; 42 : 872-4.
- **Fuliang, H.U., Hepburnb, H.R., Hongzhuan, x., Milni ,ch ., Dayad ,S., Radloff, S.E., 2005.** Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus pharmacobiological research 51:147-152.

- **Gabrys, J., 1986.** Free amino acids in bee live products (propolis) as identified and quantified by gas liquid chromatography. *Pharmac. Research communications* 18 (6) : 513-518.
- **Ghedira, K., Goetz, P., Lejeune, R., 2009.** Propolis. *Phytothérapie* 7 : 100-105.
- **Gletter, R., Horn, H., Isengard, H., 2006.** Influence of type and state of cristallization on the water activity of honey. *Food chemistry*, n<sup>o</sup>96, p 441-445.
- **Gonnet, M., 1982.** Composition, propriétés et conservation, 2<sup>ème</sup> édition. Opida, p 30.
- **Gonnet, M., 1982.** le miel (composition, propri étés, conservation). Ed echauffour. Argentan, ornes,
- **González-Gallego J., Sàncnez-Campos, S., Tunon M-J., 2007.** anti inflammatory propeties of dietary flavonoids. *Nutricin hospitalaria*, vol.22, n 3, p 287-293.
- **Greenaway, W.S.T., Whatler, F.R., 1990.** The composition and plant origins of propolis. *Bee World* 71 :107-118.
- **Grunberger, D.,Banerjee, R., Eisinger, K., et al 1988.** Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44,230-232.
- **Guiraud, 2003.** Microbiologie alimentaire. Dunod, paris : 09-98 et 604.
- **Hadorn, H., Zurcher, K., Doevelaar, F., 1962.** Uber warme andlagerschadigungen von bienenhongie . *trac. Chim. Alim. Hyg. (berne)*. 53 (3), 191-192.
- **Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M., 2011.** Evaluation of different détection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 15(4).
- **Hertog, M., Feskens, E., Holmman, P., Katan, M., Kromhout, D., 1993.** Dietary Antioxidant Flavonoids And Risk Of Coronary Heartdisease/The Zutphen Eldery Study. *Lancet*, N<sup>o</sup> 342, P 1007-1011.
- **Hélène, koeing., 1995.** Guide de mycology medical. Edition Marketing. Paris. pp284.
- **Huchet, Coustel, J., Guinotl, 1996.** Les constituants chimiques du miel. Méthodes d'analyses chimiques- département science de l'aliment.2<sup>ème</sup> édition.opida ; p18-19, 168-172.
- **Irland, Delphine, 2010.** Le miel et ses propriétés thérapeutiques, utilisation dans les plaies cutanées, novembre 2010, p 07.
- **Jean Prost, P., 2005.** Aoiculture; connaitre l'abeille, conduire le rucher, 7ème édition. ed tec & doc, p 698.

- **Jean- proste, P., Yeves, L.p. 2005.** Aficulture ; connaitre l'abeille, conduire le rucher. Edition Lavoisier.
- **Jeanine, F., 1993.** le miel, définition, origines, propriétés et composition. 2<sup>ème</sup> édition. But. Tech. Apic, vol. 18, n3, p 147-152.
- **Jeffery, A., Echazartta, M., 1996.** Medical uses of honey rev biomed7. P 43-49.
- **Jouenne, T., 2008.** Biofilms bactériens. Technique de l'ingénieur. Bio 600 : 1-8.
- **J. Valle, S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert, et J.-M. Ghigo,** « Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide », Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 103, no 33, p. 12558-12563, août 2006.
- **Karaborniorrti, S., Zervalaki, p., 2001.** Les effets du chauffage sur l'hmf et l'inverse des miels. Laboratory of qualité centrale apicata. Vol.36, n4 p 171-181.
- **Khayyal, M.T., El-ghazaly, L.A et al 2003.** A clinical pharmacological study of the potential benefical effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patient. Cundam clin pharmacol. Feb, 17(1) :93-102.
- **Kobayashi, G.S., Medoff, G., 1999.** mycose systématiques dues à des champignons opportunistes in microbiologie et pathologie et pathologie infectieuses (Schaechter, Med off et Eisenstein). Edition : de boech et larcier. Paris. Bruxelles.pp : 973-974-988.
- **Koru ,o., toksy, f., acikel ,ch., tunca, ym., baysallar, m., uskudar guclu, a., akca, e., ozkokuylu, a., sorkun, k., tanyuksel, m., salih, b., 2007.** In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe. 13(3-4) : 140-5.
- **Kraement ,J.p., hutt, n., de blay ,f., and pauli, g ., 2003.**Réaction anaphylactiques graves aux hyménoptères et mastocytose cutanée : intérêt et difficulté de l'immunothérapie spécifique.
- **Krell, R., 1996.** Value- Added products from bee keeping.Milan, FAO publications.
- **Krell, R., 1996.** Value- Added products from bee keeping. FAO Agricultural services Bulletin, No: 124, food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, pp.85-89.
- **Kuçük, M., Kolayli, S., Karaolu, S., Ulusoy, E., Baltaci, C., Candan, F., 2007.** Biological activities and chemical composition of three honeys of different types of anatolia. Food chemistry, n<sup>o</sup> 100, p 526-534.
- **Larocca, L.M., Guistacchini, M., Maggion, N., Ranelletti, F.O. Piantelli, M.,Alcini, E. , Capelli, A., 1994.** Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type HH estrogen.

