

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Dr. TAHER MOULAY SAIDA
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOTOXICOLOGIE, PHARMACOGNOSIE ET VALORISATION
BIOLOGIQUE DES PLANTES



**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en
Microbiologie**

Option : Microbiologie appliquée

Présenté Par :

- **Djedid Fatima Zohra**
- **Boubakiri Ilham**

Thème

Contribution à l'étude comparative (*in vitro* et *in vivo*) de l'effet antimicrobien, cicatrisant et synergique du miel et jus de citron

Soutenu le : 05/06/ 2016 devant la commission d'examen :

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| ➤ Mr. Benregueig. M | M.C.B (U de Saida) Président. |
| ➤ Mme. Faress.S | M.A.A (U de Saida) Examinatrice. |
| ➤ Mr. Amamm.A | M.A.A (U de Saida) Encadreur. |

Année Universitaire : 2015- 2016



Remerciement

Nous tenons tout d'abord à exprimer un Énorme remerciement

*A notre Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage,
La force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce
travail.*

*Nous remercions également tous les membres du jury d'avoir
accepté D'évaluer ce modeste travail.*

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadreur

Dr.Ammam

*Nous remercions aussi monsieur ingénieur de laboratoire pour
son aide et sa disponibilité tout au cours de la durée de manipulation*

Pour la confiance et le soutien qu'il nous a apporté tout au long de ce travail.

Pour son aide ces conseils et sa disponibilité et ses encouragements.

Nous remercions les plus sincères et toute

Notre reconnaissance

A l'ensemble des enseignants qui nous ont donné la

Main durant les années de formation



Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

- + A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*
- + A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*
- + A ma chère soeur et mes frères : Noureddine, Hachemi, youcef et kheira.*
- + A Fatima Zohra : Merci d'avoir été mon binôme pendant nos années d'études et de m'avoir demandé d'être ton témoin.*
- + Spécial dédicace à mon très chère ami Abdel Hafid.*

+ A mes amis : Samira, Fatiha, Rima, Abdel Hakim sans oublier tous mes amis de la promotion Master 2 Microbiologie Appliqué vous étiez ma seconde famille on a passé des moments inoubliable. J'exprime le respect que j'ai toujours eu pour vous.

+ A toutes les personnes qui m'ont encouragé et se sont donnés la peine de me soutenir durant cette formation.

+ A mes chers enseignants sans aucune exception.



Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

✚ *A la lumière de mes yeux, Je dédie ce travail à mon chère père qui n'est plus dans l'existence et que je souhaite que je pourrais être présent avec moi et soutiens-moi.*

✚ *Ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

✚ *A ma grande mère Paternelle qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

✚ *A mes chères sœurs : Lila, Soumia ,Nadjet.*

✚ *et mes frères : Mokhtar, Ali.*

✚ *A Ilham : Merci d'avoir été mon binôme pendant nos années d'études et de m'avoir demandé d'être ton témoin.*

✚ *A mes chères oncles : Mohamed, Lakhder ,Kadirou et mes tantes : Fatima, Kheira, Kenza.*

✚ *A ma cousine : Naima.*

✚ *Spécial dédicace à mon marie Attou et remercie de votre confiance.*

✚ *A ma petite fleur : Bouchera.*

✚ *A mes amis : Fatiha, Ibtissem , karima, Kheira sans oublier tous mes amis de la promotion Master 2 Microbiologie Appliqué vous étiez ma seconde famille on a passé des moments inoubliable. J'exprime le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

✚ *A toutes les personnes qui m'ont encouragé et se sont donnés la peine de me soutenir durant cette formation.*

✚ *A mes chers enseignants sans aucune exception.*



Résumé

Le miel élaboré par les abeilles est constitué de sucre et l'eau essentiellement. Il porte d'autres substances d'origine végétale et animale qui font de lui un produit complexe hétérogène et variable au cours du temps. Il présente de propriété cicatrisante. Beaucoup des études démontrées que le miel à un effet inhibiteur sur plusieurs bactéries pathogènes. Le but de cette étude est de démontré l'activité antibactérienne de miel et jus de citron sur les souches *E.coli* et *Staphylococcus aureus in vivo* et *in vitro*. *In vitro* démontre la concentration minimale inhibitrice et synergique (miel et jus de citron) et *in vivo* l'application de jus de citron et le miel sur la plaie de lapin pour tester effet antibactérien et cicatrisant. L'activité antibactérienne sur les deux souches de bactéries à été déterminée par mélange des concentrations variable à la gélose Muller Hinton qui inoculé par les espèces bactériennes.

Le miel à été trouvé pour être efficace à la concentration 30% pour les deux souches testées. La concentration minimale inhibitrice de jus du citron 4% La concentration minimale inhibitrice synergique des deux variétés de miel testé vis-à-vis *E.coli* est de [19% (E1) +1% de jus de citron] et [18% (E2) +2% de jus de citron] pour des valeurs de concentrations minimales inhibitrices obtenues avec le miel seul est 30% pour E1 et E2. Pour *Staphylococcus aureus* la concentration minimale synergique se situe aussi entre [19% (E1) +1% de jus de citron] et [18% (E2) +2% de jus de citron] pour des concentrations minimales inhibitrices de 30% (E1 et E2).

Cette étude justifie l'utilisation du miel et jus de citron on séparément et en mélange comme une médecine alternative par la population dans le traitement de l'infection bacterien. *In vivo* : le jus de citron est très efficace que le miel pour le traitement des maladies infectieuses. Par contre le miel permet une cicatrisation plus rapide.

Mot de clé : miel, antibactérienne, jus de citron, *in vivo*, *in vitro*, cicatrisant, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*

Abstract:

Honey is made by bees is sugar and water basically. It covers other plant and animal substances that make him a heterogeneous complex product and variable over time. It presents healing property. Many studies demonstrated that honey to an inhibitory effect on several pathogenic bacteria. The purpose of this study is to demonstrate the antibacterial activity *in vivo* and *in vitro* on *E.coli* and *Staphylococcus aureus* .Demonstrates *in vitro* inhibitory and synergistic minimum concentration (honey and lemon juice) and *in vivo* application of lemon juice and honey on the wound to test antibacterial and healing effect. The activated Antibacterial sweets both strains of bacteria *E.coli* and *Staphylococcus aureus* was determined by mixed variable concentrations in the agar which Muller Hinton inoculated with the bacterial species.

Honey has been found to be effective at a concentration 30% for both strains tested. The minimum inhibitory concentration of lemon juice 4% the synergistic minimum inhibitory concentration of the two varieties of honey tested vis-a-vis *E. coli* is [19% (E1) + 1% lemon juice] and [18% (E2) + 2% lemon juice] for minimum inhibitory concentration values obtained with the only honey is 30% for E1 and E2.

For *Staphylococcus aureus* synergistic minimum concentration is also between [19% (E1) + 1% lemon juice] and [18% (E2) + 2% lemon juice] for minimum inhibitory concentration 30% (E1 and E2).

This study justifies the use of honey and lemon juice is separately and mixed as an alternative medicine by the population in the treatment of infections in. *In vivo*: lemon juice is very effective as honey for treatment of bacterial infection. As against the honey allows faster healing.

Key word: honey, antibacterial, lemon juice, *in vivo*, *in vitro*, healing, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*

المخلص:

يحتوي العسل على مواد من أصل نباتي و حيواني التي تجعل منه منتج معقد غير متجانس ومتغير مع مرور الوقت. فإنه يمتلك خصائص تضميد للجروح. و أثبتت العديد من الدراسات أن للعسل تأثير كايح بشكل خاص على عدة أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض. العسل الذي أفرزه النحل مكون من السكر والماء في الأساس. والغرض من هذه الدراسة هو للتدليل على النشاط المضاد للبكتيريا إ.كولي ، المكورات العنقودية الذهبية. في الجسم الحي و في المختبر. المختبر يظهر التركيز الأدنى المثبط و المساعد (العسل وعصير الليمون) وفي تطبيق الجسم الحي تطبيق عصير الليمون والعسل على الجرح لاختبار التأثير المضاد للجراثيم و تضميد الجروح. النشاط المضاد للجراثيم تم تفعيله على حد سواء لسلاطات من البكتيريا تم تحديدها من قبل تركيزات متغيرة مختلطة في جيلاتين Muller Hinton الذي تم تطعيمه بأنواع بكتيرية. تم العثور بأن العسل فعالا عند تركيز 30% لكل من السلاطات التي تم اختبارها. الحد الأدنى للتركيز المثبط من عصير الليمون 4% عند ، الحد الأدنى للتركيز المثبط المساعد لنوعي العسل جربت وجها لوجه مع إ.كولي هي: [19% العينة 1 + 1 % عصير الليمون] و [18% العينة 2 + 2 % عصير الليمون] لقيم التركيز الدنيا المثبطة التي تم الحصول عليها مع العسل لوحده هي 30% للعينتين 1 و 2. بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية التركيز الأدنى المساعد هو أيضا بين : [19% العينة 1 + 1 % عصير الليمون] و [18% العينة 2 + 2 % عصير الليمون] للتراكيز الدنيا المثبطة 30% للعينتين 1 و 2 . هذه الدراسة اتبرر استخدام العسل وعصير الليمون هي بشكل منفصل و مختلط باعتباراه الطب البديل من قبل السكان. في الجسم الحي: عصير الليمون فعال جدا أكثر من العسل لعلاج الأمراض المعدية. و بالمقابل العسل يسمح بشفاء أسرع وأفضل لجروح.

الكلمات المفتاحية : العسل، مضاد للجراثيم، عصير الليمون، في الجسم الحي، في المختبر، تضميد الجراح، إ.كولي ، المكورات العنقودية الذهبية.

Liste des figures

<i>Figure 01</i> : Origine du miel (PROST, 1987).....	05
<i>Figure 02</i> : Composition moyenne du miel (BRUNEAU, 2002).....	07
<i>Figure 03</i> : Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd, 1995).....	18
<i>Figure 04</i> : Photographie d'un orange (RAYNAUD, 2008).....	19
<i>Figure 05</i> : Orange Sanguinelle (JACQEMOND et al, 2009).....	19
<i>Figure 06</i> : Limes douces en Saumur sur un marché d'Afrique du Nord (JACQEMOND et al, 2009).....	20
<i>Figure 07</i> : Les différents types de pamplemousse (VIRBEL-ALONSO, 2011).....	21
<i>Figure 08</i> : Clémentine commune (JACQEMOND et al, 2009).....	21
<i>Figure 09</i> : Kumquat Marumi (JACQEMOND et al, 2009).....	22
<i>Figure 10</i> : Citron, leurs feuilles et leur Coupe transversale (Hendrix et Redd, 1995).....	25
<i>Figure 11</i> : Différentes parties du corps du lapin (BARONE et al. 1973).....	33
<i>Figure 12</i> : Schéma des différents éléments du tube digestif du lapin (LEBAS et al. 1996).....	34
<i>Figure 13</i> : Schéma général de fonctionnement de la digestion chez le lapin (LEBAS et al. (1996)).....	34
<i>Figure 14</i> : <i>Escherichia Coli</i> . (Body, 2004).....	40
<i>Figure 15</i> : <i>Staphylococcus Aureus</i> (Body, 2004).....	43
<i>Figure16</i> : les échantillons du miel (E2, E1).....	47
<i>Figure17</i> : l'échantillon du citron.....	48
<i>Figure 18</i> : un réfractomètre pour mesurer la teneur en eau.....	50
<i>Figure19</i> : un four à moufle contient des capsules pour mesurer la teneur en cendre.....	50
<i>Figure20</i> : mesuré l'acidité libre du miel par PH mètre.....	51
<i>Figure21</i> : détermination de la conductivité mètre d'une solution du miel.....	53
<i>Figure22</i> : les cages grillagées du l'animalerie du Université Dr Moulay Tahar de Ain El Hdjar Saida. (A : cage collective, B : cage individuelle).....	61
<i>Figure23</i> : phénotype de lapins de population locale (A : robe fauve, B : robe noir).....	61
<i>Figure24</i> : les étapes de l'intervention chirurgicale.....	63
<i>Figure25</i> : La pesée du lapin par une balance électrique.....	63
<i>Figure26</i> : mesure du diamètre de la plaie par une règle.....	63
<i>Figure27</i> : prélèvement par écouvillonnage.....	64

Figure28 : (a,b) le traitement des plaie par miel.....	65
Figure29 : traitement de la plaie par jus de citron.....	66
Figure 30: Représentation graphique de la teneur en eau des différents échantillons du miel.....	67
Figure31: Représentation graphique de la densité des différents échantillons du miel.....	68
Figure32: Représentation graphique du pH des différents échantillons du miel.....	69
Figure33: Représentation graphique de l'acidité des différents échantillons du miel.....	70
Figure 34: Représentation graphique de la conductibilité des différents échantillons du miel.....	71
Figure 35 : Représentation graphique du taux de des différents échantillons du miel.....	72
Figure 36 : coloration de Gram $\times 100$ <i>St.aureus</i>.....	75
Figure 37 : Coloration de Gram $\times 100$ d'<i>E.coli</i>.....	75
Figure 38 : bulles visibles sur la diapositive indiquent catalase - positif pour <i>E. coli</i>.....	75
Figure 39 : bulles visibles sur la diapositive indiquent catalase - positif pour <i>S. aureus</i>.....	76
Figure 40 : <i>E. coli</i> oxydase négatif.....	76
Figure 41 : <i>Staphylococcus aureus</i> oxydase négative.....	76
Figure 42 : fermentation du lactose avec accompagné d'un virage du milieu au jaune et un dégagement gazeux.....	77
Figure 43 : coagulation de plasma dans le test staphylocagulase.....	77
Figure 44 : CMI des deux échantillons de miel (E1, E2) vis-à-vis d'<i>E. Coli</i>.....	79
Figure 45 : La CMI du miel des 2 échantillons E1, E2 vis-à-vis <i>St aureus</i>.....	80
Figure 46 : CMI de jus de citron vis-à-vis <i>E. coli</i>.....	83
Figure 47 : CMI de jus de citron vis-à-vis <i>St. aureus</i>.....	83
Figure 48 : CMIS du mélange (des deux échantillons de miel + le Jus de citron) vis-à-vis D'<i>E. Coli</i>.....	87
Figure 49 : CMIS du mélange (des deux échantillons de miel + le jus de citron) vis-à-vis de <i>S. aureus</i>.....	88
Figure 50 : poids des lapins pendant l'expérimentation.....	90
Figure 51 : les diamètres des plaïs des lapins pendant l'expérimentation.....	91
Figure 52 : Lapin 1 traité par miel.....	91
Figure 53 : lapin 2 traité par le miel.....	92
Figure 54 : lapin 3 traité par jus de citron.....	92
Figure 55 : lapin 4 traité par jus de citron.....	92
Figure 56 : lapin (témoin) sans traitement.....	93

Figure 57 : Effet inhibiteur de jus de citron et miel vis-à-vis *E. coli* et *S.aureus*.....95

Figure 58 : inhibition de *St. aureus* au cours le traitement par le miel.....95

Figure 59 : inhibition d'*E. coli* au cours le traitement par le miel.....96

Figure 60: inhibition de *St. aureus* au cours le traitement par le jus de citron.....96

Figure 61 : inhibition d'*E. coli* au cours le traitement par le jus de citron.....96

Liste des tableaux

Tableau 01 : Température de stockage et détérioration des enzymes de miel (Bogdanov, 1999).....	13
Tableau 02 : Composition de quelques fruits des agrumes (pour 100 g) (Vierling, 2008)....	23
Tableau 03 : Concentration des principaux acides organiques dans le jus de citron (Kristina, 2008).....	26
Tableau 04 : Concentration des principaux glucides dans le jus de citron (Citrech.it, 2014).....	26
Tableau 05 : Concentration des principaux acides aminés dans le jus de citron (Citrech.it, 2014).....	27
Tableau 06 : Concentration des principaux sels minéraux dans le citron (Somayeh, 2012 et Okwi et Emenike, 2006).....	28
Tableau 07 : Concentration des principaux Vitamine dans le jus de citron (Okwi et Emenike, 2006).....	28
Tableau 08 : Concentration des principaux flavonoïdes dans le jus de citron (Caristi ; 2003 _ Waii et al, 2000).....	29
Tableau 09 : Valeur nutritive pour 100 g de citron cru sans peau (Ali Karabulut et al, 2007).....	30
Tableau 10 : Les pathologies dominantes du lapin (KPODEKON et DJAGO, 2000), (BOUCHEUR et NOUAÏLE, 2002).....	36
Tableau 11 : Quelques facteurs de croissance et de toxino-génèse chez les <i>Staphylococcus aureus</i> (PENGOV et JURCEVIC, 2003).....	44
Tableau 12 : Echantillons de miels.....	47
Tableau 13 : Matériel et produits utilisés.....	48
Tableau14 : Volumes de miel et de gélose incorporés.....	57
Tableau 15 : Les volumes de jus de citron et la gélose M.H.....	58
Tableau 16 : Gammes de mélange (miel, jus de citron) et Gélose pour <i>s.aureus</i>	59
Tableau17 : Gammes de mélange (miel, jus de citron) et Gélose pour <i>E. coli</i>	60
Tableau18 : description des lapins	61
Tableau 19 : Teneur en eau correspondant à chaque indice de réfraction de chaque échantillon du miel.....	67
Tableau 20 : La densité des différents échantillons du miel.....	68

Tableau 21 : Valeurs du pH des miels étudiés.....	69
Tableau 22 : Valeurs d'acidité des deux échantillons du miel.....	70
Tableau 23 : La conductibilité électrique des miels étudiés.....	71
Tableau 24 : Valeurs du teneur en cendre des deux échantillons du miel.....	72
Tableau 25 : Teneur en eau correspondant au jus de citron.....	73
Tableau 26 : Densité relative correspondant au jus de citron.....	73
Tableau 27 : Acidité correspondant au jus de citron.....	74
Tableau 28 : pH correspondant au jus de citron.....	74
Tableau 29 : résultats de l'identification biochimique pour les deux souches.....	74
Tableau 30 : Valeurs en ml de la CMI des deux échantillons du miel vis-à-vis <i>E. coli</i>	78
Tableau 31 : Valeurs en % de la CMI des deux échantillons du miel vis-à-vis <i>E. coli</i>	78
Tableau 32 : valeurs en ml de la CMI des deux échantillons du miel vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Tableau 33 : valeurs en % de la CMI des quatre échantillons du miel vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Tableau 34 : Valeurs en ml de la CMI du jus de citron vis-à-vis d' <i>E. coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Tableau 35 : Valeurs en % de la CMI du jus de citron vis-à-vis d' <i>E. coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Tableau 36 : Gammes de mélange en ml (miel, jus de citron) et Gélose pour <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	85
Tableau 37 : Gammes de mélange en % (miel, jus de citron) et Gélose pour <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i>	86
Tableau 38 : dénombrement des colonies après traitement vis-à-vis témoin.....	94

Liste des abréviations

% : pourcentage.

C° : Degré Celsius.

µm : micro mètre.

A_w : *activité water*.

C : Carbone.

Ca : calcium.

CE : conductivité électrique.

cm : centimètre.

CMI : concentration minimal inhibitrice.

CMIS : concentration minimale inhibitrice synergique.

R : résistance.

S : sensible.

CO₂ : dioxyde de carbone.

E : échantillon.

E. Coli : *Escherichia coli*.

EMB : gélose éosine bleu de méthylène.

G : gramme.

GN : gélose nutritif.

H : heure.

H : Hydrogène.

H₂O : eau.

H₂O₂ : eau oxygéné.

HMF : hydroxy methyl furfural.

J : jour.

K cal : kilocalorie.

Kg : kilogramme.

KOH : Hydroxyde de Potassium.

L : litre.

M.H : Muller Hinton.

Méq : Milliéquivalent.

Mg : magnésium.

Mmol : milli mole.

mS : millièmes.

Na Cl : Chlore de Sodium.

Nm : nanomètre.

O : Oxygène.

PH : potentiel d'hydrogène.

S : seconde.

St. aureus : *Staphylococcus aureus*.

TIA : toxi infection alimentaire.

UFC : Unité Formant Colonie.

V : volume.

VRBL : Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre.

Bcpl : Bouillon lactosé au bromocresol pourpre.

Ox : Oxydase.