- **Larpent, P., 1999.** Biotechnologie des levures, édition : Masson, Paris. Pp : 404-414.
- **Lavie, P., 1975.** The relationship between propolis, Grenoble, 1975. Apimondiapubl. House, Bucharest.1976.pp.229-233.
- **Lejeune, B., Vennat, B., Regerat, F., Gardelle, D., Foucher, D., Pourat, A., 1986.** Propolis extraction and utilisation in shampoos and lotions. Parf Cosm Aromes 56, 65-68.
- **Lejeune, B., Pourrat, A., et Dehmouche, H., 1998.** Propolis utilisation en dérmocosmetologie parfums, cosmétiques, Aromes.73-77.
- **Lequet, N., 2010.** Du nectar à un miel de qualité: controles analytiques du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur, thèse de doctorat.
- **Lewino, Frederic, 2009.** «Mon médecin est une abeille», le point. N 1908 (09 avril 2009), p91.
- **Li- chang, lu. , Yue- wen, chen., Cheng- chun ,chou., 2005 .** Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*.International journal of food Microbiology 102:213-220.
- **Lim, Y., Shin H-J., Kwon A-S., Reu J-H., Park G., Kim J., 2013.**Predictive genetic risk markers for strong biofilm-forming *Staphylococcus aureus* : fnbB gene and SCCmet type III. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 76.539-541.
- **Lobreau-Callen D, Marmion, V., Clement M-C., 1999.** Les miels.in «techniques de l'ingénieur», p 20.
- **Logerot, j., Mrtin, l., Marie-Neige, B., Tafour, R., Nicolas, Jean-Iuc., leprince ,L., 2003.** Infoagricole. Edition fédération des centres de Gestion Agréés Agricoles F.C.G.A.A.n0 85.13p.
- **Louveaux, J., 1968.** Composition propriété et technologie du miel. Les produits de la ruche, in trait de biologie de l'abeille.tome 03. Ed masson et cie, p389.
- **Louveaux, J., 1968<sup>2</sup>.** Propriétés et technologie du miel. Traité de biologie de l'abeille. Ed masson et cie, paris, p277-308.
- **Louveaux, J., 1985.** Les abeilles et leurs élevage.2<sup>ème</sup> édition.opida, p 18-19, 168-172.
- **Louveaux, J., 1985.** Les produits du rucher. In « les abeilles et leurs élevage», p 165-199.
- **Magalon, G., Vanwijck, R., 2003.** Guide des plaies : du pansement à la chirurgie, ed : john libbeu e urotxt, paris. P : 104.