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01

Première partie : Recherches bibliographiques

Chapitre I : Le miel

1.1. Définition.....	03
1.2. Origine du miel	03
1.2.1. Origine direct.....	03
1.2.2. Origine indirecte.....	04
1.2.3. Composition du miellat.....	04
1.3. Formation du miel.....	05
1.3.1. Fabrication du miel par les abeilles.....	05
1.3.2. Transformation chimique.....	05
1.4. Types de miel.....	06
1.5. Composition chimique du miel.....	06
1.5.1. Eléments majeurs.....	07
1.5.1.1. Hydrate de carbone.....	07
1.5.1.2. Eau.....	07
1.5.2. Eléments mineurs.....	07
1.5.2.1. Les acides.....	07
1.5.2.2. Les acides aminés.....	07
1.5.2.3. Les enzymes.....	08
1.5.2.4. L'hydroxy methyl furfural (HMF).....	08
1.5.2.5. Les lipides.....	08

1.5.2.6. Les sels minéraux et les vitamines.....	08
1.5.2.7. Les substances photochimiques.....	09
1.5.2.8. Les micro-organismes.....	09
1.6. Caractéristiques du miel.....	09
1.6.1. Caractéristiques physico-chimiques	09
1.6.1.1. Densité.....	09
1.6.1.2. Viscosité.....	09
1.6.1.3. Activité de l'eau.....	10
1.6.1.4. pH.....	10
1.6.1.5. Abaissement du point de congélation.....	10
1.6.1.6. Conductivité électrique.....	10
1.6.1.7. Indice de réfraction	11
1.6.1.8. Hygroscopicité	11
1.6.2. Caractéristiques nutritionnelles.....	11
1.6.3. Caractéristiques organoleptiques.....	11
1.6.3.1. Cristallisation	11
1.6.3.2. Couleur.....	12
1.6.3.3. Odeur et goût.....	12
1.7. Miels toxiques.....	12
1.8. Altération.....	13
1.8.1. Effet de vieillissement.....	13
1.8.2. Effet de fermentation.....	13
1.8.3. Effet de la température.....	13
1.8.4. Effet de la lumière.....	13
1.9. Effet antibactérien du miel.....	14
1.10. Mécanismes d'action de l'effet antibactérien du miel.....	14
1.10.1. Peroxyde d'hydrogène.....	14
1.10.2. Pression osmotique.....	15
1.10.3. Acidité.....	15
1.10.4. Inhibines non peroxydes.....	15
Chapitre II : Les agrumes	
2.1. Les agrumes.....	16
2.1.1. Historique de la culture des agrumes.....	16

2.1.2. Définition.....	16
2.1.3. Systématique.....	17
2.1.4. Caractéristiques des agrumes.....	17
2.1.5. Espèces et variétés.....	18
2.1.6. Importance des agrumes.....	23
2.1.6.1. Valeur économique.....	23
2.1.6.2. Valeur alimentaire.....	23
2.2. Citrus (<i>Citrus limon</i>).....	24
2.2.1. Définition	24
2.2.2. Description botanique.....	24
2.2.3. Classification et variété.....	24
2.2.4. Structure de fruits.....	25
2.2.5. Composition chimique.....	25
2.2.5.1. Les acides organiques.....	26
2.2.5.2. Les glucides.....	26
2.2.5.3. Composés azotés.....	27
2.2.5.4. Lipides.....	27
2.2.5.5. Composition inorganique.....	28
2.2.5.6. Les vitamines	28
2.2.5.7. Caroténoïdes.....	28
2.2.5.8. Limonoïdes.....	29
2.2.5.9. Flavonoïdes.....	29
2.2.6. Propriétés nutritionnelles et thérapeutiques.....	29
2.2.6.1. Nutritionnelles.....	30
2.2.6.2. Thérapeutique	30
2.2.6.2.1. Propriété antibactériennes.....	30
2.2.6.2.2. Propriété inflammatoire	31
2.2.6.2.3. Propriétés anti cancers	31
2.2.6.2.4. Autres propriétés thérapeutiques.....	31

Chapitre III : Généralité sur les lapins

3.1. Importance du lapin.....	32
3.1.1. Place du lapin dans l'alimentation de l'homme.....	32
3.1.2. Importance socio-économique.....	32

3.1.3. Aperçu sur la biologie du lapin.....	32
3.1.3.1. Taxonomie du lapin.....	32
3.1.3.2. Extérieur du corps et morphologie.....	32
3.1.3.3. Comportement alimentaire et alimentation du lapin.....	33
3.1.3.4. Comportement alimentaire.....	33
3.1.3.5. Alimentation en eau et en aliment.....	34
3.1.3.6. Habitat.....	35
3.1.3.7. La reproduction.....	35
3.1.4. Les pathologies dominantes du lapin.....	36

Chapitre IV : Biologie d'*E. coli* et *St.aureus*

4.1. Biologie d' <i>Escherichia coli</i>	38
4.1.1. Généralités.....	38
4.1.2. Classification.....	38
4.1.3. Habitat et écologie.....	39
4.1.4. Culture.....	39
4.1.5. Morphologie.....	39
4.1.6. Besoins nutritifs.....	40
4.1.7. La croissance.....	40
4.1.8. Pouvoir infectieux d' <i>E. Coli</i>	40
4.1.8.1. Infection intestinale.....	41
4.1.8.2. Infection extra intestinale.....	41
4.1.8.2.1. Infection urinaire.....	41
4.1.8.2.2. Septicémies.....	42
4.1.8.2.3. Méningites.....	42
4.1.8.3. Résistance aux antibiotiques.....	42
4.2. Biologie de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
4.2.1. Généralités.....	42
4.2.2. Classification.....	43
4.2.3. Habitat et écologie.....	43
4.2.4. Physiologie.....	44
4.2.4.1. Type respiratoire.....	44
4.2.4.2. Besoins nutritifs et facteurs de croissance.....	44
4.2.5. Pathologie du <i>Staphylococcus aureus</i>	45
4.2.5.1. Les infections digestives à <i>Staphylococcus aureus</i>	45

4.2.5.2. Syndrome <i>Staphylococcus</i> de la peau ébouillantée.....	45
4.2.5.3. Les <i>Staphylococcus</i> cutanées, sous-cutanées et muqueuses.....	45
4.2.5.4. Syndrome du choc toxique	45
4.2.5.5. Intoxication staphylococcique.....	46
4.2.6. La résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques.....	46

Deuxième partie : Etudes expérimentales

Chapitre V : Matériels et méthodes

1. Matériel et méthode	47
1.1. Déroulement de l'expérimentation.....	47
1.2. Echantillon du miel.....	47
1.3. Citron	47
1.4. Les microorganismes utilisés	48
2. Matériels et appareillages utilisé	48
3. Analyse physico-chimique du miel	49
3.1. La teneur en eau	49
3.2. La teneur en cendre	50
3.3. Mesure de la densité relative.....	51
3.4. pH	51
3.5. Acidité libre.....	52
3.6. Conductivité électrique	52
4. Analyse physico-chimique du jus de citron	53
4.1. Mesure de l'indice de réfraction.....	53
4.2. Mesure de la densité relative à 20 °C.....	53
4.3. Détermination du pH.....	53
4.4. Détermination de l'acidité libre.....	53
5. Teste de confirmation de souches	54
5.1. Examen macroscopique.....	54
5.2. Examen microscopique.....	54
5.3. Coloration de Gram.....	55
6. Test biochimique	55
6.1. Catalase	55
6.2. Oxydase	55
6.3. Fermentation du lactose.....	56

6.4. Staphylocoagulase.....	56
7. Conservation des souches.....	56
8. Préparation de l'inoculum	56
9. Préparation de la suspension bactérienne.....	57
10. Etude de l'activité antibactérienne	57
10.1. Etude de l'activité antibactérienne du miel Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	57
10.2. Etude de l'activité antibactérienne de citron Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	58
10.3. Préparation d'un milieu à base de miel, jus de citron et de gélose Muller Hinton.....	58
11. <i>In vivo</i>	60
11.1. Déroulement des essais.....	60
11.2. Site de l'élevage.....	60
11.3. Condition d'élevage	61
11.3.1. les animaux	61
11.3.2. L'aliment	62
11.3.3. Hygiène et prophylaxie.....	62
11.4. Contrôles effectués	62
11.5. méthode chirurgical	62
11.6. Paramètres études	63
11.6.1. Le poids vif (g)	63
11.6.2. Le diamètre de la plaie.....	63
11.6.3. Méthode de dénombrement des colonies	64
11.6.4. Dénombrement des colonies	64
11.7. Traitement des plaies	65
11.7.1. Traitement par miel	65
11.7.2. Traitement par jus citron	65
11.7.3. Témoin	66

Chapitre VI : Résultats et discussion

2. Résultats et discussion.....	67
2.1. Analyses physico-chimiques.....	67
2.1.1. Teneur en eau.....	67
2.1.2. La densité relative.....	68

2.1.3. Le pH	69
2.1.4. L'acidité libre.....	70
2.1.5. La conductibilité électrique (CE).....	71
2.1.6. Taux de cendre	72
2.2. Citron	73
2.2.1. Teneur en eau.....	73
2.2.2. La densité relative.....	73
2.2.3. L'acidité libre.....	74
2.2.4. Le pH.....	74
2.3. Isolement et identification de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>E.coli</i>	74
2.3.1. Test d'identification biochimique.....	74
2.4. L'activité antimicrobienne.....	77
2.4.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel «CMI».....	78
2.4.1.1. CMI vis-à-vis <i>E. coli</i>	78
2.4.1.2. CMI vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i>	79
2.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice synergique du mélange (miel + jus de citron « CMIS » vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>	82
2.5. <i>In vivo</i>	89
2.5.1. Les variations du poids	89
2.5.2. Diamètres de la plaie du lapin	91
2.5.3. Dénombrement des colonies	94
Conclusion.....	99

Annexes

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Le miel est un produit naturel qui a accompagné l'homme depuis la plus haute antiquité. Le miel est une solution hautement concentrée en sucres, dont les principaux sont le fructose et le glucose. Il renferme aussi une large gamme de composés mineurs tels que les, minéraux, les protéines, les vitamines, les acides organiques, les flavonoïdes, les caroténoïdes. Plusieurs vertus sont attribuées aux miels grâce à leurs propriétés antioxydants et antimicrobiennes. Ces propriétés sont utiles pour le traitement des brûlures, des troubles gastro-intestinaux, de l'asthme, des blessures et des ulcères de peau et bien d'autres usages thérapeutiques. L'impact des maladies infectieuses ne cessent de croître dans le monde. Cela est du généralement au phénomène de l'anti bio-résistance.

Pour cette raison, des études récentes s'intéressent aux vertus thérapeutiques de certains produits naturels, sachant que ces derniers ne présentent pas généralement des effets secondaires. Le miel compte parmi ces produits les plus convoités. En raison de ses propriétés inhibitrices et thérapeutiques, de nombreuses études se sont intéressées aux propriétés thérapeutiques du miel (**Baltrusaityte et al., 2007, Badawy et al., 2004**).

Dans le but d'éviter la falsification et de conserver la qualité des miels, la commission internationale du miel, créée en 1990 a standardisé certaines méthodes d'analyses du miel (humidité, taux des sucres réducteurs, pH, acidité, conductivité électrique et HMF) (**Bogdanov, 2002**). Ces paramètres sont utilisés comme critères de qualité du miel.

Agrumes limon est une plante importante de la famille des Rutacées. Sa cultivée principalement pour ses alcaloïdes, qui ont des activités anticancéreuses et le potentiel antibactérien dans des extraits bruts de différentes parties les feuilles, tige, racine et la fleur) de citron contre les souches bactériennes cliniquement significatives ont été rapportées flavonoïdes .Citrus ont un large spectre d'activité biologique, notamment antibactérien, antifongique, antidiabétique, anticancéreuses et antivirales activités. Les flavonoïdes peuvent fonctionner comme des antioxydants directs et piègeurs de radicaux libres. Ils ont également la capacité de moduler les activités enzymatiques et inhiber la prolifération cellulaire. Chez les plantes; ils semblent jouer un rôle défensif contre l'invasion des agents pathogènes, y compris les bactéries, les champignons et les virus.

Quelquefois le traitement de certaines maladies nécessite la combinaison de deux ou plusieurs agents antibactériens. C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs principaux sont d'une part, l'évaluation de l'activité antibactérienne du miel et du citron et d'autre part, l'étude de l'effet antimicrobien combiné de ces deux produits contre deux souches bactériennes, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Dans la démarche globale de cette étude, En premier lieu un constat général sur le miel, ses caractéristiques physico-chimiques, nutritionnelles et organoleptiques, son origine, sa fabrication et ses différents types. En second lieu une description sur le citron, Description botanique, sa structure, sa composition chimique et ses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. En troisième lieu un contact général sur les lapins. Et dernièrement généralités sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Dans la partie expérimentale ; une étude basée sur les analyses physico-chimiques (miel et jus de citron), détermination la concentration minimal inhibitrice *in vivo* et *in vitro* et concentration minimal inhibitrice synergique.

Enfin, la présentation des résultats de la recherche et leurs comparaisons avec des travaux précédents.

Partie I :
Etude bibliographique

Chapitre I :
Le miel

1.1. Définition

Dans de nombreux pays, la loi fournit une définition légale du miel. Cette dernière a pour objet la protection du consommateur 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 de 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 des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche » (**Codex, 2001**).

1.2. Origine du miel

Selon **Prost (1987)**, le miel qu'il vient du nectar ou du miellat, a deux origines : directe et indirecte. (**Figure 01**)

1.2.1. Origine directe

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

➤ Composition du nectar

Le nectar est le résultat de plusieurs transformations biochimiques complexes dues au métabolisme de la plante, ces transformations sont à l'origine des différents goûts retrouvés dans les miels.

Les principaux constituants du nectar sont l'eau dont, la teneur est fortement variable de 20 à 95%, et cela selon les espèces et selon les facteurs de l'environnement (météorologiques, situation géographique,...), les sucres dont la composition est relativement fixe pour une espèce ou même pour une famille botanique donnée.

Le nectar contient aussi des acides organiques, des acides aminés, des protéines, des enzymes, des vitamines et des substances aromatiques. Ces substances sont présentes en faible quantité ne dépassent pas 1% (**Ziegler, 1968**).

Louveaux (1982), distingue trois grands groupes de plantes suivant la nature des sucres :

- ✓ Groupe de saccharose dominant.

- ✓ Groupe de saccharose en quantité égale en glucose et en fructose.
- ✓ Groupe de glucose et fructose dominant.

Le rapport glucose/fructose est généralement variable selon les espèces. Par exemple Chez le colza (*brassicaceae*), la teneur en glucose est supérieure au fructose, ce qui provoque la cristallisation rapide du miel, chez le thym (*laminaceae*), la teneur en fructose est supérieure au glucose, ce qui rend le miel liquide. Le nectar attire les abeilles qui le récoltent et le ramènent à la ruche. C'est par cette dernière pendant la collecte du nectar, que s'effectue la pollinisation des fleurs (**Gonnet, 1982**).

1.2.2. Origine indirecte

Le miellat est un produit plus complexe que le nectar faisant intervenir un intermédiaire, généralement, des insectes de la famille des Homoptères tel que les pucerons, leur pièces buccales sont disposées pour piquer et absorber les aliments liquides telle que la sève des végétaux et rejetant l'excédent de matières sucrées sous forme des gouttelettes, que les abeilles récupèrent sur les feuilles des plantes. Nous citons quelques exemples d'arbres qui hébergent les pucerons, tels que, les sapins, les Epicéas, les chênes, et aussi les plantes herbacées comme les blés... (**Vache, Gonnet, 1985**).

Les miellats représentent une ressource alimentaire importante pour les abeilles lorsqu'elles ne trouvent pas des fleurs à leur disposition. Certain auteur distinguent deux types de miellat :

Le miellat de puceron, et **le miellat végétal** qui se produit dans les journées chaudes à sécheresse prolongée séparée par des nuits relativement froides et humides, selon **Gonnet, 1985**, en conditions particulières et en absence de tous pucerons par exsudation des feuilles à travers des orifices stomatiques.

1.2.3. Composition du miellat

D'après Kloft (1968), le miellat des pucerons est composé généralement de sucres (le mélizitose, le glucose), des dextrines de gommes, de protéines et d'acides aminés, de vitamines tel que la thiamine et la biotine, de minéraux et d'acides organiques (acide nitrique et acide malique).

Maurizio cité par **Zigler (1968)**, indique que les espèces de suçant une même plante peuvent émettre chacune un miellat particulier et de composition chimique différente.

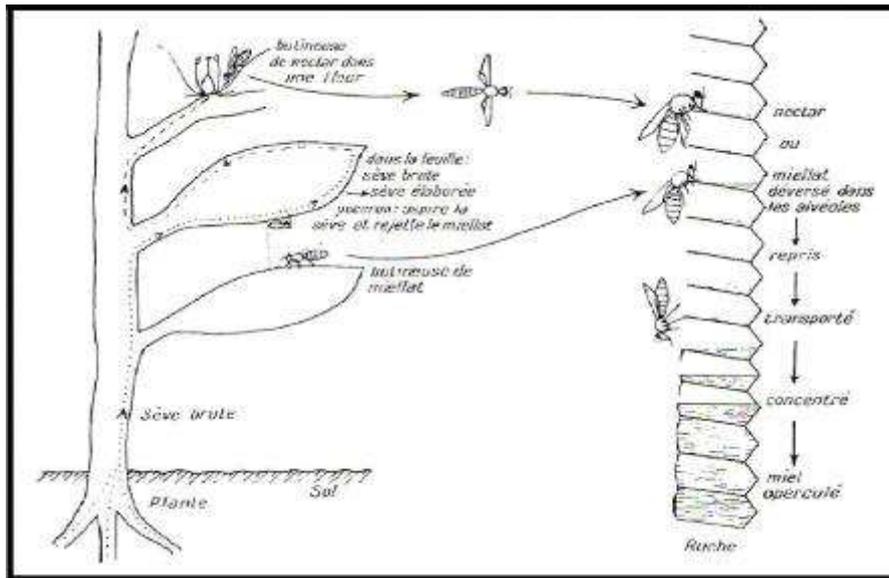


Figure 01: Origine du miel (Prost, 1987).

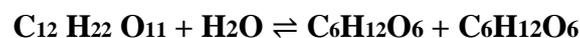
1.3. Formation du miel :

1.3.1. Fabrication du miel par les abeilles

Une butineuse effectue entre 20 et 50 voyages par jour, chacun demandant environ 15 minutes (Alvarez, 2010). Le rayon d'action moyen se situe entre 500 mètres et 2 kilomètres, d'où l'importance, en plus des conditions climatiques et de la nature du sol, de la végétation des alentours du rucher. Les abeilles butineuses ajoutent de la salive au nectar ou au miellat qu'elles recueillent, ce qui le rend fluide et surtout l'enrichit en enzymes, catalyseurs biochimiques à l'origine de la transformation des sucres dans le miel. Elles remplissent leur jabot puis transportent miellat ou nectar jusqu'à leur ruche. Là, elles distribuent aux ouvrières d'intérieur et aux mâles. Miellat et nectar passent à plusieurs reprises d'une abeille à une autre en subissant chaque fois une addition de salive qui transforme les sucres. De retour à la ruche, Déposé dans les alvéoles, le miel sera concentré, protégé; il achèvera sa transformation biochimique (Alvarez, 2010).

1.3.2. Transformation chimique

Les sucres se transforment. En particulier, le saccharose devient un mélange de glucose (dextrose) et de fructose (lévulose) sous l'action d'une enzyme, l'invertase, incorporée au nectar par la salive des abeilles. Ceci représente 90% des sucres totaux du miel (Gonnet et Vache, 1985). La transformation, conversion, s'exprime par l'équation suivante :



En effet, certains du pollen de la fleur tombe dans le nectar récolté par les abeilles est stockée dans l'estomac, elles sont régurgitées avec le nectar. En outre, certains grains de pollen

attachent souvent eux-mêmes pour les différentes parties du corps comme les jambes, les abeilles, les poils d'antenne, et aussi dans les yeux des abeilles visitent. Ce pollen sera ensuite s'emmêler dans la ruche et par conséquent pénétrer dans le miel (Alvarez, 2010).

1.4. Types de miel

Le miel varie selon l'origine florale, La détermination de l'origine géographique du miel repose sur l'analyse pollinique. (Chauvin, 1968), en général, on admet qu'un miel provient principalement d'une certaine source de nectar lorsque le pollen correspondant est au stade dominant. (Louveaux, 1970). Selon le même auteur, les pollens représentent une preuve des plus sérieuses de l'origine botanique du miel.

Donadieu (1984), signale que selon cette origine nous avons les miels mono floraux et les miels multi floraux :

• Les miels mono floraux (uni floraux)

Un miel dit mono floral est issu d'un nectar, ou d'un miellat, collecté par les abeilles sur un végétal unique et particulièrement attractif pour ces insectes. Cette définition stricte n'est vraiment avérée qu'en certains cas particuliers, notamment sur les grandes cultures. (Gonnet, 1982).

Les miels mono floraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques. (Bogdanov, 2003).

• Les miels multi floraux (poly floraux)

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

1.5. Composition chimique du miel:

Comme nous l'avons vu précédemment, le nectar à l'origine du miel possède une composition différente pour chaque plante. Cette différence, aussi infime soit-elle, se retrouve dans les miels, ce qui leur donne une saveur, une couleur ainsi qu'une évolution propre. Comme pour les vins, les récoltes de miels sont différentes selon les régions, mais aussi selon les conditions climatiques de l'année. (Wykesg, 1952).

Le miel est principalement composé de sucre (monosaccharides), plus précisément d'un mélange de glucose (31%) et de fructose (38%). Il contient également de l'eau (17%) et environ 6% de disaccharides (sucrose, etc.) (Jeremy, 2012).

- Hydrates de carbones (sous formes de sucres divers) : 79,5%
- Eau : 17%

- Divers : 3,5%

Il est évident qu'en réalité, cette composition est beaucoup plus complexe et aujourd'hui, tous les constituants sont loin d'être connus (**figure 02**).

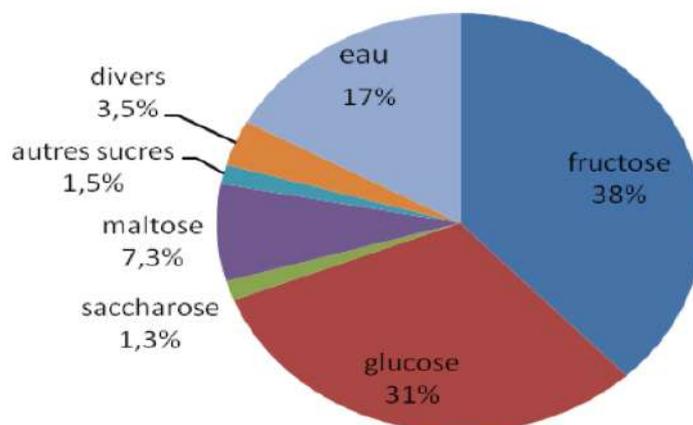


Figure 02: Composition moyenne du miel (**Bruneau, 2002**).

1.5.1. Eléments majeurs

1.5.1.1. Hydrate de carbone

Le miel se compose d'environ 80% d'hydrates de carbone (**Bogdanov et al., 2008**). Parmi ces sucres figurent le fructose et le glucose qui représentent environ 70% et que l'on trouve en quantité voisine dans les miels. La quantité de saccharose peut atteindre 7% et le maltose varie de 2 à 7% (**Khenfer et fettal, 2001**).

1.5.1.2. Eau

La teneur en eau dans le miel s'élève le plus souvent à moins de 20%. Seuls les miels avec une teneur en eau inférieure à 17% sont stables lors de la conservation et ne fermentent pas (**Ballot-Flurin, 2010**).

Au delà de 19%, le miel a tendance à fermenter dans un délai relativement court (**Rossât, 2011**).

1.5.2. Eléments mineurs

1.5.2.1. Les acides

Bien que le miel contienne moins de 1% (miel de forêt < 2%), les acides jouent néanmoins un rôle déterminant dans la formation de son goût. L'acide principal est l'acide gluconique (**Bogdanov et al, 2006**). On y trouve également une vingtaine d'acides organiques comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide oxalique, l'acide butyrique, l'acide pyroglutamique et l'acide succinique (**Ballot-Flurin, 2009**).

1.5.2.2. Les acides aminés

Les acides aminés présents dans le miel proviennent en partie de la miellée et en partie

des sécrétions des abeilles. La proline est le principal acide aminé provenant des abeilles (**Bogdanov et al., 2006**).

On trouve également les acides aminés suivants : l'alanine, arginine, glycine, leucine, isoleucine, acide aspartique, valine, histidine, lysine (**Philippe, 1999**).

1.5.2.3. Les enzymes

Parmi les nombreux enzymes contenus dans le miel ; on peut citer les plus importants : les α et β -amylases, la gluco-invertase et la gluco-oxydase. Ces enzymes facilitent la digestion des aliments. Ils proviennent principalement des abeilles (**Donadieu, 1978 ; Bogdanov et al., 2006**).

L' α -amylase et la β -amylase, diastase ou enzymes de la digestion de l'amidon, sont présents suivant l'origine du miel (**Philippe, 1999**).

L'origine de l'amylase du miel a été attribuée aux sécrétions salivaires des abeilles (**Babacan et Rand, 2007**).

L'indice diastasique à l'échelle de Schade est en général inférieur à 8 (**Caillas, 1974**). Les invertases (fructoinvertase et glucoinvertase) sont les enzymes responsables de la transformation du saccharose du nectar, en lévulose et dextrose du miel (**Philippe, 1999**).

Le glucose oxydase est d'intérêt considérable ; parce que son activité permet la production du peroxyde d'hydrogène qui stabilise non seulement le nectar en maturation contre la détérioration mais possède une action antimicrobienne (**Jeffrey et Echazarreta, 1996**).

D'autres enzymes sont également présents dans le miel, tel la catalase et la phosphatase acide (**Philippe, 1999**).

1.5.2.4. L'hydroxy methyl furfural (HMF)

C'est un produit de dégradation des sucres, apparaît seulement après la récolte du miel (**Bogdanov et al, 2009**), pas plus de 40mg par kilogramme (**Caillas, 1974**). La chaleur et l'entreposage prolongé favorisent l'accumulation d'HMF (**Marceau et al, 1994**).

La formation de HMF est plus rapide dans les miels de fleurs que dans les miels de forêts, moins acide (**Bogdanov, 2009**).

1.5.2.5. Les lipides

On a isolé dans le miel de faibles quantités de lipides, principalement l'acide palmitique et oléique, et très peu d'acide laurique, myristoleique, stéarique et linoléique (**Philippe, 1999**).

1.5.2.6. Les sels minéraux et les vitamines

Le miel contient différents sels minéraux et vitamines. Les miels de miellat sont plus

riches en sels minéraux que les miels de fleurs. Le potassium est le sel minéral le plus fortement représenté (**Bogdanov et al., 2009**).