- **Makimura, M., Kobayashi, k., Indo, J., Sanaka, S., Taguchi, T., Otake, S., 1993.** Inhibitory effect of teacatechins on collagenase activity. *J periodontol.*, 64 :630-636.
- **Marcucci, M., 1995.** Propolis : chemical composition ; biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- **Marini, F., Magri, A., Balestrieri, f., Fabretti, f., Matini, d., 2004.** Supervised pattern recognition applied to the discrimination of the floral origin of six types of Italian honey samples *analytica chimica acta*, vol. 515, issue 1, 5 July 2004, p 117-125.
- **Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay D.J., Fatma, T., Rattan, T., 2006.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci* : An evaluation of three different screening methods. *Microbiologics, Inc.* 24(1) : 25-29.
- **Matsuno, T., 1992.** Isolation and characterization of the tumoricidal substances from Brazilian propolis. *Honeybee Sci* 13,49-54 (in Japanese), *Apic Abstr* (1993) 44,287.
- **Meda, A., Lamien C.E., Marco, R., 2005.** determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *food chemistry*, 2005, vol.91 n°3, p.571-577.
- **Mizuno, M., Linuma, M., et Kato, H., 1987.** Useful ingredients and biological activity of propolis *fragrance journal*, 15(2) : 20-28.
- **Morsa, S., 2000.** Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Revus: Iberoam Micol N° 20.* Edition: *Revista iberoamericana de Micologia APDO* pp: 54-57-64.
- **Mustsaer, m., blitterswijk, L., Waerdt., v., 2005.** Produit de l'apiculture, propriétés.
- **Mlagan, V., Sulimanovic, D., 1982.** Action of propolis solutions on bacillus larvae, *apiacta*, 17:16-20.
- **Nacer, C.S., 1994.** Influence d'un biotope sur le rendement et la qualité d'un miel, mémoire de fin d'études, université de Mostaganem, P.14-15, 23-25.
- **Nagy, M., 1989.** Constituents of propolis Czechoslovak origin. *V. chemical papers*, 42(5) : 691-696.
- **Nanda, V., Sarkar, B., Sharma, H., Bawa, A., 2003.** «Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in northern India». *Journal of Food Composition and Analysis*, n° 16, p 613-619
- **Nasr, R.A., Abushady, H.M., Hussein, H.S., 2012.** Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of *Staphylococci*. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13, 269-274.

- **Neuman, D., Gotze, G., Binus, W., 1986.** Clinical study of the inhibition of plaque and gingivitis by propolis. *Stomatologie der DDR* : 677-681.
- **Nosto, A., Cellini, L., et al. 2003.** Effects of combining extract( from propolis or zingiber officinale). With clarthromycin on helicobter pylori. *Phytother Res. Mar*, 20(3) :187-90.
- **Omar, M.O.M., 1989.** Some characteristics of propolis from Upper Egypt. *Proceedings of the frouth International conference on Apiculture in Iropical climates ; cairo, Egypt, 6-10 November 1988*, 88-92.
- **Oudjet, Kahina., 2012.** «le miel, une denrée à promouvoir», *casque*. N<sup>o</sup> 00(octobre 2012), p01.
- **Ozcan, M., Arslan, D., Ceylan, D., 2006.** Effects of inverted saccharose on some properties of honey. *Food chemistry*, n<sup>o</sup> 99, p 24-29.
- **Papay, V., 1987.** Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. *Acta pharmac. Hung.*, 57 : 143-151.
- **Park, Y.K., Alenkar, S.M., Aguiar, C.L., 2002.** Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50,2502-2506.
- **Patrick, B., 1994.** aide mémoire de parasitologie 2<sup>ème</sup> édition : Flammarion Médecin Science. France. pp : 388.
- **Pelmont, J., 2005.**Biodégradation et métabolisme : les bactéries pour les technologies de l'environnement. France : EDP Sciences. P798.
- **Peter, H ., Yalla, I., Gudasz, C., Romani M.M., Sabater, S., Tranvik L.J., 2011.**Multifunctionality and Diversity in Bacterial biofilms *.PLoS One.* ; 6 (8) : e23225.
- **Pham-Delegue M-H., 1999.** Les abeilles. Gêneve, minerva, 1999,206 p.
- **Phillips, P.L., Fletcher, J., Schultz, G.S., 2011.**Biofilm made easy. *Wounds International*. 1(3).
- **Piel-Desruisseaux, J., 1965.**organization du travail d'extraction du miel. *Ann. Abeille*, 8, (3), 205-263.
- **Polus, P., 2007.** récolte et conditionnement du miel de la revue l'abeille de France.
- **Popova, M., Trusheva, B., Antonova ,D., cutayar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., Tsvetkova, L., Najdenski, H., Bankova ,V., 2011.**The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta food. *Chemistry* 126 : 1431-1435.