Il contient divers éléments minéraux comme le fer, le calcium, le potassium, le phosphore (**Biri, 1999 ; Ballot-Flurin, 2010**).

Parmi les vitamines, il s'agit essentiellement de vitamine B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9) C, et accessoirement les vitamines A, D, E et K (**Huchet et al., 1996 ; Houssam et Mesbah, 2008**).

1.5.2.7. Les substances photochimiques

Les antioxydants sont les constituants principaux photochimiques du miel (**Bogdanov et al., 2009**). On distingue les antioxydants enzymatiques (catalase) et non enzymatiques (acide ascorbique, flavonoïdes et allantoides). Les flavonoïdes trouvés dans le miel sont : la pinobanksine, la chrysin, la galangine, la quercétine, la lutéoline et le kaempferol. Parmi ces composés la flavonone pinocembrine est présente en quantité élevée (**Miraglio et al., 2003 ; Downey, 2005, cité par Moussa, 2007**).

1.5.2.8. Les micro-organismes

Le miel est une solution hautement concentrée en sucre avec une pression osmotique élevée. C'est pourquoi les micro-organismes qui parviennent dans le miel ne peuvent pas s'y développer (**Bogdanov et al., 2008**).

Les microorganismes qui peuvent être trouvés dans le miel sont principalement les levures et les bactéries génératrices de spores. (**National honey board, 2005**).

1.6. Caractéristiques du miel

1.6.1. Caractéristiques physico-chimiques

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

1.6.1.1. Densité

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

1.6.1.2. Viscosité

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

rien changer à sa composition (**Donadieu, 2008**).

1.6.1.3. Activité de l'eau

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

Auparavant, la mesure de l'activité de l'eau était longue et frustrante. Les nouvelles technologies de mesure ont grandement amélioré la rapidité, la précision et la fiabilité des mesures.

L'activité de l'eau dans un produit est le rapport entre la pression de vapeur d'eau à la surface du produit et la pression de vapeur de l'eau pure (vapeur saturée) à la même température T du produit. La valeur de l'activité de l'eau varie entre 0) produit sec au point que toute l'eau est liée à l'aliment, et donc sans qualité réactive) et 1 (eau pure et sans soluté, difficile à atteindre et surtout à maintenir) (**Amrouche, 2010**).

1.6.1.4. pH

Le pH du miel varie entre 3,2 et 5,5. Il est généralement inférieur à 4 dans les miels de nectar, supérieur à 5 dans ceux de miellat (sapin = max 5,3). Les miels à pH bas (type lavande = min 3,3) se dégradent plus facilement : il faudra alors prendre un soin particulier à leur conservation (**Gonnet et Vache, 1985**).

1.6.1.5. Abaissement du point de congélation

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

1.6.1.6. Conductivité électrique

La conductivité électrique est intéressante, car elle permet de distinguer aisément des miels de miellat des fleurs, les premiers ayant une conductibilité bien plus élevée que les seconds (**Emmanuelle et al., 1996**).

Cette mesure dépend de la teneur en minéraux et de l'acidité du miel; plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée. Récemment, des données complètes relatives à la conductivité de milliers de miels commercialisés ont été publiées, les miels de nectar) à l'exception *Banksia*, *Erika*, *Eucalyptus*, *Eucryphia*, *Leptospermum*, *Melaleuca*, *Tilia*) et les mélanges du miel de nectar et miel de miellat aient une conductivité inférieure à 0,8 mS/cm et que le miel de miellat et le miel de châtaignier sont supérieurs à 0,8 ms/cm.

(Bogdanov *et al.*, 2001).

1.6.1.7. Indice de réfraction

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

1.6.1.8. Hygroscopicité

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

1.6.2. Caractéristiques nutritionnelles

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

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

1.6.3. Caractéristiques organoleptiques

1.6.3.1. Cristallisation

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

tendance à avoir une cristallisation grossière (**Bogdanov et al., 2003**). La cristallisation se fait à partir de cristaux primaires de glucose qui sont présents dès la récolte et faciles à mettre en évidence en lumière polarisée sous le microscope. La croissance de ces cristaux aboutit à la formation de 2 phases : une phase solide constituée de glucose cristallisé et une phase liquide enrichie en eau. La cristallisation est la plus rapide à la température de 14°C. Les basses températures retardent la croissance des cristaux. Les hautes températures entraînent la dissolution des cristaux qui disparaissent totalement à 78°C (**Emmanuelle et al., 1996**).

1.6.3.2. Couleur

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

1.6.3.3. Odeur et goût

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

1.7. Miels toxiques

Certains miels étaient connus autrefois pour leurs propriétés nocives dues aux espèces sur lesquelles ils avaient été butinés (**Marchenay, 1984**).

Le nectar de certaines plantes comme les Ericaceae (telles que certaines espèces de rhododendrons dans le Caucase et en Turquie) et plus rarement d'autres espèces de plantes (les Solanaceae, Compositae, Lagnonaceae, Ranunculaceae) contiennent des substances qui sont toxiques pour l'homme. La consommation de miels de ces miellées peut donc porter préjudice à la santé (**Bogdanov et al., 2009**).

Des travaux menés par **Wilson et al en 2011**, assurent que la consommation chronique du miel peut augmenter le risque de dégât hépatique.

1.8. Altération

Dans le cas d'une mauvaise conservation, le miel peut subir plusieurs altérations qui se répercutent sur sa valeur thérapeutique et biologique. Parmi les facteurs qui peuvent altérer le miel citons :

1.8.1. Effet de vieillissement

Le vieillissement du miel à la température ordinaire aboutit à une dégradation progressive qui se traduit par une perte volatile qui contribue à l'arôme du miel, une augmentation de la coloration, de l'acidité, une modification du spectre des sucres dans le sens d'un enrichissement en sucres supérieurs et d'une réduction de l'importance des hexoses, une destruction des diastases (**Chauvin, 1968**). Durant le vieillissement, il y a aussi formation d'HMF (**Phillipe, 1999**). Plus le miel est chauffé et, donc, plus il vieillit rapidement (**Remy et al., 2002**).

1.8.2. Effet de fermentation

La fermentation du miel est donc essentiellement un phénomène lié à la teneur en eau et, bien entendu, à la température et à la présence de germes susceptibles de se multiplier au sein de la masse du produit (**Chauvin, 1968**).

1.8.3. Effet de la température

La teneur d'HMF augmente en général en fonction de l'élévation de la température (**Bogdanov, 1999**). L'activité enzymatique est diminuée en fonction de la température (**Bogdanov et al., 2004**) (**Tableau 01**).

Tableau 01 : Température de stockage et détérioration des enzymes de miel (**Bogdanov, 1999**).

Température de stockage (°C)	Temps nécessaire à la formation de 40mg	Durée de demi-vie	
		Diastase	Invertase
10	10-20 années	35 années	26 années
20	2-4 années	4 années	2 années
30	0.5 - 1 année	200 jours	83 jours
40	1 - 2 mois	31 jours	9.6 jours
50	5 - 10 jours	5.4 jours	1.3 jours
60	1 - 2 jours	1 jour	4.7 heures
70	6-20 heures	5.3 heures	47 minutes

* Indice diastasique > 8 si [HMF] < 40 mg/kg ou - Indice diastasique > 3 si [HMF] < 15 mg/kg. (*Codex alimentarius, 1981*).

1.8.4. Effet de la lumière

D'après **Bogdanov et blumer, (2001)**, la chaleur et la lumière altèrent le glucose oxydase et diminuent ainsi la production d'eau oxygénée.

1.9. Effet antibactérien du miel

La première étude sur l'effet antimicrobien du miel a été rapportée par **Van Ketel en 1892**. Le concept «inhibine» a été introduit par **Dold** et ses collaborateurs en **1937** pour décrire les agents antimicrobiens (**Theunissen et al., 2001**). Selon **Molan (2001)**, le miel a un effet inhibiteur sur environ 60 espèces des bactéries comprenant les aérobies et les anaérobies, gram-positifs et gram-négatifs. Une action antifongique est aussi observée pour quelques levures et espèces de *Aspergillus* et du *Penicillium* aussi bien que tous les dermatophytes communs. Le miel peut être fongicide ou fongistatique (**Philippe, 1999**).

La capacité du miel de tuer des micro-organismes a été attribuée à son effet osmotique élevé, acidité élevée, concentration en peroxyde d'hydrogène et à sa nature phytochimique (**Mulu et al., 2004**).

1.10. Mécanismes d'action de l'effet antibactérien du miel

1.10.1. Peroxyde d'hydrogène

Adock en 1962 était le premier scientifique qui a suggéré que le peroxyde d'hydrogène est responsable de l'activité antimicrobienne du miel et qui se détruit rapidement par la lumière (**Jeffery et Echazarreta, 1996**). L'eau oxygénée (H₂O₂) est considérée comme la principale inhibine contenue dans le miel (**Philippe, 1999**).

Le peroxyde d'hydrogène est produit dans le miel par l'action du glucose oxydase produite par les abeilles et assurant ainsi l'activité antimicrobienne (**Anonyme, 1998**).

D'après **Bogdanov et blumer (2001)**, L'eau oxygénée et l'acide gluconique résultent de l'oxydation du glucose en milieu aqueux.



La catalase représente l'antagoniste du glucose oxydase car elle réduit l'eau oxygénée. La concentration de peroxyde d'hydrogène dépend donc directement de l'activité **de ces deux** enzymes (**Bogdanov et Blumer, 2001**).

Dans le miel mur, le glucose oxydase est inactive ; il contient seulement une petite quantité de peroxyde d'hydrogène insuffisante pour empêcher la croissance bactérienne (**Bogdanov, 2008**).

La dilution du miel augmente l'activité enzymatique du glucose oxydase et par conséquent la concentration de peroxyde d'hydrogène augmente (**Molan, 2000**).

Le peroxyde d'hydrogène produit dans le miel, présente des effets thérapeutiques observés dans le traitement de blessures (**Molan, 2002**).

1.10.2. Pression osmotique

Le miel de l'abeille est une solution sucrée concentrée avec une pression osmotique élevée (**Bogdanov et al., 2008**).

Quatre-vingt-deux pour cent de miel est un mélange de divers hydrates de carbone, tels que le glucose, le fructose, le maltose et le sucrose, ayant pour résultat une activité d'eau très basse qui varie entre 0.56 et 0.62. (**Theunissen et al., 2001**).

De par sa sursaturation en sucre et sa teneur en eau basse, le miel constitue un milieu défavorable pour la croissance de la plupart des microorganismes (**Molan, 2001**).

La basse activité de l'eau du miel est inhibitrice de la croissance de nombreuses levures (**Anonyme, 1998**).

Mescle et Zucca (1996) ont montré qu'une basse activité de l'eau provoque une diminution du volume cytoplasmique (plasmolyse) de la cellule et perturbe les fonctions métaboliques des germes pathogènes et inhibe totalement leur développement.

1.10.3. Acidité

Le miel est acide, son pH varie entre 3.2 et 4.5. Plus le pH diminue et plus il y a inhibition de la plupart des germes pathogènes (**Molan, 2002**).

Bogdanov (1997) a indiqué que le pH bas du miel ainsi que la forte concentration en sucres est à la base de l'effet puissant antibactérien du miel.

Molan (2002) a rapporté aussi que Pethylacétate est un acide du miel, efficace contre les bactéries et les mycètes. Les acides organiques libres jouent un rôle dans l'activité antimicrobienne du miel. Ils sont très solubles dans les membranes de la cellule et induisent des altérations dans la perméabilité cellulaire et dans la phosphorylation oxydative (**Jeffery et Echazarreta, 1996**). L'activité antimicrobienne du miel est attribuée à l'os molarité et à l'acidité élevée (**Belkacemi, 2002**).

1.10.4. Inhibines non peroxydes

La majeure partie de l'activité antimicrobienne non peroxyde du miel provient de la source du miel (nectar ou miellat) et une partie mineure est originaire de l'abeille (**Bogdanov, 1997**).

D'après **Bogdanov et Blumer (2001)** ; le rôle des inhibines non peroxyde est très important ; elles sont dans une large mesure insensibles à la chaleur, à la lumière et à la durée de stockage.

Molan (2002) a rapporté la présence de plusieurs substances non peroxydes dans le miel en faibles quantités qui contribuent significativement.

Chapitre II :
Les agrumes

2.1. Les agrumes

2.1.1. Historique de la culture des agrumes

D'après **Praloran(1971)** le problème posé par la détermination exacte du centre d'origine géographique des agrumes se complique, à cause de l'existence de certaines variétés issues d'une hybridation naturelle interspécifique dans ce groupe de plante, quoi qu'il en soit de cette incertitude relative, quant aux limites exactes du centre d'origine des agrumes il se situe principalement, dans le Sud-est Asiatique. Selon **Praloran (1971)** Tanaka admet que le centre principal couvrirait, à la bordure Sud-est de l'Himalaya, l'Assam et le Nord de la Birmanie. En fin deux centres secondaires servaient formés par la région côtière de la Chine méridionale et le Sud du Japon. Selon **Praloran (1971)** Les auteurs s'accordent pour admettre que la culture des agrumes a pris naissance en Chine et en Inde, pendant le premier millénaire avant J-C.

Ce même auteur signale que assez curieusement, l'oranger devenu à notre époque le plus important des agrumes, fut remarqué beaucoup plus tardivement que les autres espèces (limes, cédrats, etc.). A partir de ce centre primitif de l'agrumiculture, la diffusion semble d'être opérée vers le monde entier. D'après (**Jacquemond et al., 2009**) c'est lors des échanges commerciaux avec l'Asie, à partir du XI^{ème} siècle, que les génois et les portugais introduisirent dans le bassin Méditerranéen l'oranger, le bigaradier et le citronnier.

2.1.2. Définition

Selon **Benediste et Baches (2002)** le mot «Agrume» quant à lui provient du latin acrumen qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides. Ce même dernier auteur souligne que Les agrumes se distinguent par leur grande diversité de leurs familles et de leurs ordres.

D'après **Benediste et Baches (2002)** les espèces des agrumes sont de trois genres principaux du groupe citrinae dans la famille des Rutacées : Citrus (la majorité des agrumes), Fortunella (les Kumquats) et Poncirus. On peut y ajouter 2 genres moins répandus, originaires d'Océanie : Eremocitrus et Microcitrus. Le nombre d'espèces compris dans chaque genre, en particulier pour le genre Citrus, très complexe, est sujet à controverse et varie en fonction des Selon **Benediste ,et Baches (2002)** les citrons et les bigarades (oranges amères) furent vraisemblablement introduits par les Arabes, qui les répandirent à partir du VIII^{ème} siècle jusqu'en Afrique du nord et en Espagne, d'où ils gagnèrent tout le pourtour méditerranéen, grâce au gré des conquêtes et des échanges commerciaux et grâce à leurs grandes facultés d'adaptation.

2.1.3. Systématique

D'après (**Jacquemond et al., 2009**) beaucoup de travaux ont été réalisés au cours du XXème siècle afin de classer les différentes variétés et espèces, il est admis que les agrumes se répartissent en trois genres botaniques, compatibles entre eux : Poncirus, Fortunella et Citrus. Ces trois genres appartiennent à la tribu des Citreae. Les Poncirus ne produisent pas de fruits consommables, mais sont utilisés comme porte-greffe car ils confèrent certaines résistances intéressantes. Les Fortunella produisent des petits fruits qui se dégustent avec la peau. Enfin, le genre Citrus qui regroupe la plupart des espèces d'agrumes cultivés et renferme suivant les taxinomistes, entre 16 et 156 espèces.

D'après (**Praloran, 1971**) la position taxonomique des agrumes, selon **Swingle** est celle indiquée comme suite :

- **Règne** : Végétale
- **Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicotes
- **Sous classe** : Archichlomydeae
- **Ordre** : Germinale (Rutales)
- **Famille** : Rutaceae
- **Sous-famille** : Aurantioideae
- **Tribus** : Citreae
- **Sous-tribu** : Citrinae
- **Genre** : Poncirus, Fortunella et Citrus. (**Praloran, 1971**).

2.1.4. Caractéristiques des agrumes

Tous les fruits des citrus cultivés ont presque la même structure : l'écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines. Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse. La pulpe, partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers peuvent varier de 5 à 18 (**Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996**).

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes. (**Figure 03**).

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou flavedo), qui recouvre le fruit et le protège des dommages.

Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.

- Un mésocarpe (ou albedo) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.

- La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et al., 2010).

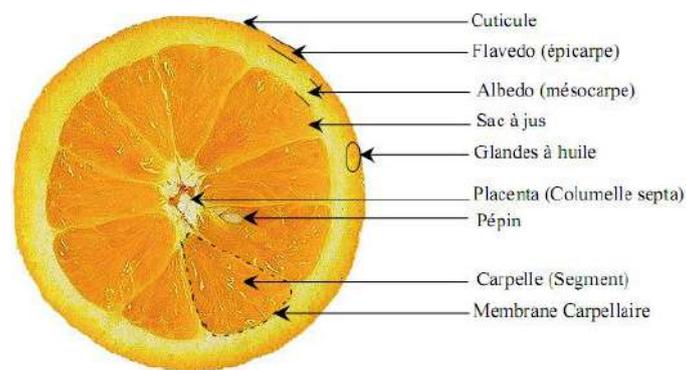


Figure 03 : Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd, 1995).

2.1.5. Espèces et variétés

D'après (Virbel-Alonso, 2011) les variétés d'agrumes sont très nombreuses. Elles sont même en augmentation car de nouveaux hybrides apparaissent régulièrement sur les marchés de l'agrumiculture des pays du bassin Méditerranéen est diversifiée, tant au niveau des variétés cultivées (oranges, mandarines, clémentines, pomelos, citrons, limes, 5 pamplemousses pour ne citer que les plus courants) reflète d'une certaine manière la richesse et la variabilité de ces arbres, du fait de l'extension de cette culture.

Il est évident que le nombre des variétés d'agrumes se révèle considérable, le choix variétal performant permet d'assurer une production importante du point de vue quantitatif comme qualitatif nous décrivons quelques variétés et quelques espèces d'agrumes (Jacqemond et al., 2009).

a) L'orange, par exemple, peut être amère (*Citrus aurantium*): c'est l'orange des origines, que l'on appelle aussi l'orange de Séville et qui sert surtout à préparer des confiseries ou de la marmelade. L'orange douce (*Citrus sinensis*) (figure04), est celle des oranges de table et des

oranges à jus. Ses variétés les plus connues sont la Navel, la Jaffa et les oranges sanguines, au jus rouge, comme la Maltaise. (Virbel-Alonso, 2011)



Figure 04 : Photographie d'un orange (Raynaud, 2008)

b) Les oranges douces

Selon (Jacqemond et al., 2009) il s'agit d'un petit groupe d'orange sans acidité, peu connu mais particulièrement apprécié dans certaines zones. Toutes ces variétés sont très proches si ce n'est la période de maturité qui diffère entre certaines sélections. Les fruits généralement ronds, de couleur orange et avec pépin.

c) Oranges sanguines

Selon (Brebion et al., 1999) leur pulpe est rouge ou rouge violacée, couleur due à l'abondance des pigments. Elle est très juteuse et acidulée, parfois de saveur légèrement Musquée. On trouve la Maltaise, la plus réputée des sanguines, en provenance de la Tunisie de Décembre à Mai, petit fruit rond d'excellente qualité gustative, la Moro, la Taroco, la Sanguinelle, originaires d'Italie (Novembre à Avril) et la Washington sanguine en provenance d'Espagne et du Maroc (Février à Avril). (Figure 05).



Figure 05 : Orange Sanguinelle (Jacqemond et al., 2009).

Le citron (*Citrus limon*) à peau plus ou moins épaisse. La variété la plus cultivée en Europe est le Verna. On trouve aussi l'Eureka, en provenance des États-Unis mais cultivé également en France, et le Santa Teresa. Le citron vert (*Citrus aurantifolia*) n'est pas un citron jaune cueilli avant maturité, mais une espèce à part entière, que l'on appelle aussi la lime. . (Virbel-Alonso, 2011)

d) Les limes acides

Selon (Brebion et al., 1999) le citron vert fut diffusé autour de la Méditerranée par les Croisades puis les Portugais l'introduisirent en Amérique. C'est principalement cette lime qui était transportée sur le navire Anglais comme remède préventif contre le scorbut. C'est pourquoi les Anglais ont été désignés par les américains par le nom de Limeys.

e) Les limes doux

Selon (Jacqemond et al., 2009) il existe plusieurs variétés de limes douces, dont les fruits sont généralement dépourvus d'acidité. Les fruits sont généralement jaunes à maturité, de forme plus ou moins allongée avec un mamelon. La lime de Palestine ou lime douce du Brésil (*Citrus limetioïdes*) est un fruit à peau lisse, de forme plutôt arrondie, et présentant quelques pépins. (Figure 06)



Figure 06 : Limes douces en Saumur sur un marché d'Afrique du Nord (Jacqemond et al., 2009)

Le pamplemousse (*Citrus grandis*) est un fruit qui peut mesurer jusqu'à 30 cm de circonférence et sert surtout à réaliser des marmelades ou parfois des jus. Il est également utilisé dans la fabrication de médicaments. Le pomélo (*Citrus x paradisi*), que l'on appelle à tort «pamplemousse» (figure 07), est beaucoup plus petit et possède une chair blanche ou rosée. Le Ruby Red et le Star Ruby sont des variétés bien connues. . (Virbel-Alonso, 2011).

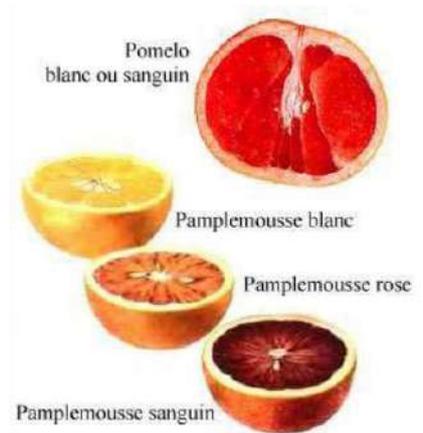


Figure 07 : Les différents types de pamplemousse (Virbel-Alonso, 2011).

La mandarine (*Citrus reticulata*) contient des pépins. Les variétés connues sont la Satsuma et la Honey, aussi appelée Tangerine (qui est un hybride). La clémentine est en revanche sans pépins, comme l'Oroval. Toutefois, des variétés dites de mandarines sans pépins font leur apparition sur les marchés. De quoi y perdre son latin! (Virbel-Alonso, 2011).

f) Clémentine commune (Synonymes Fine de Corse, Fina, Algérien)

Selon (Benedicte et Baches, 2002) originaire de Chine ou résultat d'une hybridation du père Clément obtenue en Algérie (d'où le nom). Son fruit est proche de celui de la mandarine, essentiellement cultivé sur le pourtour occidental de la Méditerranée, il nous offre ses fruits juteux de septembre à mars.

Selon (Jacqemond et al., 2009) l'arbre est de forme sphérique, présente un port dressé et une frondaison dense, de forte vigueur. La floraison est précoce, et leur productivité varie de moyenne à forte production. (Figure 08).