- **Pratt, L.A., Kolter, R., 1999.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: rôle of flagella, mobility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiology*. 30. 285-293.
- **Ramirez Cervantes, MA., Gonzales Novelo, SA., Sauri dush, E., 2000.** Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage. *Apiacta*, 35: 162-170.
- **Raoul, A., 1992.** La route du miel : le grand livre des abeilles et de l'apiculture, Eds. Nathan.
- **Rasir, Yves., 2006.** Libre propos. Edition changé d'R. Bruxelles.10p.
- **Riemann, H., Cliver, D., 2006.** Food born infections and intoxication, 3<sup>ème</sup> édition. Elsevier.USA. P922.
- **Ross, P.B., 1990.** The effects propolis of fractions on cells in tissue culture. Mphil thesis, University of Wales College of Cardiff, UK, 193p.
- **Roux, A., Ghigo J-M., 2006.** les biofilms bactériens. *Acad. Vét. France*. 159 (3) : 261-268.
- **Sauer, K., 2003.** The genomics and proteomics of biofilm formation. *Génome Biology*. 4 :219.
- **Schweitzer, P., 2004.** «Le monde des meillats». *Revue l'abeille de France* n<sup>o</sup> 908. Laboratoire d'analyse et d'écologie apicole.p04.
- **Schweitzer, P., 2004.** la cristallisation des miels. *L'abeille de France*, n<sup>o</sup> 901, p149-157.
- **Scutt, A., Meghji, S., Cannif, J.P., Harvey, W., 1987.** Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucosa fibrosis. *Experientia*, 43 : 391-393.
- **Shin, H., Hustunol, Z., 2005.** Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: an in vitro comparison. *Food research international*, n<sup>o</sup>38, p 721-728.
- **Silici, S., Kutlucas., 2005.** Chemical composition and antitaderial activity of propolis collect by three different races of honey bee in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* 99 : 69-73.
- **Silici, S., Unlu, M., Vardar-Unlu, G., 2007.** anti-bacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J Microbial Biotechnol*, 23 :1797-1803.

- **Smallffied, B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils medicinal and culinary purpose. *Corps and food Research*. Number 45, 4 p.
- **Spyridon, P., Stamations, A., Kanstantinos, K., Ioannis, P., George, M., 2009.** Biofilm and orthopedic practice: the world of microbes in a world of implant. *Orthopedic and Trauma*. Elsevier. 33(3) : 175-179.
- **Stephen, W., 1946.** The relationship of moisture content and yeast count in honey fermentation. *Scientific agriculture* 26, 285-264.
- **Tomas- barberan, F.A., Clifford, M.N., 2008.** Dietary, hydroxybenzoic and acid derivatives and their possible role in health protection. *Jsci food Agic* ; 80 :1024-32.
- **Tosi, E.Z., Edmundo, R., Ortega, M.E., Cazzolia, A.F., 2006.** Food preservative based on propolis : Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli* food chemistry : 1025-1029.
- **Uppuluri, P., Dinakaran, H., Thomas D.P., 2009.** Chautuverdi A.K. and Lopez-Ribot J.L.Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. *J Clin Microbiol* ; 47(12) :4078-4083.
- **Uzel, A., Sorkum, K., 2005.** Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research* 160 : 189-195.
- **Vardar-Unlu, G., Sibel, Silicis., Unlu, M., 2008.** Composition and vitro antimicrobial activity of populus buds and poplar-type propolis world *J Microbiol Biothechnol* 24:1011-107.
- **Vayssa, S., Bankova, Solangel., D.E, Castro., Maria, C., Marccuci., 2000.** propolis : recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31 : 3-15.
- **Vazquez-Torres, A., Balish, E., 1997.** Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61 : 170-192.
- **Viguie-Vallanet C (1998)** Traitements antifongiques en dermatologie. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, 98-906A-10, pp 1–16
- **Vorlovavr, I., Celechovska, O., 2002.** Activity of enzymes and trace element content in bee honey. *Acta vet, brno*, n<sup>o</sup> 71, p 375-378.
- **Vorwohl, G., 1964.** Die beziehung zwischen der elektrischen leitfähigkeit der honige und ihrer trachtmassigen herkunft. *Ann d'abeille* 7, p 301-309.
- **Walker ,J.T., Verran, J., Boyd, R.D, Percival, S., 2001.** Microscopy Methods to Investigate Structure of Potable Water Biofilms. *Methods in Enzymology*, 337: 243-255.