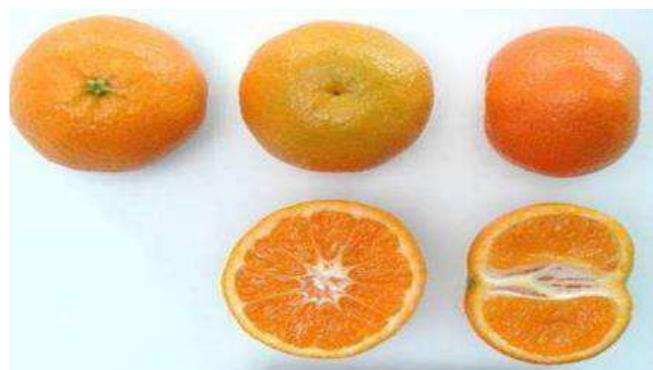


Figure 08 : Clémentine commune (Jacqemond et al., 2009)

Le kumquat (*Kumquat fortunella*) peut être rond (*Fortunella japonica*) ou ovale (*Fortunella margarita*). Mais d'autres variétés sont également représentées, comme le *Fortunella hindsii* ou le *Fortunella polyandra* en fonction de leur origine (respectivement de Hong-Kong et de Malaisie). (Virbel-Alonso, 2011).

g) Kumquat marumi

Selon (Jacqemond et al., 2009) ce sont les seuls agrumes qui se consomment avec la peau. On trouve sur le marché deux principales variétés. Le Nagami (*Fortunella margarita*) à fruits longs et acidulés. Et le Marumi (*Fortunella japonica*) à fruits ronds, plus doux mais beaucoup plus fragiles. Il s'agit toujours de petits fruits de couleur orange, à peau lisse, variant de 25 à 40 g et avec 2 à 5 pépins. Les fruits tiennent très bien sur l'arbre, celui-ci est de vigueur moyenne. (Figure 09)

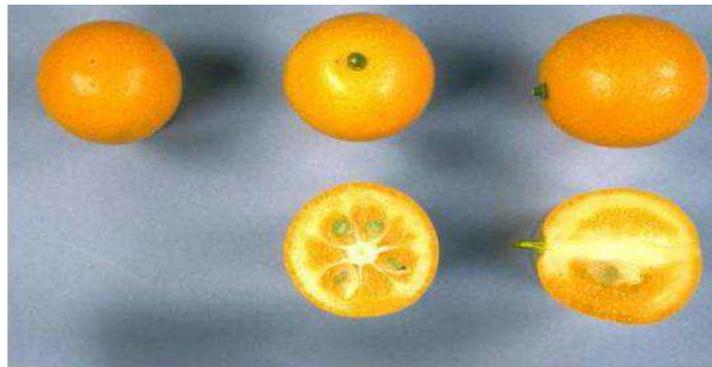


Figure 09 : Kumquat Marumi (Jacqemond et al., 2009).

h) Composition des agrumes

La teneur en jus ainsi que sa composition évoluent au cours de la maturation du fruit ; cette teneur en jus à maturité exprimée en pourcentage du poids oscille entre 30 à 45% pour les oranges et les mandarines. L'acidité du jus est due principalement à l'acide citrique, les glucides sont les composants les plus importants du jus ; ils représentent les 3/4 des éléments dissous dans les jus d'oranges et moins des 2/5 dans ceux des citrons et des limes. Pour les oranges, les mandarines et les clémentines, les teneurs en sucres dissous augmentent, alors que les teneurs en acide diminuent (Loussert, 1989)

La proportion de sucre (exprimée en extrait sec soluble) et d'acide (exprimée en acide citrique) permet, après dosage, de déterminer l'état de maturité des fruits afin de prévoir la date optimale de leur récolte. Dans les pays agrumicoles à climat hivernal chaud, les jus d'agrumes restent pauvres en acide, d'où le goût particulier peu prononcé que présentent ces

fruits pour le consommateur. La majeure partie des tonnages d'agrumes produits dans les pays semi-tropicaux et tropicaux est essentiellement destinée soit à la consommation intérieure, soit à l'industrie des jus. En effet, les fruits peu colorés sont généralement riches en jus de faible acidité (**Loussert, 1989**).

Les protéines ne figurent qu'en quantités très faibles dans le fruit (< 1g/100g) ; la vitamine C est présente dans les jus (30 à 40mg/100g) mais surtout au niveau de l'écorce (130mg/100g), les sels minéraux ne représentent guère plus de 0,4% du poids total du fruit (surtout le calcium et le phosphore) (**Parfonry, 2001**).

Différents organes de la plante contiennent des huiles essentielles, on les trouve dans les feuilles, les différentes pièces florales et dans l'écorce des fruits. Cette huile est enfermée dans de petites poches incluses dans les tissus su-épidermiques.

Tableau 02 : Composition de quelques fruits des agrumes (pour 100 g) (**Vierling, 2008**).

	Protides (Mg)	Glucides (Mg)	Valeur énergétique (KJ)	K (mg)	Na (mg)	Ca (mg)	Vitamine C (Mg)
Orange	0.2	10	180	170	1.4	15	45
Citron	0.4	7.7	140	138	1	11	53
Pamplemousse	0.53	11.3	150	150	1.3	9	36

2.1.6. Importance des agrumes

2.1.6.1. Valeur économique

Les agrumes sont produits dans différents pays à travers le monde, bien que la production soit principalement concentrée dans certaines zones géographiques, les pays du bassin méditerranéen constituent la première région productrice de fruits frais et l'Espagne joue un rôle clé à l'intérieur de celle-ci. La majeure partie du jus d'orange est produit dans deux zones principales : San Paulo au Brésil et l'État de Floride aux États-Unis. Le Brésil est de loin le plus important exportateur de jus d'orange au monde (**Unctad, 2014**).

En Algérie, la production d'agrumes devrait atteindre au cours de la saison agricole 2013-2014 environ 355 000 tonnes, soit une hausse de 7% comparée à la saison dernière, indiquent les prévisions du ministère de l'Agriculture.

2.1.6.2. Valeur alimentaire

L'orange, Le pamplemousse, La mandarine, Le citron, appartiennent à la famille des agrumes. Ce sont des aliments riches en antioxydant ; la vitamine A et des poly phénols. De plus, leur teneur en pectine, fibre alimentaire, est importante, cette fibre alimentaire soluble favorise la baisse du cholestérol.

Les agrumes sont peu caloriques, à manger tels quels ou en jus frais Pressés. Le pamplemousse est contre-indiqué avec certains traitements anti cholestérol (**Lévy Dutel et Scotto, 2011**).

2.2. Citrus (*Citrus limon*)

2.2.1. Définition

Le citron (*Citrus limon*) est un agrume issu de citronnier l'arbre à citron. C'est un arbre à feuilles persistantes, oblongues lancéolées à limbe nettement articulé avec le pétiole non ailé. Il peut vivre environ 80 ans (**Blancke, 2001**).

2.2.2. Description botanique

Agrumes (*Citrus limon*) est un hybride cultivé des espèces sauvages telles que le cédrat et de mandarine. Citrus est le nom commun pour le tissu entourant la reproduction la graine de l'arbre angiosperme de citron. Les fruits sont utilisés principalement pour leur jus, si la pulpe et la peau (zeste) sont également utilisées, principalement dans la cuisson. Citron jus est acide d'environ 5%, ce qui donne des citrons un goût amer et un pH de 2 à 3. Cette rend le jus de citron un acide pas cher, facilement disponible pour utilisation dans les sciences de l'éducation expériences. Limon fruits sont ovales. A maturité, ils ont un nez jaune vif, une couche de moelle dessous et d'un jaune pâle segmenté intérieur. Les petites graines couramment connu sous le nom 'floopies' on trouve dans le fruit Un citronnier peut croître jusqu'à 10 mètres (33 pieds), mais ils sont généralement plus petites. Les branches sont épineuses, et forment une couronne ouverte. Les feuilles sont vert, brillant et elliptique acuminés. Les fleurs sont blanches à l'extérieur avec un intérieur violet strié et ont un fort parfum. Sur un arbre de citron, de fleurs et de fruits mûrs peuvent être trouvés à en même temps (**Lanzara et Pizzetti, 2002**).

2.2.3. Classification et variété

La classification de citron est suivante :

- ✓ **Règne** : Plantea
- ✓ **Ordre** : Sapindales
- ✓ **Famille** : Rutaceae
- ✓ **Genre** : Citrus
- ✓ **Espèce** : Citrus Limon (**Blancke.2001**).

Les principales variétés sont : Bears sicilienne ; Berna verna ; Eureka ; Eureka panachée (citron de chair rose) ; Genova ; Interdonato ; Lisbonne ; Monachello ; Primofiori Fino, Mesero ; Santa Teresa ; Citron sans pépins ; Villa Franca. (**Blancke.2001**).

Les principaux hybrides sont : Lemonime ; Citron Volkamer (*Citrus volkameriana*) ; Limetta (*Citrus limetta*, Citron doux de la Méditerranée) ; Millsweet limetta ; Citron Poire (*Citrus lumia*) ; Pomme d'Adam (*Citrus lumia* var.) ; Citron Galgal (*Citrus pseudolimon*) ; Citron Pondersa (*Citrus pyriformis*) ; Karna (khatta) (*Citrus karna*) ; Citron Rough (*Citrus jambhiri*) ; Vangasay (*Citrus jambhiri* 'Vangasay') ; Lemandarin (*citron mandarine*) ; Lemonange ; Citron Meyer (*Citrus meyerii*) ; Citron neige (*Citrus kulu*) ; Yuzu (*Citrus junos*). (Blancke.2001).

Les principales variétés méditerranéennes cultivées de citronnier sont Verna ; Eureka ; Lisbonne ; Manochello ; interdonato et lunaris (Blancke.2001).

2.2.4. Structure de fruits

Le fruit de citron est un hespéridé à une baie avec une croûte aromatique et un intérieur charnu divisé en sections. L'oxo carpe est composé d'une couche externe colorée en jaune à la maturité du fruit contient des glandes et des pigments d'essence, et une couche intérieure blanche spongieuse appelé albédo. L'intérieur charnu ou endocarpe du fruit compose des sections en forme de coin (segments) contient des vésicules remplies de liquide fournissent la principale source de jus. (Agusti , 2003). (figure10).

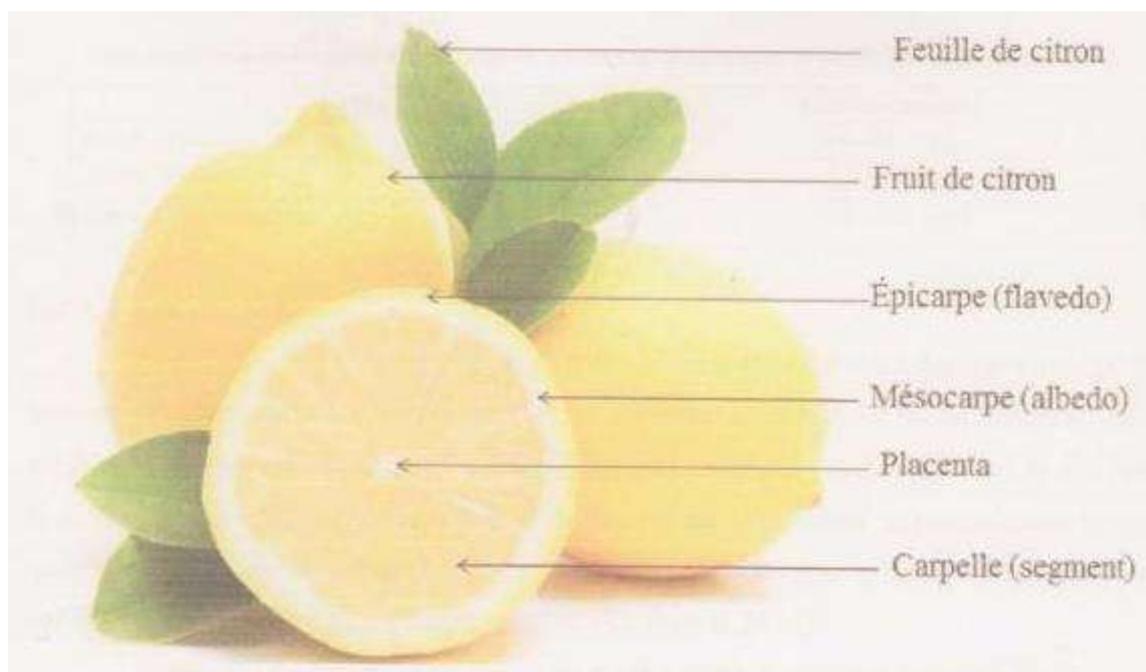


Figure 10 : Citron, leurs feuilles et leur Coupe transversale (Hendrix et Redd, 1995).

2.2.5. Composition chimique

Le citron est essentiellement riche en glucides, en acide organiques et en vitamines. Egalement c'est une source de petites quantités des sels minéraux (Somayah et al., 2012). Le

citron produit aussi sa propre huile essentielle qui contient également de flavonoïde des caroténoïdes et des limonoïdes (Vckari et al., 2002).

2.2.5.1. Les acides organiques

Ils jouent un rôle très important dans la croissance des fruits. L'acidité totale pour le jus de citron représente le principal facteur pour la définition de prix. Encore l'acidité est un point critique pour l'acceptation par le consommateur. Les acides organiques dans le jus de citron sont essentiellement l'acide citrique et l'acide L-malique qui représente la quasi-totalité de l'acidité totale. L'acide D-Iso citrique est contenu dans une petite concentration, mais est un critère important de qualité et de pureté, tandis que l'acide oxalique, acide succinique, acide malonique, l'acide quinique, acide tartirique, acide adipique, acide 2 - cetoglutarique figurent seulement sous forme de traces. Les acides organiques sont contenus essentiellement dans le jus et leur concentration dans une autre partie des fruits est très basse. (Kristina et al., 2008).

Tableau 03 : Concentration des principaux acides organiques dans le jus de citron (Kristina, 2008).

Acide	Concentration
Acide citrique	45-6L5g/l
Acide L-malique	1,4— 7,5 g/l
Acide D- isocitrique	230- 250 mg/l

2.2.5.2. Les glucides

Les glucides représentent la plupart des solides solubles dans les agrumes. Ils sont présents à la fois que les sucres simples et les polysaccharides 70 % de matières solides solubles. Entre les inonosaccharides, les composants principaux sont le glucose, le fructose et le galactose. Pour les polysaccharides le saccharose est le principal oligosaccharide d'origine naturelle dans le jus de citrus limon. Les hétéro-saccharides sont principalement représentés par des substances pectiques à longue chaîne (Citrech.it, 2014).

Tableau 04 : Concentration des principaux glucides dans le jus de citron (Citrech.it, 2014).

Glucide	Concentration en g/l
Glucose	8 – 12
Fructose	7.5 – 11
Saccharose	2 – 6.5

2.2.5.3. Composés azotés :

Les composés azotés dans le Citron sont contenus en faible concentration. Les plus importants sont les acides aminés libres qui représentent environ 70% de composés azotés totaux. Les jus de citron contiennent presque tous les acides aminés importants avec la seule exception de tryptophane. Les plus abondants sont la proline, l'asparagine, l'acide aspartique, la sérine, l'acide glutamique et l'arginine. Le citron contient de petites quantités de protéines qui sont, fondamentalement, des enzymes, (oxydoréductases, les transférases, hydrolases et lyases, isomérases et les ligases). Les bases azotées et des acides nucléiques contenus sont extrêmement faibles. (Citrech.it, 2014).

Tableau 05 : Concentration des principaux acides aminés dans le jus de citron (Citrech.it, 2014).

Acide aminé	Concentration en mmol/l
Proline	3 - 9
Asparagine	1- 4.5
Acide aspartique	2.3 - 6
Sérine	1 - 3.5
Acide glutamique	0.06 - 1.8
Arginine	0.6
Lysine	0 .03 – 0.15
Tyrosine	0.04
Glycine	0.09 – 0.3

2.2.5.4. Lipides

Les lipides de citron peuvent être différenciés en trois catégories : non polaire, polaire non ioniques et polaire ionique. Entre les lipides non polaires en trouver les aldéhydes, les cétones et les alcools à longue chaîne, les carotènes et leurs esters et des triglycérides. Les lipides polaires non ioniques contiennent généralement des sucres comme le glycosilglycerides. Pour les lipides ioniques polaires ils contiennent des groupes réactifs fonctionnels comme la fonction amine, carboxylique ou phosphorique des acides gras libres et de l'acide phosphatidique. Malgré leur faible teneur, les lipides sont importants parce que sont impliqués dans le développement de flaveurs pendant le stockage des jus de citron (Citrech, 2014).

2.2.5.5. Composition inorganique

Le pourcentage de cendres et les concentrations relatives des constituants inorganiques sont dépendants des conditions de croissance (fertilisation, type de sol, le climat, la température et des précipitations), la santé de l'arbre, cultivars, le stade de la maturité, la saison de la récolte et l'origine géographique. Les principaux composés inorganiques sont le potassium, le phosphore, le calcium et le magnésium, avec une concentration inférieure de sodium, de chlore de fer et de zinc. (Somayeh *et al.*, 2012).

Tableau 06 : Concentration des principaux sels minéraux dans le citron (Somayeh, 2012 et Okwi et Emenike, 2006).

Elément	Concentration en mg/ 100 g	Concentration en g/100g
Sodium (Na)	755.50 ±0.058	0.33 ±0.02
Potassium (K)	8600.00 ±0.028	0.37 ± 0.11
Calcium (Ca)	8452.50± 0.050	2.00 ±0.10
Magnésium (Mg)	1429.50 ±0.008	0.33±0.02
Fer (Fe)	147.65±0.068	-
Zinc (Zn)	13.94±0.007	-
Phosphore (P)	6656.25±0.17	0.38±0.20

2.2.5.6. Les vitamines

Et ce qui concerne les vitamines, le plus important est la vitamine C (acide ascorbique), d'autres vitamines sont : l'hiamine, riboflavine, niacine sont produits avec des quantités moins importantes. (Okwi et Emenike, 2006).

Tableau 07 : Concentration des principaux Vitamine dans le jus de citron (Okwi et Emenike, 2006).

Vitamine	Concentration mg/ 100g
Vitamine C	61.60 ± 0.11
Thiamine	0.88 ± 0.22
Riboflavine	0.02 ± 0.10
Niacine	0.14 0.33

2.2.5.7. Caroténoïdes Les caroténoïdes tirent leur nom du principal groupe représentant de leur composition, bêta-carotène. Ils sont des pigments largement répandus dans la nature responsable de teintes jaune de citron. (Donatus, 2008).

2.2.5.8. Limonoïdes

Les limonoïdes sont des composants ont un cycle furanne, le plus important limonoïdes est limonène qui est extrêmement amer il présents dans les tissus de fruits immature se forme acide limonique (n'est pas amer) et avec la maturité de fruits l'acide limonique convertit en limonène dans la croûte de fruit (**Donatus, 2008**).

2.2.5.9. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont très abondants dans les agrumes et avoir un modèle très complexe environ 56 flavonoïdes. Les principales flavonoïdes se produisent par *Citrus limon* est les flavones et les flavanones (3 - hydroxyflavones). Ces flavonoïdes trouvent principalement dans l'albédo et leur concentration dans le jus dépend strictement de technologie d'extraction de jus. (**Giuseppe et al., 2007**)

Tableau 08 : Concentration des principaux flavonoïdes dans le jus de citron (**Caristi ; 2003 _ Waii et al, 2000**)

Flavonoïde	Concentration en mg/100 ml.
Flavanones	
- Eriocitrin	1.67 - 39.1
- Hesperidin	3.84 - 41
Flavones	
- 6,8-di-C-Glu-Apigenin	1 - 1.45
- 6,8-di-C-Glu-Diosmetin	4.05 - 5.8
- 7-O-Rut-Luteolin	1.5 - 6.5
- Diosmin	0.51- 5.1
-Luteolin	0.08

2.2.6. Propriétés nutritionnelles et thérapeutiques

Les Citrons et autres agrumes contiennent des quantités de produits chimiques différents et sont pensés d'avoir des avantages pour la santé. Ils contiennent un terpène appelé D-limonène qui donne leur odeur de citron et le goût. Citrons contiennent des quantités importantes d'acide citrique; c'est pourquoi ils ont un pH bas et un goût amer. Ils contiennent aussi de la vitamine C (acide ascorbique) qui est essentiel pour la santé humaine. 100 ml de jus de citron contient environ 50 milligrammes de vitamine C (55% de la quotidienne recommandée valeur) et 5 g d'acide citrique. Citrons peut être traitée pour en extraire des huiles et essences.

2.2.6.1. Nutritionnelles

Malgré la difficulté de consommer le fruit de citron fraîche entièrement car leur goût acide est très élevé le citron importe une valeur nutritionnelle remarquable. Il considère comme la principale source de vitamine C et quelle que acides organique et sels minéraux. (Ali Karabulut et al., 2007).

Tableau 09 : Valeur nutritive pour 100 g de citron cru sans peau (Ali Karabulut et al., 2007).

Composant	Glucides	Protéines	Lipides	Fibres	Eau
Concentration g/ 100g	9.31	1.10	0.30	2.8	88.98
Valeur énergétique k cal	29.00				00

2.2.6.2. Thérapeutique

2.2.6.2.1. Propriété antibactériennes

Le citron possède des propriétés antivirales et antibactériennes et antifongiques efficaces sur de très nombreuses souches (Marutiet al., 2011).

Cette efficacité dut d'un part a la richesse en acide organique principalement l'acide ascorbique et d'autre part a la forte concentration des composés phytochimiques. Deux limonoïdes présent dans le citron (la limonine et la nomiline) inhiberaient la réplication du virus de l'immunodéficience humaines (VIH) en plus ils inhibent l'activité de la protéase du virus (Battinilli et Mangoni, 2003).

De plus certains limonoïdes et flavonoïdes du citron démontrent une activité contre certain champignon pathogène (Foschi et Pelucchi 2010)

Les travaux de Morel et Rochait sur l'action bactéricide de l'essence de citron ont démontre que le vapeur d'essence de citron neutralise le méningocoque en 15 minutes, et les bacilles d'Edreth (typhoïde) en moins d'une heure, les pneumocoques en 1 à 3 heures, les staphylocoques doré en 2 heures, les streptocoques hémolytique en 3 à 12 heures. Tandis que l'essence neutralise les bacilles en 5 minutes, staphylocoque 5 minutes, les bacilles de l'oeffler (diphthérie) en 20 minutes. Elle est in fertilisante pour les bacilles de tuberculose à la dose de 0.2 % Charles Richet montre que quelque gouttes de citron dans les huitres les débarrassent de 92% de leur bactérie en 15 minutes (Valnet, 1985).le pouvoir antibactérien du

citron est efficace dans les problèmes d'infections de l'appareil digestif, urinaire, vésical et rénal (**Donatus, 2008**).

2.2.6.2.2. Propriété inflammatoire

L'activité du citron dans les réponses anti-inflammatoire et antiallergique dues principalement à l'Hespéridine et la diosmine qui influencent le métabolisme de l'acide arachidonique et la libération d'histamine. La diosmine se comporte comme un agent de protection efficace contre les troubles inflammatoires par la réduction de la formation d'œdème et l'inhibition de la synthèse de la prostaglandine E2, prostaglandine F2 et le thromboxane B2 (**Foschi et Pelucchi, 2010**).

2.2.6.2.3. Propriétés anti cancers

Plusieurs études ont démontrées que la consommation de citron serait reliée à la prévention de certains types de cancers comme celui de l'œsophage de l'estomac, du colon, de la bouche et du pharynx (**Foschi et Pelucchi, 2010**).

2.2.6.2.4. Autres propriétés thérapeutiques

Le citron renferme différents types de flavonoïdes limonoïdes et caroténoïdes qui sont des antioxydants puissants permettant de neutraliser des radicaux libres (**Yu et al., 2005**).

Le citron renferme stabilise les vaisseaux capillaires et améliore la circulation sanguine. Il est également recommandé pour les personnes qui souffrent d'hypertension artérielle (**Donatus, 2008**).