- **Wollenweber, E., Hausen, B.M., & W, Greenaway., 1990.** phénolique constituants et les propriétés sensibilisantes de la propolis, le peuplier baume de pérou, Taureau Groupe polyphenols; 15 :112.
- **White, J.W., Paient, F.W., 1962.** composition, propriettes et technologie du miel in traité de biologie de l'abeille by Chauvin, r. tome 3 les produits de la ruche 277-319.
- **White, J., 1975.** In Honey: physical characteristics of honey. E.d.E. crane Heinemann, London (1975).
- **White, J.W., 1994.** The role of hmf and diastase assays in honey quality evaluation. Bee word 75(3) pp : 104-117.
- ([www.produitsapicoles23amiel.fr](http://www.produitsapicoles23amiel.fr)).

*Annexes N° 01 : Milieu D'isolement.*

**\* Milieu Sabouraud Simple**

Néopeptone	10g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
Ph	5-5,6

**\* Milieu Sabouraud liquide**

Peptone de caséine (bovin)	5g
Peptone de viande (bovin ou porcin)	5g
Glucose	20g
Eau purifiée	1l
pH	5,7

**\* Milieu de gélose nutritive**

Peptone	6g
Extrait de levure	2g
Extrait de viande	1g
Nacl	5g
Agar	20g
pH	7,2

*Annexes N°02 : Diamètres d'inhibitions (mm)***Tableau :** Les diamètres des zones d'inhibition de 02 variétés de miel en mm.

TableauN <sup>0</sup>	Détermination de la zone d'inhibition en fonction des différentes concentrations des miels <i>Candida albicans</i>		
	Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions en (mm)		
Méthode	Puits		
Concentrations	Pur	50%	25%
Ms	10	10.5	9.5
Ms +P	10.5	9.5	6
ML	12	12	9
ML +P	10	6	8

**Ms :** Miel de sidr.

**ML :** Miel de loubino.

**Ms+P :** Miel de sidr+Propolis.

**ML+P :** Miel de loubino+Propolis

*Annexes N°03 : observation macroscopique des zones d'inhibitions**C. albicans pure**C. albicans 25%**C. albicans50%*

**Figure N°21 :** observation macroscopique des zones d'inhibitions chez *candida albicans* après 48 heures d'incubation.

*Annexes N° 0 4 : Technique de spectrophotomètre (pourcentage d'inhibition)*

**Tableau N°13 :** Déterminer le pourcentage d'inhibitions de miel de différentes de deux variétés de miel en (nm)

<b>Miels</b>	<b>t<sub>0</sub></b>	<b>t<sub>48</sub></b>
<b>Miel pur (sidr)</b>	0.373	0.340
<b>Ms+p</b>	1.69	0.274
<b>Ms 50%</b>	0.650	0.169
<b>Ms 25%</b>	0.104	0.198
<b>Ms50%+p</b>	0.937	0.686
<b>Ms25%+p</b>	0.293	0.716
<b>Miel pur (Loubino)</b>	0.265	0.291
<b>ML+p</b>	1.150	0.362
<b>ML50%</b>	0.416	0.944
<b>ML25%</b>	0.117	0.636
<b>ML50%+p</b>	0.521	0.236
<b>ML25%+p</b>	0.343	0.185
<b>Ms+ch</b>	0.301	0.397
<b>ML+ch</b>	0.359	0.377