En raison de sa teneur en vitamine, minéraux et acides. Le citron stimule l'activité des organes digestifs. Il convient à des gens souffrant d'un manque d'appétit de difficulté de digestion et dans le cas de mauvais fonctionnement de l'estomac. Le citron a aussi plusieurs propriétés bénéfiques pour la peau, les ongles, les cheveux, les dents, la bouche ... etc. ces effets bénéfiques sont dus à sa composition diversifiée (**Donatus, 2008**).

Chapitre III :
Généralité sur
les lapins

3.1. Importance du lapin

3.1.1. Place du lapin dans l'alimentation de l'homme

Comparée à celle des autres espèces animales, la viande du lapin est plus riche en protéines, en certaines vitamines et en sel minéraux. Elle est par contre plus pauvre en graisse (Lebas *et al.*, 1996). Selon (Djago et Kpodekon, 2000), la viande du lapin présente des qualités diététiques indiscutables et est souvent recommandée par les médecins.

Elle se situe parmi les viandes recherchées (Lebas *et al.*, 1996). Au Bénin 64% de la population ont consommé au moins une fois la viande du lapin et la quasi-totalité (95%) des consommateurs l'a appréciée (Kpodekon et Tomagnimena, 1992).

3.1.2. Importance socio-économique

Les lapins sont destinés soit à l'autoconsommation, soit à la commercialisation. Ces deux phénomènes ont une importance comparable, mais l'autoconsommation domine dans les pays en voie de développement. Il faut noter que la participation de la cuniculture traditionnelle à l'économie de certains pays est loin d'être négligeable comme l'ont montré les relations entre valeur de la production cunicole et le PIB (Colin et Lebas, 1995).

3.1.3. Aperçu sur la biologie du lapin

3.1.3.1. Taxonomie du lapin

La position taxonomique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est la suivante (Grasse, 1949 ; Lebas *et al.*, 1984) :

- ✓ Classe des mammifères
- ✓ Super Ordre des Glires
- ✓ Ordre des Lagomorphes
- ✓ Famille des Léporides (lièvre et lapin)
- ✓ Sous-famille des Leporinae
- ✓ Genre *Oryctolagus*
- ✓ Espèce : *Oryctolagus cuniculus* (Grasse, 1949 ; Lebas *et al.*, 1984).

3.1.3.2. Extérieur du corps et morphologie

Les principales parties du corps du lapin sont identifiées sur (la figure 11). Pour la majorité des races, à l'exception des nains, l'allure générale du corps est différente selon le sexe. Une tête large et forte, un thorax développé, des membres relativement épais et une musculature bien extériorisée sont généralement caractéristiques du mâle. Les femelles présentent, toutes proportions gardées, plus de finesse générale avec une tête plus étroite, un corps paraissant plus allongé et une ossature un peu plus légère. Seul l'arrière-train est plus développé avec un bassin large. (Barone *et al.*, 1973).

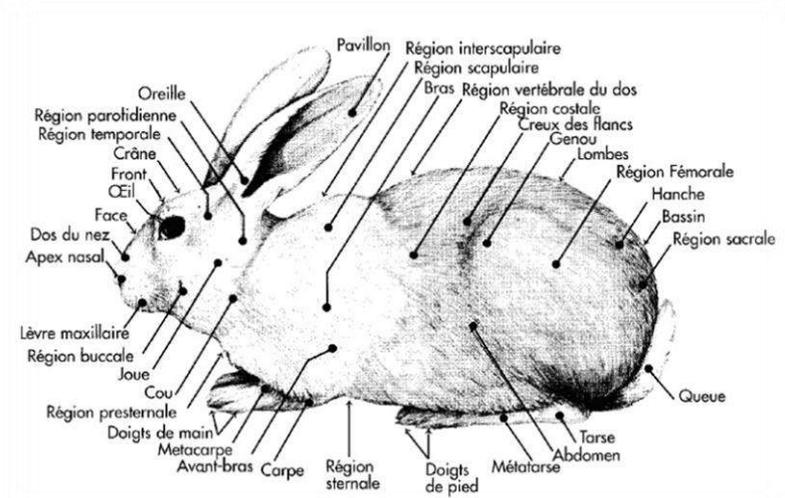


Figure 11 : Différentes parties du corps du lapin (Barone et al., 1973).

3.1.3.3. Comportement alimentaire et alimentation du lapin

Le lapin est un rongeur monogastrique qui présente des particularités anatomophysiologiques (Lebas et al., 1996). Par opposition aux autres monogastriques, le lapin est caecotrophe, bon transformateur tirant le maximum de profit de la cellulose.

3.1.3.4. Comportement alimentaire

Le rythme des tétées est imposé par la mère aux lapereaux nouveau-nés, mais à partir de la troisième semaine, on note une modification extraordinaire du comportement. Le lapereau passe d'une seule tétée par jour à une multitude de repas solides et liquides plus ou moins alternés et répartis régulièrement le long de la journée: 25 à 30 repas solides ou liquides par 24 heures (Lebas et al., 1996), soit plus de 3 heures de repas dont les 2/3 sont nocturnes. L'évolution des quantités de nourriture et d'eau ingérées est fonction de la nature des aliments présentés aux lapins, du type d'animal, de son âge et de son stade de production (Lebas et al., 1996).

Chez un lapin adulte (4-4,5 kg) ou su adulte (2,5 à 3 kg), le tube digestif a une longueur totale d'environ 4,5 à 5 mètres. L'organisation des segments digestifs et leurs caractéristiques principales sont décrites sur (figure 12,13).

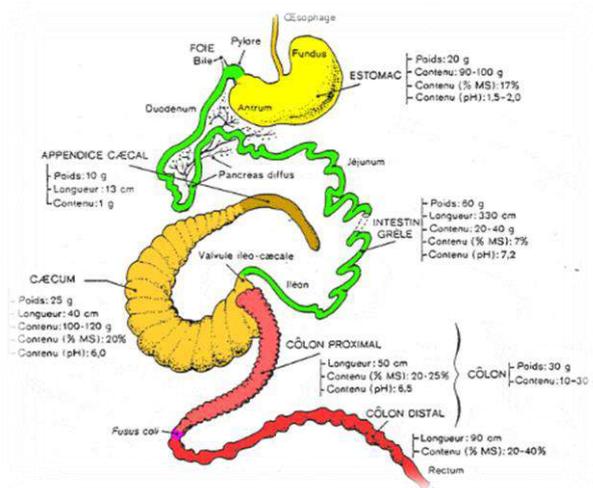


Figure 12 : Schéma des différents éléments du tube digestif du lapin (Lebas et al, 1996).

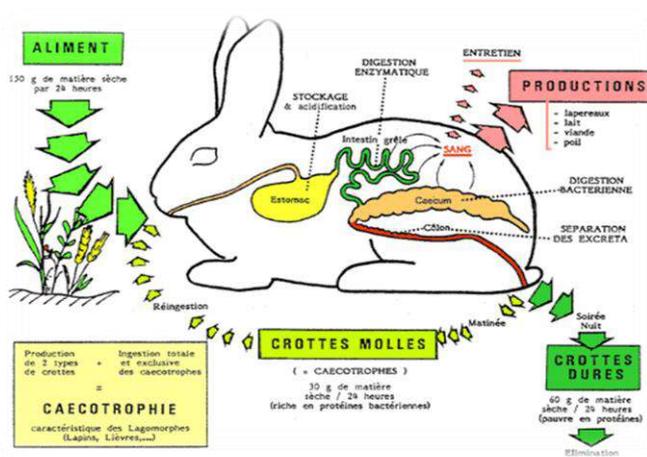


Figure 13 : Schéma général de fonctionnement de la digestion chez le lapin (Lebas et al, (1996).

Lorsque le lapin se trouve face à plusieurs aliments, il choisit en fonction de critère parfois difficilement prévisible. La répartition et la prise de repas n'est pas homogène au cours des 24 heures. La part de l'alimentation quotidienne consommée chaque heure en période d'obscurité est nettement plus importante que la part correspondante ingérée en période d'éclairage, tant pour l'aliment solide que l'eau de boisson. Au fur et à mesure que les lapins vieillissent, le caractère nocturne du comportement alimentaire s'accroît (Lebas et al, 1996).

3.1.3.5. Alimentation en eau et en aliment

Les besoins alimentaires des lapins dépendent de leur âge et de leurs stades physiologiques.

a) L'eau

Le lapin boit énormément surtout s'il est alimenté exclusivement avec des aliments de types granulé et farineux. Il a été constaté que le lapin boit un volume d'eau correspondant au double de celui de la ration sec consommée (**Djago et Kpodekon, 2000**).

b) L'aliment

En élevage semi intensif, il se compose de fourrage et d'un complément alimentaire au moment important de la production. Le complément peut être de deux ordres :

- les produits simples (drèche de brasserie, grain de maïs etc....) ;
- les provendes

En élevage, intensif l'aliment complet (provende) est servi aux lapins avec un peu de fourrage (**Hulet, 2003**).

3.1.3.6. Habitat

A l'état sauvage les lapins creusent des terriers qui comportent des aires de repos où ils se réfugient à la moindre alerte et où ils vivent en « sociétés ». La femelle, avant de mettre bas, creuse un terrier particulier dénommé « rabouillère » dans lequel elle dépose ses petits et vient leur donner à téter.

Pour les lapins domestiques, ils convient de prévoir un habitat de sorte que les lapins soient hors ses agressions extérieures telles que le bruit, la poussière, les prédateurs, une température forte. Le lapin étant sensible aux agents microbiens, une bonne hygiène s'avère indispensable en cuniculture (**Lebas et al., 1996**).

3.1.3.7. La reproduction**a) Le mâle**

Les lapins mâles atteignent leur maturité sexuelle autour de 5 mois ½ voire 6 mois avec un poids minimum de 2,5 kg (**Djago et Kpodekon, 2000**). L'appareil génital mâle comprend :

- Les testicules au nombre de deux et qui peuvent monter et descendre dans la cavité abdominale
- Le canal épидidymaire qui précède le canal déférent. Le pénis est fin et long ; il n'est visible qu'au moment de l'érection (**Boucher et Nouaille, 2002**).

b) La femelle

Les jeunes femelles atteignent leur maturité sexuelle autour de 5 mois et ont un poids minimum de 2,2 kg si le poids des femelles adultes est de 3 à 5 kg. Contrairement aux autres espèces, la lapine est un animal à ovulation provoquée, car celle-ci a lieu à la suite de l'accouplement. En outre, l'ovulation chez la lapine est multiple ; ce qui peut donner des portées ayant jusqu'à 10 à 12 lapereaux à la naissance voire plus (**Djago et Kpodekon, 2000**).

L'appareil génital femelle comprend deux ovaires, deux pavillons et deux cornes utérines munies d'un col chacune. Le vagin précède la vulve qui change de couleur en fonction des phases de réceptivité de la lapine (Boucher et Nouaille, 2002).

3.1.4. Les pathologies dominantes du lapin

De plus en plus la viande du lapin entre dans les habitudes alimentaires des béninois mais la croissance de la cuniculture est handicapée par diverses pathologies (Tableau 10).

Tableau 10 : Les pathologies dominantes du lapin (Kpodekon et Djago, 2000), (Boucheur et Nouaille, 2002).

	Pathologies	Etiologie	Symptômes
Maladies digestives	Coccidiose	<i>Eimeria</i>	-Diarrhée, perte de poids, gros ventre chez les lapereaux, baisse de consommation d'eau et d'aliment.
	Entérotoxémie	<i>Clostridium</i> sp ou colibacilles	-Mort brutal en quelques heures avec production de mucus, anus à peine souillé, l'animal ballonne très rapidement.
	colibacillose	Colibacilles (<i>Eschenichia coli</i>)	- Mort des reproducteurs avec diarrhée. - Mort des lapereaux au nid avec diarrhée. - Mort des lapins à l'engraissement avec diarrhée.
Maladies respiratoires	Pasteurellose (avec ou sans bordetellose associée)	<i>Pasteurella multocida</i> avec ou sans <i>Bordetella bronchiseptica</i>	-Inflammation suppurative, abcès mammaire ou cutanée, métrite. En cas d'atteinte respiratoire, la respiration devient difficile, bruyante, rauque. L'état général de l'animal se dégrade.
Maladies cutanées	Gale des oreilles	<i>Psoroptes cuniculi</i>	-L'animal secoue la tête et se gratte parfois. Présence de croûte dans l'oreille.
	Gale du corps et de la tête	<i>Sarcoptes scabiei</i> ou <i>Notoedres cati</i>	-Agitation, grattage entraînant dépilation et apparition de croûtes sur le corps.

Maladies liées à la reproduction	Abcès et mammite	- pasteurelles - staphylocoques - streptocoques	Abcès - Les abcès d'origines <i>Pasteurella</i> sont crémeux et souvent localisés sous le cou et le maxillaire. - En cas de staphylococcies, on a un pus blanchâtre et croûteux au niveau des articulations, sur le corps, et sur les yeux des jeunes lapereaux. Mammite - Tuméfaction, chaleur, rougeur, agalactie.
	Frigidité et stérilité	Mauvaise alimentation	- Refus d'accouplement.
	Mortalité au nid	<i>Staphylococcus aureus</i>	- Taux de mortalité anormalement élevé et mort en grande quantité des petits.

Chapitre IV :
Biologie
d'Escherichia
coli et
Staphylococcus
aureus

4.1. Biologie d'*Escherichia coli*

4.1.1. Généralités

Escherichia coli, autrement appelé colibacille ou *E. Coli*, est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain, découvert en **1885** par le pédiatre allemand Théodore *Escherich*, dans les selles de nourrissons, c'est un coliforme fécale généralement commensale du tube digestif de l'homme, son établissement dans le tractus digestifs s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement, ce qui explique son apparition extrêmement précoce dans les selles.

Sa présence dans les eaux, le sol et même les produits alimentaires témoigne d'une contamination fécale (**Meyer et al., 2004**).

Le colibacille commensal ou saprophytes peut parfois acquérir occasionnellement un pouvoir pathogène à l'occasion d'une modification du terrain ou un changement d'habitat En bactériologie médicale, *E. Coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine due à sa diversité et à la variation des facteurs de virulence que possèdent, cependant, certaines souches d'*E. Coli* peuvent être pathogènes, chez l'homme elles sont responsables surtout des infections intestinales (**Lescat et al., 2007**).

4.1.2. Classification

Selon **Koper (2004)**, *E. Coli* appartient à un groupe entérique, ce sont des bactéries appartenant à la classification suivante :

- ✓ **Règne** : Bacteria
- ✓ **Embranchement** : Protéobactéria
- ✓ **Classe** : Gamma Protéobactéria
- ✓ **Ordre** : Entérobactéria
- ✓ **Famille** : Enterobacteriaceae
- ✓ **Genre** : *Escherichia*
- ✓ **Espèces type** : *Escherichia coli* (**Koper ,2004**).

La classification la plus utilisée par les microbiologistes est fondée en grande partie- sur les travaux de (**Kauffman ,1947**) et se base sur la détermination du sérotype, identifié par rapport aux antigènes somatiques O. Plus de 180 sérotypes O d'*E. Coli* sont actuellement connus, du sérotype, identifiés au sein du sérotype par rapport aux antigènes ; d'autres structures présentent à la surface des bactéries. Il s'agit essentiellement des antigènes H du flagelle (56 antigènes différents) et éventuellement des antigènes K de la capsule (80 antigènes) (**Ramteke et al., 2007**).

4.1.3. Habitat et écologie

Escherichia coli est considéré comme un hôte commun de la microflore commensale du tractus digestif de l'homme et des animaux à sang chaud (Morgan et al., 2001). Les colibacilles représentent près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte (Leminor et Verrou, 1990).

On peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses, les colibacilles sont présents dans des voies biliaires et amygdales. (Avril et al., 2000). Ce sont des germes témoins de la contamination fécale dans l'eau et les aliments (Hermieu, 2007). En outre, bien que la majorité des souches de *E. coli* soient commensales banales, quelques-unes sont toutefois à l'origine de pathologies intestinales (symptômes diarrhéiques) (Lescat, 2007) ou extra-intestinales (infections urinaires, infections systémiques telles que des septicémies ou des méningites) (Mora et al., 2009).

4.1.4. Culture

E. coli est un aéro-anaérobie facultatif, il est chimio organotrophe et hétérotrophes, tire son énergie de la voie d'oxydation et de fermentation (exige des sources d'azote et des besoins inorganiques). Le colibacille pousse facilement sur un milieu ordinaire à base d'extraits de viande (gélose nutritive), à toutes les températures mêmes les plus basses (7 à 4° Celsius), il peut croître à un pH se limitant à 9. Et se maximisant à 4,4 (Meyer et al., 2004).

Sur gélose ordinaire, les colonies sont habituellement à bord régulier, légèrement bombés de 1,5 à 3 mm de diamètre, lisses (smooth), translucides et non pigmentées. (Vandecasteele, 2005).

Sur la gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques, en milieu liquide, les colonies apparaissent former un trouble homogène. (Meyer, 2004). Suivent le milieu sélectif, les colonies présentent différentes couleurs rouge sur milieu VRBL et jaune sur un milieu Drygalski, Devient vert métallique sur gélose EMB (Eosin Methylene Blue Agar) et rose sur milieu Mac Conkey (Meyer, 2004).

4.1.5. Morphologie

Il se présente sous la forme d'un bâtonnet ovulaire ou parfois allongé de 2 à 6 µm de long et 1,1 à 5 µm de large (Prescott et al., 2003), généralement mobile (certains sont immobiles) grâce aux flagelles, qui sont soit isolées, soit en paires ou en chaînettes dans les produits pathologiques et les cultures jeunes, mais présentent des formes très longues dans les cultures âgées, elle est Gram négatif et souvent de coloration bipolaire. (Avril, 2000).

Pour la mobilité, la bactérie porte des flagelles, qui sont des organites filamenteux, généralement plus longs que la bactérie, ils ont un rôle antigénique pour l'identification des

sérotypes. (Bonhomme, 2003).

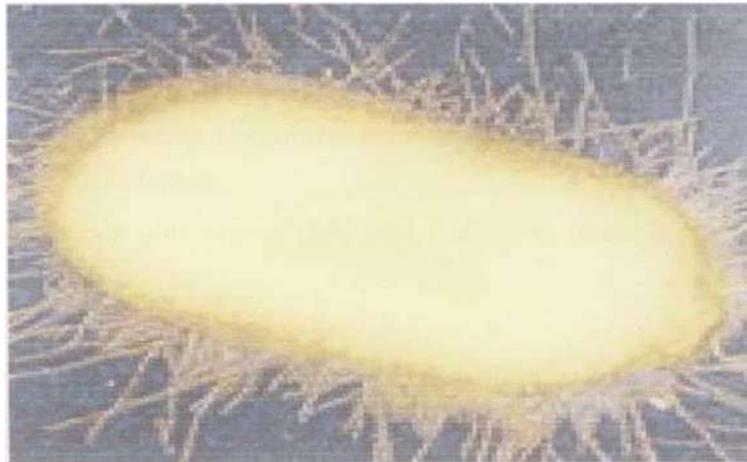


Figure 14 : *Escherichia Coli*. (Body, 2004).

4.1.6. Besoins nutritifs

Les bactéries sont des organismes vivants, qui ont besoin de trouver dans leur environnement tous les aliments qui constituent leur structure cellulaire, c'est-à-dire : C, H, O, N, P, S etc. Ces éléments se trouvent sous forme de molécules plus ou moins complexes : sucres, amidon, cellulose, protéines, matières grasses, hydrocarbures, les bactéries se nourrissent donc de matières organiques. Pour utiliser leur nourriture, les bactéries fabriquent des enzymes qui vont permettre la dégradation des macromolécules et leur transformation en molécules plus simples. Il existe deux types d'enzymes :

Enzymes excrétées en dehors de la cellule (enzymes exo cellulaires) qui vont permettre de couper les grosses molécules en molécules plus petites capables de passer à travers la membrane bactérienne.

Les enzymes endo-cellulaires qui restent à l'intérieur de la cellule, transforment les petites molécules pour les besoins nutritionnels et énergétiques de la bactérie (Koper et al., 2004).

4.1.7. La croissance

La croissance bactérienne est exceptionnelle car les cellules se divisent par fission binaire, le temps qu'il faut pour les cellules de la population pour doubler (le temps de dédoublement « g ») dépend du taux de croissance de l'organisme, de la composition du milieu et des conditions environnementales. Chez *E. coli*, lorsqu'il est placé dans un milieu très aéré, il est capable de se diviser toutes les 20 min (Koper, 2004).

4.1.8. Pouvoir infectieux d'*E. Coli*

Mainil, 2003 dans sa synthèse sur *E. coli* invasifs rappelle que la colonisation de l'hôte se

fait en 3 étapes :

- Franchissement d'une muqueuse, digestive ou respiratoire ;
- Dissémination dans l'organisme par voie sanguine, ce qui implique la survie de la bactérie dans le sang ;
- Colonisation d'un organe cible avec l'adhésion, internalisation et multiplication intracellulaire.

4.1.8.1. Infection intestinale

L'incubation est de 3 à 9 jours et conduit à de violentes diarrhées aqueuses associées à des crampes abdominales, ces diarrhées peuvent devenir éventuellement hémorragiques, et conduire parfois à des complications de type syndrome urémique hémolytique (**Jeantel et al., 2006**).

Selon (**Prescott et al., 2003**), ces diarrhées sont dues à des souches de stéréotypes particuliers d'*E. Coli* qui provoque soit des cas sporadiques, soit de petites épidémies, on reconnaît :

-E. Coli adhérent diffus (DAEC) : Souches adhérent à toutes les cellules épithéliales et donnant généralement une diarrhée chez les enfants non immunisés.

-E. coli entérohémorragique (EHEC) : Souche d'*E. Coli* (O157 : H7) produisant plusieurs cytotoxines.

-E. Coli entéroinvasif (EIEC) : Responsable de diarrhées des voyageurs car elles pénètrent et se fixent aux cellules épithéliales de l'intestin, peuvent aussi produire une cytotoxines et entérotoxine.

-E. Coli Entéropathogène (EPEC) : S'attachent à la bordure en brosse de l'épithélium intestinal causant une lésion et aussi des diarrhées.

-E. Coli entérotoxigène (ETEC) : Produisant deux entérotoxine codées par des plasmides, stable à la chaleur (St), et Labile à la chaleur (LT) responsable de diarrhées des voyageurs.

4.1.8.2. Infection extra intestinale

4.1.8.2.1. Infection urinaire

Les infections du tractus urinaires regroupent un ensemble hétérogène, d'infection de l'un des constituants de l'arbre urinaire ou de ses connexes. Leur point commun est la présence de bactéries dans le tractus urinaires (**Lobel, 2007**). Parmi ces micro-organismes, *Escherichia coli* occupe une place prépondérante (80% des cas d'infections urinaires), plus fréquente chez la femme pour des raisons anatomiques (urètre court), grossesse (**Collignon et al., 2007**), baisses du taux d'œstrogènes lors de la ménopause ou certaines habitudes d'hygiène (douche

vaginales) (**Brunner et al., 2006**). Les rapports sexuels sont également une cause favorisante (**Debré et al., 2004**).

4.1.8.2.2. Septicémies

Les *E. Coli* sont isolés dans 20% des septicémies et représentent 45% de celles dues au bacille à gram négatif. (**Proscott et al., 2003**). Les pores d'entrée sont urinaires (pyélonéphrite, prostate), digestifs, biliaires (angiocholite, cholécystite), les septicémies à *E. coli* sont moins responsables (les localisations septiques secondaires) mais les complications viscérales sont plus fréquentes : défaillance cardiocirculatoire, œdème pulmonaire lésionnel (**Monterio, 2007**).

4.1.8.2.3. Méningites

Escherichia coli est le deuxième germe responsable d'infection maternofoetale dans les pays industrialisés (**Bonacorsi et al., 2002**), La souche K1 est particulièrement mise en cause (présence d'une capsule) (**Hauffman et al., 1999**).

En effet, 4 à 7 % des femmes sont colonisées au niveau vaginal, avec *E. coli* K1. La transmission mère-nouveau-né intervient dans 50 à 70 % des naissances (**Bonacorsi et al., 2002**). Cette infection touche aussi les sujets âgés, dont la porte d'entrée est le tube digestif ou les voies urinaires (**Charbonneau et al., 2002**).

4.1.8.3. Résistance aux antibiotiques

En 2007, la France reste parmi les 13 pays européens où la proportion de souches d'*E. Coli* résistante aux céphalosporines de 3^o génération est inférieure à 5%. Néanmoins, comme dans 23 des 29 pays participants, cette proportion est en augmentation significative. Il est ainsi probable que de plus en plus de pays rapportent à l'avenir une proportion *E. Coli* résistants aux céphalosporines de 3^o génération supérieure à 5%.

Cette augmentation intervient dans un contexte européen de forte proportion de résistance aux aminopénicillines (entre 33 et 78%) qui continue d'augmenter.

Enfin, la proportion de *E. coli* résistants aux fluoroquinolones est, elle aussi, en augmentation dans la majorité des pays européens (**Institut de Veille Sanitaire (IVS), 2008**).

4.2. Biologie de *Staphylococcus aureus*

4.2.1. Généralités

Les *Staphylococcus aureus* sont des organismes procaryotes, unicellulaires, apparaissent à l'examen microscopique comme cocci gram⁺, de bactéries sphériques de 0.8 à 14 µm de diamètre, regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin) (**Fiquet, 2009**). Ils sont immobiles, non sporulés, aéro-anaérobiques, avec un métabolisme respiratoire et fermentaire, peuvent être cultivés en 24 heures en milieu ordinaire, lorsqu'ils sont isolés en

milieu sélectif (milieu hyper isolé de Chapman), ils tonnent des colonies convexes lisses de 1 à 4µm de diamètre. (Corne, 2004).

Les *Staphylococcus aureus* élaborent un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange d'intensité très variable (Tan, 2009).

Ils représentent comme caractéristiques principales de pouvoir se développer sur des aliments à a_w relativement faible (jusqu'à 0.83), sa température optimale est de 37° C et son pH optimum de 7, comme toutes les bactéries à coloration gram⁺, c'est une bactérie résistante dans le milieu environnemental (Croguennec et al., 2006).

4.2.2. Classification

S. aureus est classé selon les recommandations du bergey's manuel of systematic bacteriology (2ème édition), et **Euzeby, (1998)** comme suit :

- ✓ **Règne** : Bacteria
- ✓ **Division** : Firmicutes
- ✓ **Classe** : Bacilli
- ✓ **Ordre** : Bacillales
- ✓ **Famille** : Staphylococaceae
- ✓ **Genre** : Staphylococcus
- ✓ **Espèce** : *Staphylococcus aureus* (Euzeby, 1998)

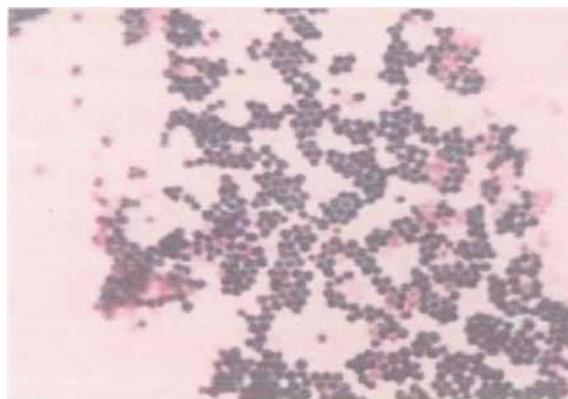


Figure 15 : Staphylococcus Aureus (Body, 2004)

4.2.3. Habitat et écologie

Le réservoir naturel de *Staphylococcus aureus* est la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (Belle et al., 2008). Il est estimé qu'environ 50% des individus sains sont porteurs de staphylocoques dorée dans la partie antérieure du nez, espèces révèlent être pathogènes opportunistes dans certains emplacements ou dans certaines circonstances. (Schrenzel et Linder, 2008). La prévalence de la colonisation nasale par *S.aureus* est plus élevée chez les jeunes enfants, les sujets de sexe masculin, les personne de race caucasienne,

les patients hospitalisés et les patients à risque notamment les sujets diabétiques, ceux qui sont sous hémodialyse ou dialyse chronique péritonéale en ambulatoire et les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (**Van Belkum et al., 2009**).

Staphylococcus doré possède des pouvoirs pathogènes, notamment un pouvoir invasif par une forte capacité à se multiplier et à se disséminer dans l'organisme et une capacité d'élaboration de toxines induisant des propriétés toxiques antigéniques chez l'hôte (**Gautier, 2009**).

4.2.4. Physiologie

4.2.4.1. Type respiratoire

Le *Staphylococcus aureus* est un germe aérobic facultatif, qui produit une catalase, quelques souches exigent du CO₂ pour croître (**Avril et al., 2002**). Il se multiplie plus facilement en aérobiose qu'en anaérobiose (**Cyril, 2008**).

4.2.4.2. Besoins nutritifs et facteurs de croissance

Les *Staphylococcus aureus* exigent des acides aminés et des vitamines, ils sont mésophiles, ils sont généralement en présence d'une flore compétitive importante, ils sont sensibles à l'acidité du milieu, ils tolèrent des concentrations élevées de Na Cl et des aw réduites.

Ils survivent longtemps dans les aliments déshydratés ou congelés, c'est un germe thermosensible, des populations de 10⁶ *S.aureus/ml* peuvent être totalement inactivées en 4 à 24 min et à 54 à 60 °C, cependant certains consistants du milieu (lipides, protéines, sucre et sel) peuvent les protéger de la chaleur (**Bachir Raho, 2011**).

Tableau 11 : Quelques facteurs de croissance et de toxinogénèse chez les *Staphylococcus aureus* (**Pengov et Jurcevic, 2003**).

Facteur	Croissance	Produit d'entérotoxine
Température	-6 à 46°C	-10 à 45 °C
Température optimale	37°C	40°C
PH	4 à 9.8	5 à 8
pH optimum	6 à 7	6.5 à 7
La Concentration en Na Cl	0 à 20%	0 à 10%
La concentration en Na Cl optimale a _w	0%	0%
a _w	0.83 à >0.99	0.86 à >0.94
a _w optimum	>0.99	>0.99

4.2.5. Pathologie du *Staphylococcus aureus*

4.2.5.1. Les infections digestives à *Staphylococcus aureus*

Les entérocolites aiguës à *Staphylococcus aureus* surviennent chez un malade ayant reçu pendant une période prolongée, un antibiotique à large spectre, mal absorbé par la muqueuse intestinale. (Al Alain, 2008).

La flore intestinale normale est détruite et remplacée par les *Staphylococcus aureus* résistants aux antibiotiques. (Al Alam, 2008).

4.2.5.2. Syndrome *Staphylococcus* de la peau ébouillantée

Au cours de cette maladie assez courante, l'épiderme se décolle en mettant à nu une zone rouge sous-jacente, il est observé plus fréquemment chez les enfants, y compris ceux en bas âge. Dans les crèches, il est parfois une multiplication soudaine et massive de ces cas. (Landraud et Lemichez, 2007). C'est une maladie grave qui met en jeu le pronostic vital (Templer et Brito, 2009).

4.2.5.3. Les *Staphylococcus* cutanées, sous-cutanées et muqueuses

Le *Staphylococcus aureus* peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles ou profondes, l'infection superficielle atteinte surtout l'enfant, elle se traduit par un impétigo réalisant des lésions très superficielles de la jambe et de la face (qui prennent un aspect croûteux vernissé), une folliculite qui représente une lésion inflammatoire suppurante et douloureuse (David et al., 2005).

L'affection profonde est représentée par un abcès intra folliculaire de toute la gaine de poil (furoncle), ou par des infections des canaux des glandes sudoripares appelés : Hidrosadénite, qui laisse suinter une sérosité purulente (nécessite une exérèse chirurgicale des nodules scléro-inflammatoires) et des anthrax. (Lui et al., 2009 ; Gautier et al., 2009).

Les infections *staphylococciques* de la glande mammaire peuvent ainsi se développer chez 1 à 3% des femmes qui allaitent, surtout vers la 2^{ème} et 3^{ème} semaine suivant l'accouchement (pouvant se compliquer d'abcès mammaire). (Templer et Brito, 2009).

Les infections localisées aux muqueuses atteignent les yeux (conjonctivite), la sphère générale (cervicite), les voies aériennes (sinusite, amygdalite) (Gravet et al., 2002).

4.2.5.4. Syndrome du choc toxique :

Maladie *staphylococcique* pouvant avoir des conséquences graves, se déclare souvent chez des femmes qui emploient des tampons menstruels très absorbants, qui apparemment favoriseraient la croissance des germes. (Prescott et al., 2003).

Il peut avoir lieu en dehors de la période de la menstruation chez la femme, et chez l'homme (Prescott et al., 2003).

La porte d'entrée peut être vaginale, ou suite à des interventions chirurgicales et des infections cutanées à staphylocoques (**Prescott et al., 2003**).

4.2.5.5. Intoxication staphylococcique

L'intoxication staphylococcique survient après consommation d'aliments dans lesquels les *Staphylococcus aureus* se sont multipliés et ont produit des toxines. Après un court délai d'incubation (2-4h) les signes apparaissent brusquement : Ce sont des vomissements et de la diarrhée : la durée des symptômes est habituellement inférieure à 30 heures. Dans de nombreux cas, les malades ne consultent pas le médecin et les autorités sanitaires ne sont pas averties. (**Bourquin, 2004**).

L'intoxication staphylococcique est donc beaucoup plus fréquente que ne le révèlent les statistiques officielles (**Jean Bourquin, 2004**).

4.2.6. La résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

La fin des années 1950 et au début des années 1960, *Staphylococcus aureus* devient un organisme pathogène nosocomiale (acquis à l'hôpital) entraînant une mobilité et une mortalité considérables, depuis lors, des pénicillines semis synthétiques, résistantes à la pénicillinase, se sont avérées être des agents antimicrobiens efficace dans le traitement d'infections staphylococciques (**Le loir et al., 2009**).

Malheureusement les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) sont apparues créant un problème nosocomial majeur. La plupart des souches sont résistantes à plusieurs des agents antimicrobiens d'usage courant, dont les macrolides, les aminoglycosides et les B- lactamine, y compris la dernière génération de céphalosporines. (**AI Alam, 2008**).

Partie II :
Etudes
expérimentales

Chapitre V :
Matériel et
méthodes

1. Matériel et méthodes

Notre étude a porté sur la comparaison de l'activité antibactérienne de miel et jus de citron *in vivo* et *in vitro* sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

1.1. Déroulement de l'expérimentation

Les analyses physico-chimique a été réalise au laboratoire de chimie de université du Saida. La partie microbiologie a été réalise au laboratoire D'Ain El Hdjar Université Moulay Taher de Saida durant la période du Février 2016 à Mai 2016.

1.2. Echantillon du miel

L'échantillon du miel récolté est conservé dans un flacon en verre stérile, Hermétiquement fermé et gardé à la température ambiante, cette technique est utilisée pour protéger les composés sensibles à la chaleur et à la lumière. **(Figure N°16).**



Figure16 : les échantillons du miel (E2, E1).

Tableau 12 : Echantillons de miels

Echantillons	Lieu de récolte	Date de récolte
E1 (miel de Sidr)	Ain safra Nàama	Juin 2015
E2 (Miel multi floral)	Sidi boubkeur Saida	Juin 2015

1.3. Citron

Le fruit d'agrume (citron jaune) d'espèce *Citrus Limon*, est fraîchement choisi, au hasard du marché local des fruits et légumes d'Ain El hdjar (Saida). L'échantillon de citron est nettoyé, lavé, séché avec une serviette en coton propre puis il a subi une extraction manuelle par un presse-citron, et filtré par une passoire.



Figure17 : l'échantillon du citron.

1.4. Les microorganismes utilisés

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont : *E. coli* et *S. aureus* (référéncés). Le choix des bactéries a été porté sur 2 souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont responsables de (TIA) constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agent antibactériens. Les souches bactériennes proviennent de laboratoire de l'université de Saida.

2. Matériel et appareillages utilisés

Le matériel et les produits utilisés dans notre étude sont indiqués dans le **tableau 13** :

Tableau 13 : Matériel et produits utilisés.

Appareillages et verreries	Produits et milieux de culture	Autres
Agitateur «HEITO»	Milieu de Muller Hinton	Bec bunsen
Autoclave « SANOCLAVE»	Gélose nutritive	Barreau magnétique
Bain-marie « HEIDOLPH»	Gélose Chapman	Les embouts
Balance «SARTORIUS» et KERN	Gélose Hektoen	Pince en bois et en métal
Microscope optique « OPTIKA »	Fuchsine	Spatule
Etuve «MEMMERT» et «HERUS»	Violet de gentiane	Portoir des tubes à essai
pH mètre	Solution de lugol	Pissette
Plaque chauffante «IKA»	Solutions d'étalonnage du	Seringues en jetable
Réfractomètre	Alcool	Tubes à essai
Réfrigérateur	Bouillon nutritif	Flacons
Baguettes en verre	L'huile d'émersion	Boîtes de Pétri en plastique
Béchers	Eau distillée	écouvillon

Eprouvette	Eau physiologique	tube à hémolyse
Micropipettes	H ₂ O ₂ (eau oxygéné)	Lame bistouri
Lames et lamelles	Anesthésie (Kétamine)	Règle
Pipette Pasteur, Pipette gradué		
Entonnoirs		
Four pasteur «HER AEUS»		
Spectrophotomètre «JENWAY»		
Vortex		
Conductimètre		

3. Analyses physico-chimiques du miel

Durant la période d'échantillonnage, six paramètres physico-chimiques sont déterminées : la teneur en eau, l'indice de réfraction, la teneur en cendre, le pH, l'acidité libre, la conductivité électrique et la densité.

3.1. La teneur en eau

La teneur en eau du miel est le critère de qualité qui détermine la capacité du miel à rester stable et à résister à la détérioration par fermentation de la levure : la teneur en eau influe sur la fermentation du miel pendant le stockage, cette dernière est mesurée avec le réfractomètre d'Abbé (**I.H.C, 2002**). Le réfractomètre (Abbé) est réglé à 20 °C, il est étalonné avec de l'eau distillé). (**Figure18**)

➤ Mode opératoire

Introduire dans un flacon quelques grammes du miel (2 à 5g) homogénéisé, fermer le flacon et le mettre dans l'étuve pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux du sucre puis l'homogénéiser par agitation et laisser refroidir.

Après le calibrage du réfractomètre avec de l'eau distillée et à l'aide de la baguette en verre, déposer rapidement une goutte du miel sur le prisme de réfractomètre, fermer l'appareil, lire l'indice de réfraction, et noter la température du prisme.

En se rapportant à la table de CHATAWAY (**Annexe 01**), on obtient le pourcentage d'eau correspondant à l'indice de réfraction à 20°C.



Figure 18 : un réfractomètre pour mesurer la teneur en eau.

3.2. La teneur en cendre

La teneur en cendre est un critère de qualité pour l'origine du miel, les miels de fleurs ayant une faible teneur en cendre que les miellats .

Les cendres brutes sont obtenues par incinération des matières organiques à 550°C. Elles contiennent tous les éléments minéraux.

➤ Mode opératoire

Une quantité connue de miel est mise dans une capsule d'incinération vide pesée préalablement. La capsule est soumise à une température de 550°C dans un four à moufle pendant 5h. Après refroidissement, la capsule est pesée.(**CHOUIA.A 2013-2014**) (Figure19).



Figure19 : un four à moufle contient des capsules pour mesurer la teneur en cendre.

➤ Calcul et expression des résultats

- La teneur en cendres est déterminée selon la formule

$$\checkmark C\% = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \text{ Avec}$$

- ✓ C% : teneur en cendre pour 100 gramme de miel
- ✓ m₀ : poids en gramme de miel utilisé
- ✓ m₁ : poids en gramme de la capsule après incinération
- ✓ m₂ : poids en gramme de la capsule vide

3.3. Mesure de la densité relative

La densité relative est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est *D*. La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de volume de 5ml à la température de 20°C.

➤ Mode opératoire

- Peser le pycnomètre rempli avec de l'eau distillée, à une température de 20°C.
- Peser le pycnomètre rempli avec du miel à 20°C.
- La densité est exprimée par la relation:
 - ✓ $D = M / M'$ Où:
 - ✓ M : Masse du volume du miel;
 - ✓ M' : Masse de même volume d'eau distillée

3.4. pH

Le pH est normalement défini l'acidité libre du miel et le contenu de tous les acides libres exprimé dans le miel (**Commission International du Miel, 2002**).

➤ Mode opératoire

- Dissolution de 10 g du miel dans 75 ml d'eau distillée ;
- L'échantillon est remué par un agitateur magnétique, le pH est noté par des électrodes. (figure20).



Figure20 : mesuré l'acidité libre du miel par PH mètre.

3.5. Acidité libre

➤ Matériel

- Burette de 25 ml graduée en 0,1 ml avec son support et une pipette de 5 ml et un erlenmeyer de 50 ml.

➤ Réactifs chimiques nécessaires

- Ethanol à 99 %

- Hydroxyde de potassium: on prépare une solution de 0,1 N dans l'éthanol

- Phénolphtaléine: solution à 2g par litre dans l'éthanol

- Le miel

➤ Mode opératoire :

Introduire 1g de l'échantillon (miel) dans erlenmeyer propre et sec, ajouter 5 ml d'éthanol neutraliser avec la pipette et mettre 3 gouttes de phénolphtaléine puis neutraliser la solution obtenue avec l'hydroxyde de potassium à l'aide de la burette quelque seconde si la couleur de la solution est varié on arrête le titrage.

En fin de titrage lire le volume de m KOH consommé pour calcul l'indice d'acide à l'aide de la relation suivant :

$$AC = \frac{M \times N \times V}{m}$$

✓ V : vol de KOH

✓ m: masse de miel

✓ M : masse de KOH

✓ N : molarité de KOH

3.6. Conductivité électrique

La conductivité électrique est un bon indicateur de l'origine botanique du miel, très souvent utilisé dans le contrôle de routine du miel. Cette mesure nécessitant seulement instrumentation peu coûteux, c'est une méthode très facile et rapide (I.H.C, 2002).

➤ Mode opératoire

Elle est déterminée par une conductivité mètre à 20°C d'une solution du miel à 20% (1V/5V), la lecture est faite directement après l'immersion de la cellule dans la solution. (Figure21). Les résultats sont exprimés en millésimes/Cm (Benaziza et Schweitzer, 2010)



Figure21 : détermination de la conductivité mètre d'une solution du miel.

4. Analyse physico-chimique du jus de citron

4.1. Mesure de l'indice de réfraction.

- Après le calibrage du réfractomètre avec de l'eau distillée et à l'aide d'une micropipette, déposer une goutte de jus de citron sur le prisme de réfractomètre, étaler la goutte et fermer l'appareil puis lire l'indice de réfraction et noter la température du prisme.
- En se rapportant à la table de **CHATAWAY (Annexe 01)**, on acquiert le pourcentage d'eau correspondant à l'indice de réfraction à 20°C.

4.2. Mesure de la densité relative à 20 °C

Pour déterminer la densité relative de jus de citron, on a adopté la même méthode précédente utilisée pour déterminer la densité du miel.

➤ Mode opératoire

- > Mesurer le pycnomètre rempli avec de l'eau distillée, à une température de 20°C.
- > Mesurer le pycnomètre rempli avec de jus de citron à 20°C.
- > La densité est calculée par la formule suivante :
 - ✓ $D = M / M'$ Où:
 - ✓ M : Masse du volume de jus de citron
 - ✓ M' : Masse de même volume d'eau distillée.

4.3. Détermination du pH

Le pH est mesuré par un pH mètre à une température de 20°C :

- Calibrage du pH mètre par l'eau distillée.
- Etalonnage du pH mètre par les solutions tampon de différents pH : (pH = 3 et 12).
- Lecture de pH après avoir immerger l'électrode dans le jus de citron.

4.4. Détermination de l'acidité libre

L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse en mg nécessaire pour neutraliser son acidité libre. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc déjuger leur état de détérioration.

➤ Principe

L'indice d'acide du jus de citron revient à neutraliser les acides libres de celles-ci par l'hydroxyde de potassium (KOH).

➤ Mode opératoire

Burette de 25 ml graduée en 0.1 ml avec son support et une pipette de 5 ml et un erlenmeyer de 50 ml.

➤ Réactifs chimiques nécessaires

- Ethanol à 99 %
- Hydroxyde de potassium : on prépare une solution de 0.1 N dans l'éthanol
- Phénolphthaléine : solution à 2g par litre dans l'éthanol
- Le jus de citron.

➤ Mode opératoire

Introduire 1g de l'échantillon (jus de citron) dans l'erlenmeyer propre et sec, ajouter 5 ml d'éthanol neutraliser avec la pipette et mettre 3 gouttes de phénolphthaléine puis neutraliser la solution obtenue avec l'hydroxyde de potassium à l'aide de la burette quelques secondes. Si la couleur de la solution est variée on arrête le titrage.

En fin de titrage lire le volume de m KOH consommé pour calcul l'indice d'acide à l'aide de la relation suivante :

$$AC = \frac{M \times N \times V}{m}$$

- V= volume de KOH ; M = masse de KOH
- m=masse du jus de citron ; N = molarité de KOH

5. Teste de confirmation de souches

Les souches que nous avons utilisées ont été déjà au préalable confirmées par le laboratoire d'Université de Saida, nous avons tenu de vérifier leur pureté par les caractéristiques cellulaires, par quelques tests biochimiques et cultureux.

5.1. Examen macroscopique

Ce test à apprécier la taille des colonies, leur couleur, leur forme (opaque et translucides) sur boîte de pétri contenant des milieux spécifiques pour chaque bactérie après l'incubation à 37° C pendant 24h.

5.2. Examen microscopique

Après l'ensemencement des bactéries sur leurs milieux de cultures sélectifs, la coloration

de Gram est réalisée après incubation à 37°C pendant 24 heures.

5.3. Coloration de Gram

➤ But :

Il s'agit de la coloration de base en microbiologie. Elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer en deux genres (Gram+ et Gram-). Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme. (Delarras, 2007).

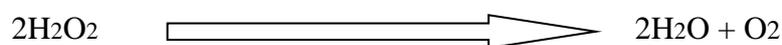
➤ Protocole

- ✓ Etaler une goutte de suspension microbienne sur une lame.
- ✓ Laisser bien sécher à l'air Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane ou Crystal violet ; laisser agir 30s.
- ✓ Par-dessus ajouter le lugol 30s.
- ✓ Eliminer les colorants et décolorer rapidement à l'alcool 30sec.
- ✓ Rincer à l'eau pour arrêter la décoloration.
- ✓ Recouvrir la lame de Fuchsine ou safranine 1 min.
- ✓ Rincer à l'eau et laisser sécher à l'air (ou à la flamme).
- ✓ Observation à l'objectif X 100 avec l'huile à immersion.

6. Test biochimique

6.1. Catalase

Les souches bactériennes qui possèdent une catalase, peuvent utiliser l'oxygène moléculaire et former l'eau oxygénée avec les atomes d'hydrogène libérés par oxydation du FADH₂ en FAD. L'eau oxygénée qui, en s'accumulant, tuerait les bactéries (ce qui se produit pour les bactéries anaérobies strictes) est dégradée immédiatement par la catalase. (Delarras, 2007)



- ✓ L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse

➤ Technique utilisée:

Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée et y dissocier directement un peu de la culture à étudier, prélevée sur milieu solide. Le dégagement immédiat de bulles gazeuses traduit la présence d'une catalase.

6.2. Oxydase

La recherche de cette enzyme consiste à déposer dans un tube à hémolyse, un disque «Ox» et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée. Ensuite, prélever une partie de la colonie à

étudier et l'étaler sur le disque. Après environ 10 minutes une coloration violet foncé apparaît sur le disque puis vire au noir : test oxydase +. (Delarras, 2007).

6.3. Fermentation du lactose

Les coliformes sont des entérobactéries fermentant le lactose avec dégagement gazeux à 30 C°.

➤ Principe

La recherche des coliformes est basée sur la fermentation du lactose avec production du gaz. Cette fermentation est à l'origine d'une acidification du milieu prouvée par un indicateur coloré. Le dégagement gazeux est perçu dans la cloche de Durham avec la formation d'une grosse bulle de gaz.

✓ Bouillon lactosé au bromocresol pourpre : BCPL

Les coliformes, en fermentant le lactose, provoquent le virage de l'indicateur colorée et la production de gaz dans la cloche. En effet la fermentation du lactose se manifeste par la production d'acide qui provoque le virage du bromocrésol pourpre au jaune.

➤ Technique

Dans la zone aseptique prélever la culture étudiée *E. coli* et ensemencer dans les tubes contenant BCPL et incubation à 37°C pendant 24 heures.

6.4. Staphylocoagulase

La majorité des *S. aureus* peut produire coagulase qui convertit le fibrinogène dans le plasma sanguin en fibrine et coaguler le sang. Ce test a également été utilisé pour différencier *S. aureus* de *staphylocoques* à coagulase négative (Ryan, Ray et Sherris, 2004). Dans cet essai, un tube contenant 1 ml de plasma de sang a été inoculé avec quelques colonies d'isolat *staphylococcique*. La présence de la coagulation du plasma a été vérifiée après une nuit d'incubation à 37 ° C.

7. Conservation des souches

A partir des souches identifiées, faire des repiquages dans des tubes de gélose de conservation en piqûre centrale et incubation à 37°C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite conservés dans le réfrigérateur à 6°C. les repiquages sont réalisés tous les 15 jours.

8. Préparation de l'inoculum

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes (de 18 à 24 heures) en phases de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide. après incubation pendant 24 h à 37°C. Un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis, incubées à 37°C pendant 18 h.

9. Préparation de la suspension bactérienne

A partir des cultures jeunes sur (GN), on prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 à 10ml de l'eau physiologique stériles, on agit par un vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm.

10. Etude de l'activité antibactérienne (*in vitro*)

10.1. Etude de l'activité antibactérienne du miel

➤ Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Selon (Skandamis et Nychas, 2001), la CMI est définie comme étant la plus faible concentration en miel inhibant toute croissance bactérienne visible, la CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux différents échantillons de miels.

➤ Méthodologie

Cette méthode consiste à incorporer des volumes croissants du miel, de façon à additionner le milieu de culture (M.H) de telle manière à obtenir pour chaque lot 10ml du mélange (Rios et al., 2001 ; Kawakman et al., 2008).

- Dans des conditions d'asepsie, mélanger dans un tube à essai et à l'aide d'une seringue gradué stérile un volume de miel à un volume de gélose Muller Hinton préalablement liquéfié au bain-marie à 40°C pour éviter sa solidification et la destruction des enzymes du miel.
- L'homogénéisation du mélange se fait à l'aide d'un vortex, ensuite couler le contenu dans les boites de Pétri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.

➤ Ensemencement

Après la solidification du milieu, réaliser un ensemencement en surface de 1 ml de la suspension bactérienne de concentration de 10^6 UFC/ml, par la technique de râteau. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24heures.

Tableau14 : Volumes de miel et de gélose incorporés.

Echantillon de miel	Volumes des miels (ml)	Volumes du milieu Muller Hinton (ml)
Les deux échantillons de miel (E1, E2)	0,5	9,5
	1	9
	1,5	8,5
	2	8
	2,5	7,5
	3	7
	3,5	6,5
	4	6

10.2. Etude de l'activité antibactérienne de citron Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour déterminer la CMI du jus de citron, on a opté la même méthode précédente utilisé pour le miel.

➤ Méthodologie

> Dans des conditions d'asepsie, incorporer dans un tube à essai et à l'aide d'une seringue gradué stérile un volume de jus de citron à un volume de gélose Muller Hinton préalablement liquéfié au bain-marie. (Rios *et al.*, 2001 ; Kawakman *et al.*, 2008).

> Homogénéisation du mélange se fait à l'aide d'un vortex, ensuite couler le contenu dans les boites de Pétri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.

➤ Ensemencement

Après la solidification du milieu, réaliser un ensemencement en surface de 1 ml de la suspension bactérienne de concentration de 10^6 UFC/ml, par la technique de râteau. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24heures.

Tableau 15 : Les volumes de jus de citron et la gélose M.H

Volumes de jus de citron (ml)	Volumes de Muller Hinton (ml)
0,3	9,7
0,4	9,6
0,5	9,5
0,6	9,4
0,7	9,3
0,8	9,2
0,9	9,1
1	9
2	8

10.3. Préparation d'un milieu à base de miel, jus de citron et de gélose Muller Hinton

Cette méthode consiste à incorporer des volumes décroissants de jus de citron à des quantités croissantes mais inférieure de la valeur de la CMI du miel de telle sorte que le mélange égal à 10ml. (Rios *et al.*, 2001 ; Kawakman *et al.*, 2008).

➤ Addition de jus de citron au miel

La manipulation s'effectue dans des conditions d'asepsie :

- A l'aide des seringues stériles, introduire des volumes de miel inférieurs à la CMI dans des tubes à essais stériles.
- Ajouter des volumes précis de jus de citron à des concentrations décroissantes du miel.
- Homogénéiser le contenu à l'aide d'un vortex.

- Incorporation des mélanges (miel et jus de citron) à la gélose Muller Hinton
- Liquéfier la gélose Muller Hinton dans un bain-marie, puis on va maintenir la gélose à une température de 45°C.
 - Compléter le volume du mélange à 10ml par la gélose M.H.
 - Homogénéiser bien le contenu des tubes à essais avec un vortex.
 - Couler les mélanges dans les boites de Pétri stériles, après l'étiquetage des boites en mentionnant pour chacune les concentrations en miel, le jus de citron et la gélose M. H qui doivent y être mises.
 - Laisser solidifier sur une surface froide.
- **Ensemencement** : réaliser un ensemencement en surface de 1 ml de la suspension bactérienne de concentration de 10⁶UFC/ml, par la technique de râteau. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24heure.

Tableau 16 : Gammes de mélange (miel, jus de citron) et Gélose pour <i>s.aureus</i>				
Volume de mélange				Volume de la gélose M.H (ml)
E1		E2		7
Miel (ml)	Jus de citron (ml)	Miel (ml)	Jus de citron (ml)	
2.9	0.1	2.9	0.1	
2.8	0.2	2.8	0.2	
2.7	0.3	2.7	0.3	
2.6	0.4	2.6	0.4	
2.5	0.5	2.5	0.5	
2.4	0.6	2.4	0.6	
2.3	0.7	2.3	0.7	
2.2	0.8	2.2	0.8	
2.1	0.9	2.1	0.9	
2	1	2	1	
1.9	0.1	1.9	0.1	
1.8	0.2	1.8	0.2	
1.7	0.3	1.7	0.3	
1.6	0.4	1.6	0.4	

Tableau17 : Gammes de mélange (miel, jus de citron) et Gélose pour *E. coli*.

Volume de mélange				Volume de la gélose M.H (ml)
E1		E2		
Miel (ml)	Jus de citron (ml)	Miel (ml)	Jus de citron (ml)	
2.6	0.4	2.6	0.4	7
2.5	0.5	2.5	0.5	
2.4	0.6	2.4	0.6	
2.3	0.7	2.3	0.7	
2.2	0.8	2.2	0.8	
2.1	0.9	2.1	0.9	
2	1	2	1	
1.9	0.1	1.9	0.1	
1.8	0.2	1.8	0.2	
1.7	0.3	1.7	0.3	
1.6	0.4	1.6	0.4	

11. In vivo

- pour évaluer l'effet antibactérien du miel et jus de citron on s'est disposé des lapins : (de même sexe, âge, et race) et du poids très proche l'un de l'autre. L'examen clinique des lapins a révélé que les lapins ne manifestant aucuns signes d'une pathologie grave.

11.1. Déroulement des essais

Nos essais ont été réalisés au niveau de l'élevage expérimental du l'animalerie des lapins du département de biologie Ain Hdjar, l'Université Dr Moulay Tahar Saida.

11.2. Site de l'élevage

Le bâtiment d'élevage est localisé au niveau de l'animalerie du Université Dr Moulay Tahar de Ain El Hdjar Saida est équipée des 11 cages grillagées réparties sur 8 cages individuelles et 3 collectives. Les cages collectives d'une capacité de 4 à 5 lapins et équipée d'un abreuvoir, d'une mangeoire et des boites à nid en bois. L'aération des cages est assurée par des trois fenêtres, l'éclairage est naturel, il est associé à un éclairage artificiel. (Figure22).

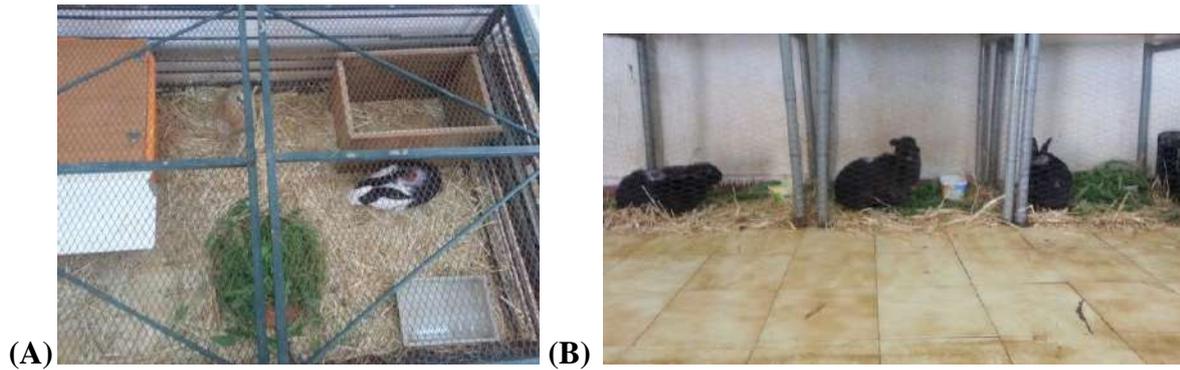


Figure22 : les cages grillagées du l’animalerie du Université Dr Moulay Tahar de Ain El Hdjar Saida. (A : cage collective, B : cage individuelle).

11.3. Condition d’élevage

11.3.1. les animaux :

Les lapins exploités au niveau du l’animalerie sont de race locale, ils proviennent des élevages familiaux de la région de Saida, Ces animaux sont caractérisés par leur petit format et un phénotype hétérogène représenté par des couleurs de robes variées. (**figure23**).



Figure23 : phénotype de lapins de population locale (A : robe fauve, B : robe noir).

L’expérimentation a porté sur des 5 femelles : 4 lapins du même phénotype et des couleurs noirs et une du couleur beige (témoin), et de même âge, et d’une race locale dont le poids l’un proche a l’autre. Cet essai a été entre Février 2016 et Mai 2016. (**Tableau18**).

Tableau18 : Description des lapins.

	Age	Poids	Robe	sexe
Lapin N° 01	5 Mois	1550g	Beige	femelle
Lapin N° 02	5 Mois	1340g	Noir	femelle
Lapin N° 03	5 Mois	1650g	Noir	femelle
Lapin N° 04	5 Mois	1595g	Noir	femelle
Lapin N° 05	5 Mois	1650g	Noir	femelle

11.3.2. L'aliment :

Les lapins exploités sont alimentés à volonté avec un même aliment. L'aliment standard a été acheté auprès de l'Office National de Bétails de Saida.

11.3.3. Hygiène et prophylaxie :

L'hygiène des bâtiments d'élevage est assurée par un nettoyage quotidien des sols (jet d'eau et désinfectants). Une désinfection des boîtes à nid est également effectuée régulièrement.

11.4. Contrôles effectués

Chaque lapin possède une fiche de signalement et fiche technique ou sont mentionnées toutes les observations, les pesés et les mesures faites pendant l'essai sont notés :

✓ Fiche de signalement

- matricule et région.
- sexe et âge.
- poids et taille.
- robe et particularités spécifiques.

✓ Fiche technique

- la date et le numéro du lapin.
- le poids du lapin.
- le diamètre de la plaie.
- le nombre des colonies bactériennes (dénombrement).

11.5. méthode chirurgicale

- 1- on met le lapin sous anesthésie générale (Kétamine) dose 1.5 cc pour 10 Kg de poids vif.
- 2- Après la pesée de l'animal on calcule la dose adéquate à injecté.
- 3- A l'aide d'une lame bistouri on provoque une plaie chirurgicale de forme circulaire et de 3 cm de diamètre. (**figure24**).
- 4- On enlève la peau et on provoque une infection à partir d'un ensemencement en surface de 1 ml de la suspension bactérienne de concentration de 10^6 UFC/ml du Staphylococcus aureus pour les lapins N° 01, N°03 et Escherichia coli pour lapin N°02 et N°04, et pour lapins N° 05(témoin) laisse la plaie sans aucune infection provoquée (a l'état normal).
- 5- On laisse la plaie 24h sans aucun traitement pour laisser le temps à l'infection s'installer. (Durant ces 24h l'animal prend son alimentation habituelle dans les mêmes conditions environnementales qu'avant l'intervention.

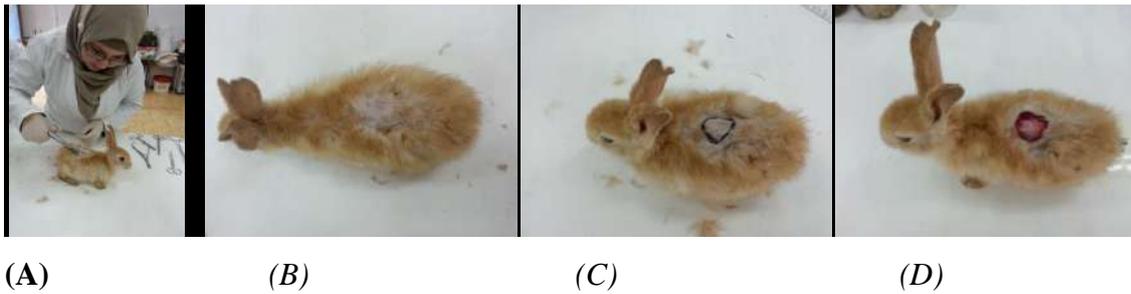


Figure24 : les étapes de l'intervention chirurgicale.

11.6. Paramètres études :

11.6.1. Le poids vif (g) :

Il est déterminé par la pesée individuelle des lapins une fois par jour à partir de 1ère jour du l'expérimentation, les pesées ont lieu le matin vers 9 heures avant la distribution de l'aliment. **(Figure25).**



Figure25: La pesée du lapin par une balance électrique.

11.6.2. Le diamètre de la plaie :

Il est déterminé par la mesure de diamètre de la plaie du chaque lapin chaque jour à l'aide d'une règle. **(Figure26).**



Figure26 : mesure du diamètre de la plaie une par règle.

11.6.3. Méthode de dénombrement des colonies :

➤ prélèvement :

Le prélèvement de surface est effectué pour évaluer l'effet antibactérien du miel et jus de citron sur les plaies des lapins, ce prélèvement en surface fait par écouvillonnage.

- Sortir un écouvillon de son emballage stérile, humidifier l'extrémité en le plongeant dans un tube contenant le l'eau physiologie stérile, éliminer l'excès de l'eau physiologie en le pressant contre la paroi du tube. A l'aide de l'extrémité de l'écouvillon, étaler sur la surface de la plaie du chaque lapin et on ferme l'écouvillon avec un étiquetage de chaque écouvillons. (figure27).



Figure27 : prélèvement par écouvillonnage.

➤ Ensemencement et l'incubation

- couler une gélose en boîte de Pétri pré-fournie ou choisie selon la bactérie que l'on étudie le milieu Chapman pour *S. aureus* (02 boites) et le milieu Héктоen pour *E. coli* (02 boite).

- On laisse les milieux solidifiant sur les boites et après on fait l'ensemencement en surface a l'aide des écouvillons qui a prélevée par les lapins.

✓ **Boite 01 et 02** : couler par le milieu Chapman et ensemencer par l'écouvillon qui on prélever par les lapins N°01 et N 03.

✓ **Boite 03 et 04** : couler par le milieu Héктоen et ensemencer par l'écouvillon qui on prélever par les lapins N°02 et N°04.

- après l'ensemencement on incuber les boites dans l'incubateur de la température 37°C pendant 24 h.

11.6.4. Dénombrement des colonies :

➤ Principe :

Le **dénombrement microbiologique** sur milieu solide est une technique scientifique de comptage de micro-organismes. Ce procédé est avant tout destiné pour connaître la présence ou non de germes pathogènes . Afin d'effectuer le dénombrement en milieu solide, les bactéries que l'on veut dénombrer sont présentes dans l'inoculum sont ensuite introduites soit à la surface, soit dans un milieu gélosé. Chaque bactérie isolée donne naissance à une colonie

ou UFC pour « unité formant colonie ». En effet, plusieurs bactéries peuvent être à l'origine de la formation d'une seule colonie qui ne peut plus être qualifiée de colonie (pas de clone) mais alors d'UFC.

➤ Mode opératoire

- après 24h d'incubation on fait le comptage des colonies sur les boîtes, le comptage des UFC ne doit pas être réalisé au hasard. Il est conseillé de délimiter des ensembles au marqueur sur le fond de la boîte de Pétri toutes les 20 UFC comptées. Il faut que le nombre d'UFC soit significatif entre 30 et 300 colonies. Cet intervalle est défini pour éviter des erreurs de contaminations extérieures pour un nombre d'UFC assez faible. Et on définit un seuil afin de faciliter le dénombrement des boîtes et d'éviter les erreurs de comptage.

11.7. Traitement des plaies :

11.7.1. Traitement par miel

✓ On traite les plaies des lapins N° 01 et 02 par le miel. (**Figure28**).

- chaque jour on fait ce traitement après des contrôles effectués quotidiennement.

- à l'aide d'une seringue on prélève 3ml (CMI) du miel et applique directement sur la plaie des lapins N°01 (qui est infecté par *S. aureus*) et lapin N°02 (qui est infecté par *E. coli*), Si le miel n'est pas assez fluide réchauffez le légèrement en le gardant tiède.

- On utilise un coton, ou tout instrument stérile pour étaler le miel sur la blessure de façon uniforme sur toute la surface.



figure28 : (a,b) le traitement des plaies par miel.

11.7.2. Traitement par jus de citron

✓ On traite les plaies des lapins N° 03 et 04 par le jus de citron. (**Figure29**).

- chaque jour on fait ce traitement après des contrôles effectués quotidiennement.

- à l'aide d'une seringue on prélève 0.4ml (CMI) du jus de citron et applique directement sur la plaie des lapins N°03 (qui est infecté par *S. aureus*) et lapin N°04 (qui est infecté par *E. coli*).

- On utilise un coton, ou tout instrument stérile pour étaler le jus de citron sur la blessure de façon uniforme sur toute la surface.



Figure29 : traitement de la plaie par jus de citron.

11.7.3. Témoin

On laisse le témoin sans aucun traitement pour comparer l'effet antimicrobien du miel, jus de citron et l'état normal des plaies des lapins.

Remarque : on fait le traitement et des paramètres des contrôles quotidiennement jusqu'à l'inhibition totale

Chapitre VI :
Résultats et
discussion

2. Résultats et discussion

2.1. Analyses physico-chimiques

2.1.1. Teneur en eau

Après avoir converti les résultats d'indice de réfraction des échantillons de miel, on a obtenu les valeurs de la teneur en eau données dans le tableau et la figure suivants :

Tableau 19 : Teneur en eau correspondant à chaque indice de réfraction de chaque échantillon du miel

Echantillon du miel	E 1	E 2
Indice de réfraction	1,4765	1,4785
Teneur en eau (%)	24	23.2

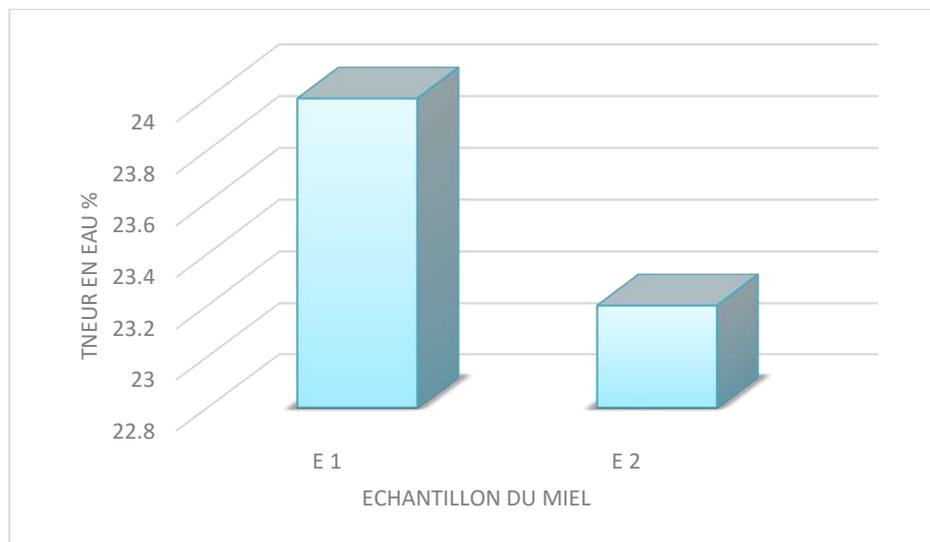


Figure30: Représentation graphique de la teneur en eau des différents échantillons du miel

La teneur en eau est un facteur hautement important car il permet l'estimation du degré de maturité des miels et peut renseigner sur sa stabilité contre la fermentation et la cristallisation au cours du stockage ; donc elle conditionne la conservation du produit (**De Rodriguez et al., 2004 ; Küçük et al., 2007**). Le risque de fermentation est très faible pour les miels qui contiennent moins de 18% (**Carvalho et al., 2009**).

- Les valeurs de la teneur en eau des échantillons de miel analysés (E1 et E2)

- E1 la teneur en eau 24% correspondant à indice de réfraction 1,4765 et E2 la teneur en eau 23% correspondant à indice de réfraction 1,4785 (**Tableau 19**). Qui possèdent des teneurs en eau supérieures à la norme. Ceci pourrait être du à la manière de la récolte de ces miels.

- Les fortes teneurs en eau proviendraient d'une récolte trop précoce ou sont seulement dues à l'hygroscopicité du miel (Tchoumboue *et al.*, 2001 ; 2007).

Selon (Bogdanov, 2009), la teneur en eau dans le miel dépend de miellée, du climat et d'autres facteurs. La teneur en eau détermine de façon prépondérante la conservation du miel. Seuls les miels avec une teneur en eau inférieure à 17% sont stables lors de la conservation et ne fermentent pas.

L'humidité du miel varie largement en fonction de l'origine florale, du climat et de la teneur en eau du nectar et/ou du miellat (Nanda *et al.*, 2003).

En outre, comme l'humidité ambiante diffuse lentement au sein du miel, on doit éviter l'exposition à des atmosphères d'incorporation (humidité relative) pour éviter la croissance de champignons aérobies à la surface (Costa *et al.*, 1999 ; Downey *et al.*, 2005).

Etant donné que les échantillons analysés sont présents un risque de fermentation dans des mauvaises conditions de stockage.

La qualité du miel se conserve mieux lorsque celui-ci est entreposé dans un endroit frais et secs, si le miel est contenue dans les récipients non étanchée entreposé dans un endroit humide, il va absorber de l'eau ce qui peut mener à une fermentation (Cervantes *et al.*, 2000).

2.1.2. La densité relative

Les résultats concernant la densité des échantillons de miel sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau 20 : La densité des différents échantillons du miel

Echantillons	Densité g/ml
E1	1.49
E2	1.41

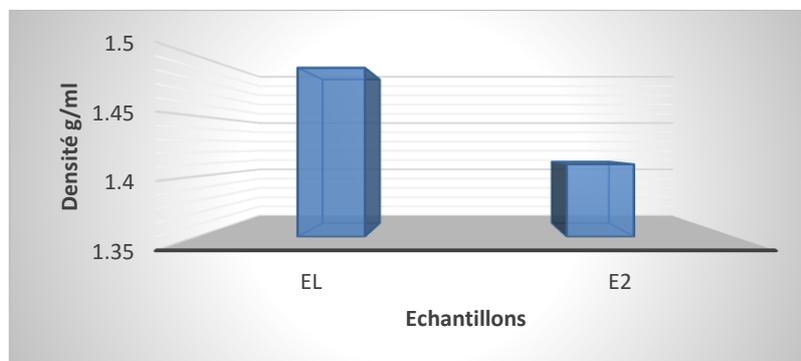


Figure31: Représentation graphique de la densité des différents échantillons du miel.

De là nous pouvons dire que tous les échantillons de miel répondent aux normes préconisées par l'Association française. (Louveaux ,1985), indique que les variations de la densité des miels proviennent surtout des variations de la teneur en eau. Plus un miel est riche en eau et moins il est dense, c'est ainsi que l'échantillon 1 présente le miel le plus dense à 1.49.

En revanche, on observe que l'échantillon 2 est le moins dense avec une densité de 1.41.

2.1.3. Le pH

Les résultats issus de cette analyse nous donnent une indication sur l'acidité des miels analysés. Les valeurs du pH sont présentées dans le tableau.

Tableau 21 : Valeurs du pH des miels étudiés

Variété du miel	pH
E1	3.80
E2	3.88

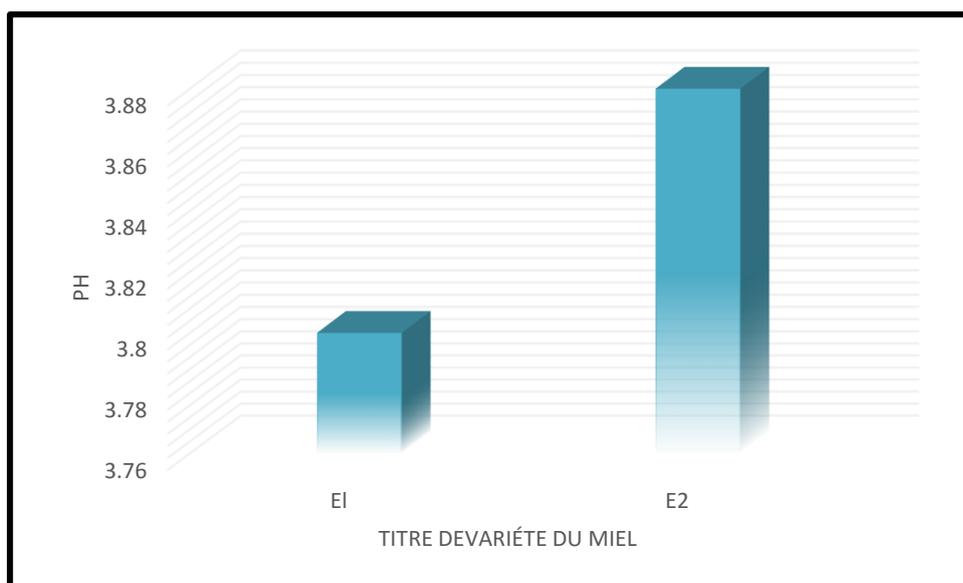


Figure32: Représentation graphique du pH des différents échantillons du miel.

Le pH ou potentiel d'hydrogène ou indice de Sorensen est défini comme le cologarithme de la concentration en ions H dans une solution. Pour le miel, est un indice de la " réactivité acide " du produit (Vanhanen et al., 2011 ; Louveaux., 1985).

Les valeurs du pH de nos échantillons de miel miels oscillent entre 3.80 et 3.88 avec une moyenne de 3.84. Donc tous les miels étudiés sont acides. Ces résultats confirment le caractère acide du miel (Nanda et al., 2003).

Les miels de nectar ont un pH faible (de 3,3 à 4,5) tandis que les miels de miellat ont un pH un peu plus élevé (**Pesenti et al., 2008**).

Il n'y a pas de limites fixes pour des valeurs de pH mais ce paramètre peut être utilisé comme une indication de l'origine botanique (**Vanhanen et al., 2011**).

2.1.4. L'acidité libre

Tableau 22: Valeurs d'acidité des deux échantillons du miel.

Miel	Acidité (még/1)
E1	5.85
E2	6.45

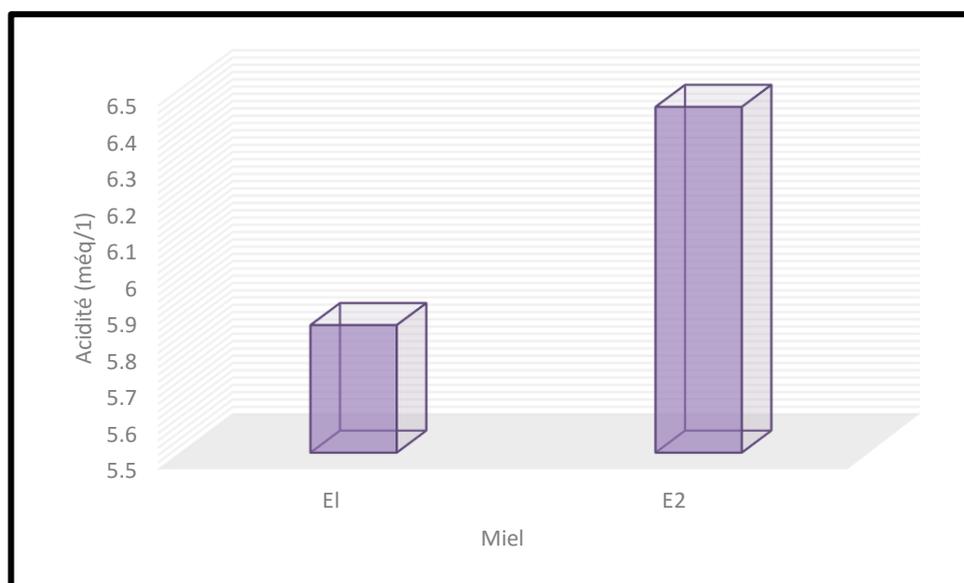


Figure33: Représentation graphique de l'acidité des différents échantillons du miel.

L'acidité est un critère de qualité important durant l'extraction et le stockage, en raison de son influence sur la texture et la stabilité du miel. Cette acidité provient d'acides organiques dont certains sont libres et d'autres combinés sous forme de lactones. Certains de ces acides proviennent du nectar ou du miellat mais leur origine principale provient des sécrétions salivaires de l'abeille; le principal acide dérive du glucose sous forme d'acide gluconique. Sa formation s'accompagne de dégagement d'eau oxygénée (**Gomes et al., 2010; Bogdanov et al., 2004 ; Louveaux, 1968**).

L'acidité libre du miel selon les normes internationales du **Codex, 2007** ne doit pas dépasser 50 milliéquivalents d'acide par 1000 g. Nos miels sont donc conformes aux normes préconisées.

Nos résultats nous ont permis d'indiquer que les miels sont de bonne qualité avec des teneurs en acide très basse inférieures aux normes du **codex 2007**.

Comme le montre le tableau, les valeurs de l'acidité sont comprises entre 5,85 et 6,45 avec une moyenne de 6,15. Selon (**White et al, 1962**) l'acidité totale du miel doit être comprise entre 6 et 59.49 méq/Kg. Nos résultats sont donc en accord avec cet intervalle (**Gonnet, 1982**) affirme que tous les miels sont acides. Ils contiennent des acides organiques libres ou combinés sous forme de lactones. Ces acides proviennent probablement de nectar ou de miellat, mais leur origine principale est recherchée dans les sécrétions salivaires de l'abeille et dans les processus enzymatiques et fermentatifs (**Louveaux, 1968 , Makhloufi 2001**).

En conclusion, beaucoup sont les facteurs qui déterminent les valeurs d'acidité des miels, mais indubitablement celui d'un plus grand poids est l'origine florale. En outre les caractéristiques saveurs et arôme sont en rapport avec l'acidité puisque cette dernière détermine le goût et la plus grande ou plus petite libération des composés volatils responsables de l'arôme (**Pataca et al., 2007; Lazarević et al., 2012**).

2.1.5. La conductibilité électrique (CE)

Les résultats de cette analyse sont mentionnés dans le tableau et la figure suivants :

Tableau 23: La conductibilité électrique des miels étudiés

Echantillons De miel	Conductibilité mS*/cm
E1	1.69
E2	1.46

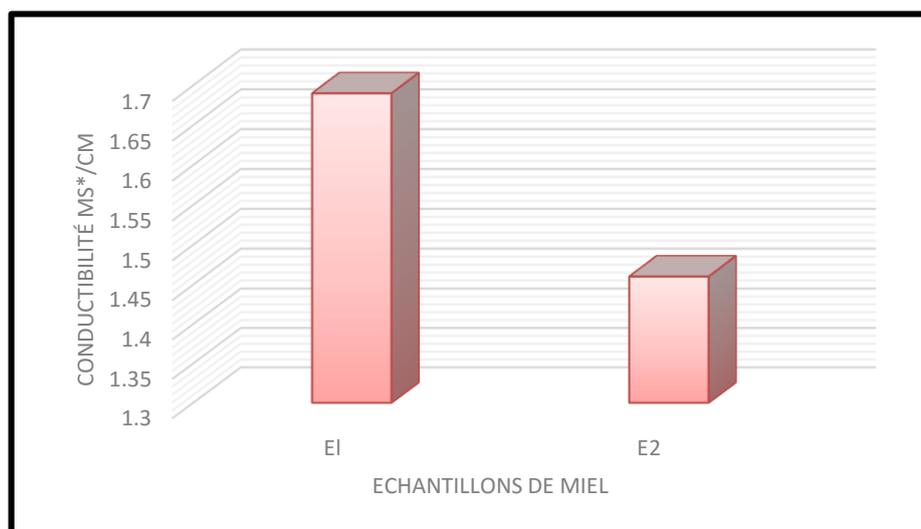


Figure 34: Représentation graphique de la conductibilité des différents échantillons du miel.

La conductivité électrique est un paramètre qui montre une grande variabilité liée à l'origine florale, il est considéré comme l'un des meilleurs paramètres pour la différenciation entre les miels de différentes origines florales (**Terrab et Heredia, 2004** ; **Terrab et al., 2004**).

D'autre part la conductibilité électrique d'un miel est en rapport avec sa couleur, selon **Gonnet (1984)** ; **Kaškonienė et al., (2010)** ; **Louvaux (1980)**, les miels foncés conduisent mieux le courant électrique que les miels clairs.

Ces derniers E1 et E2 correspondant a de valeurs 1.69 et 1.46 ms/cm. Par conséquent, les échantillons de miels pourraient être d'origine multiple (nectar et miellat). Les miels de miellat sont, en général, beaucoup plus minéralisés que les miels de nectar, donc ont une conductivité plus élevée (**Kaškonienė et al., 2010**).

La figure 34 montre que la conductivité électrique des miels étudiés est assez élevée avec des valeurs supérieures à 0,8 ms/cm.

En comparant les résultats que nous avons obtenus avec ceux précédemment publiés par d'autres auteurs, on remarque qu'ils sont inclus dans l'intervalle trouvés par **Luque (2009)** (0,155 ms/cm – 2,02 ms/cm) ainsi que celui obtenu par **Persano Oddo et Piro (2004)** (0,08 – 2,09).

2.1.6. Taux de cendre

Tableau 24 : Valeurs du teneur en cendre des deux échantillons du miel.

Miel	Cendre (%)
E1	1.5
E2	1.4

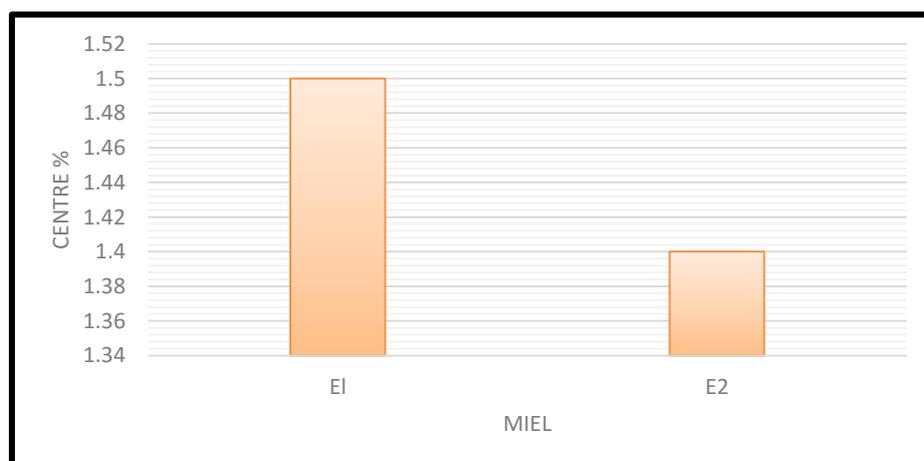


Figure 35 : Représentation graphique du taux de des différents échantillons du miel

Les cendres représentent le résidu minéral du miel après incinération. La détermination des cendres offre la possibilité de connaître la teneur en matière minérale globale du miel (Silva *et al.*, 2009).

Les résultats des analyses, révèlent que nos échantillons sont minéralisés (tableau 35). Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par (Alqarni *et al.*, 2012) qui trouvent des teneurs en cendre allant de 0,043 à 1,723%.

Les cendres sont déterminées par le contenu de substances minérales du miel. Ce contenu dépend fondamentalement et quantitativement aux caractéristiques du sol et du climat de la région d'origine du miel (Vanhanen *et al.*, 2011 ; Terrab *et al.*, 2004 ; White, 1978). (Feás *et al.*, 2011) ; White *et al.*, (1980) ; Felsner *et al.*, (2004) ont confirmé l'existence d'une relation entre la couleur des miels et leurs teneurs en cendres.

2.2. Citron

2.2.1. Teneur en eau

L'indice de réfraction du jus de citron a été calculé et ramenés à 20°C à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé Prisma-CETI convexe, il est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 25 : Teneur en eau correspondant au jus de citron.

Indice de réfraction du jus de citron	1.4755
Teneur en eau %	24.4%

L'indice de réfraction c'est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Ce rapport indique la capacité du jus de citron à réfléchir la lumière. La valeur de l'indice de réfraction de notre échantillon correspond aux normes AFNOR (1,4700 - 1,4780). Elle indique sa faible réfraction à la lumière.

2.2.2. La densité relative

La densité du jus de citron constitue un critère très important pour évaluer sa qualité dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, chimique, etc.). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'adultération.

Tableau 26 : Densité relative correspondant au jus de citron.

Jus de citron	Densité g /ml
EI	0.855

D'après le résultat du tableau 26 de la densité obtenue, on peut dire que notre jus de citron est conforme aux normes internationales. Selon l'Association Française de

Normalisation, l'espèce *Citais* doit avoir une densité maximale de 0,876 (AFNOR NF T. 75-202).

2.2.3. L'acidité libre

Le résultat issu de cette analyse est mentionné dans le tableau suivant :

Tableau 27 : Acidité correspondant au jus de citron

Acidité du jus de citron (méq/l)	84
---	----

L'acidité de jus de citron est due à la richesse en acides organique principalement l'acide citrique.

2.2.4. Le pH

La valeur du pH du jus de citron est mentionnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 28 : pH correspondant au jus de citron.

pH du jus de citron	2.15
----------------------------	------

Le pH du jus de citron est estimé à 2,54 et est extrêmement acide car il est riche en sels minéraux et en acides organiques qui donnent le goût spécifique du citron. Ce résultat est corroboré par celui obtenu par **Helali, 2008**.

2.3. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus* et *E.coli*

2.3.1. Test d'identification biochimique

Le **tableau 29** présente les résultats de la coloration de Gram, la fermentation du lactose pour (*E. coli*), des tests de catalase, de l'oxydase et coagulase pour (*S.aureus*).

Tableau 29 : résultats de l'identification biochimique pour les deux souches.

Test Souche	Coloration de Gram	fermentation du lactose	catalase	oxydase	Staphylocoagulase
<i>E. coli</i>	positif	Positif	positif	Négatif	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif		Positif	Négatif	Positif

- ✓ Comme le montre le tableau, (*S.aureus*) cocci à Gram positif, en grappes (**figure36**).

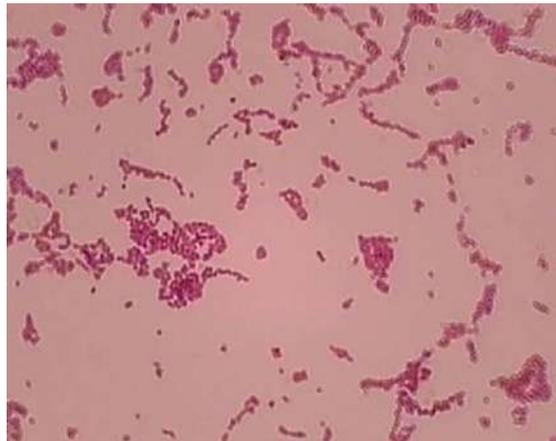


Figure 36 : coloration de Gram $\times 100$ *St.aureus*.

- ✓ *E. coli* bacille à Gram négatif

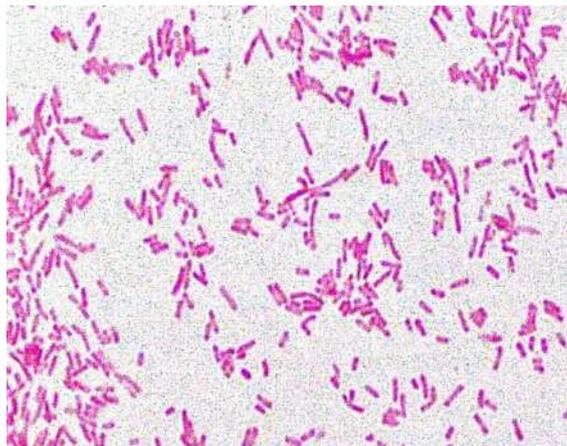


Figure 37 : Coloration de Gram $\times 100$ d'*E.coli*.

- ✓ Des réactions positives ont été observées dans la catalase.



Figure 38 : bulles visibles sur la diapositive indiquent catalase - positif pour *E. coli*.

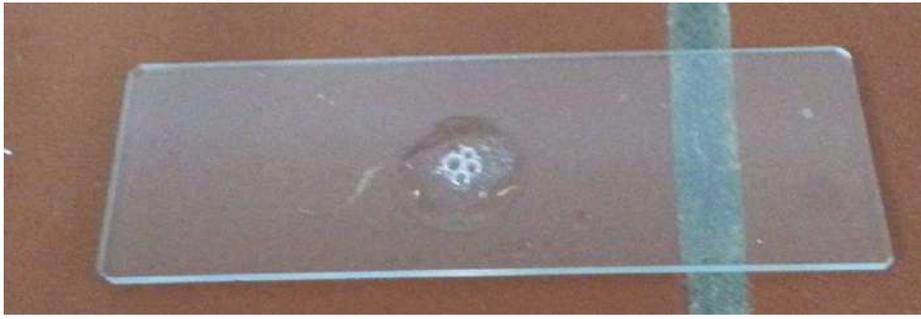


Figure 39 : bulles visibles sur la diapositive indiquent catalase - positif pour *S. aureus*

- ✓ Des réactions négatives ont été observées dans l'oxydase *E. coli*.



Figure 40 : *E. coli* oxydase négatif.

- ✓ Des réactions négatives ont été observées dans l'oxydase *S.aureus*



Figure 41 : *Staphylococcus aureus* oxydase négative.

- ✓ Réaction positive pour la fermentation du lactose (*E.coli*).



Figure 42 : fermentation du lactose avec accompagné d'un virage du milieu au jaune et un dégagement gazeux.

- ✓ Réaction positive pour staphylocoagulase



Figure 43 : coagulation de plasma dans le test staphylocoagulase.

2.4. L'activité antimicrobienne

L'impact des maladies infectieuses ne cesse de croître dans le monde. Cela est du généralement au phénomène de l'anti bio-résistance. Pour cette raison, des études récentes s'intéressent aux vertus thérapeutiques de certains produits naturels, sachant que ces derniers ne présentent pas généralement des effets secondaires. Le miel compte parmi ces produits les plus convoités. En raison de ses propriétés inhibitrices, de nombreuses études se sont intéressées aux propriétés thérapeutiques du miel; (**Badawy et al., 2005**)

Plus un miel inhibe la croissance des bactéries plus son efficacité est élevée (**Bogdanov**

et Blumer, 2001).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du miel est basée sur la CMI de différentes concentrations des différents échantillons de miel. Ces concentrations permettent de déterminer l'activité antimicrobienne du miel *in vitro*.

2.4.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel «CMI»

2.4.1.1. CMI vis-à-vis *E. coli*

Les résultats obtenus sont mentionnés dans les tableaux et figures suivants :

Tableau 30 : Valeurs en ml de la CMI des deux échantillons du miel vis-à-vis *E. coli*.

Volume du miel en ml	Volume du M.H en ml	E1	E2
1	9	R	R
2	8	R	R
3	7	CMI	CMI
4	6	S	S

S : sensible

R : résistante

CMI : concentration minimale inhibitrice

Tableau 31 : Valeurs en % de la CMI des deux échantillons du miel vis-à-vis *E. coli*.

Volume du miel en %	Volume du M.H en %	E1	E2
10	90	R	R
20	80	R	R
30	70	CMI	CMI
40	60	S	S



CMI E1 du miel vis-à-vis *E. coli*



Figure 44 : CMI des deux échantillons de miel (E1, E2) vis-à-vis d'*E. Coli*.

2.4.1.2. CMI vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Les résultats obtenus sont mentionnés dans les tableaux et figures suivants :

Tableau 32 : valeurs en ml de la CMI des deux échantillons du miel vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Volume du miel en ml	Volume du *M.H en ml	E1	E2
1	9	R	R
2	8	R	R
3	7	CMI	CMI
4	6	S	S

Tableau 33 : valeurs en % de la CMI des quatre échantillons du miel vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

Volume du miel en %	Volume du M.H en m%	E1	E2
10	90	R	R
20	80	R	R
30	70	CMI	CMI
30	60	S	S

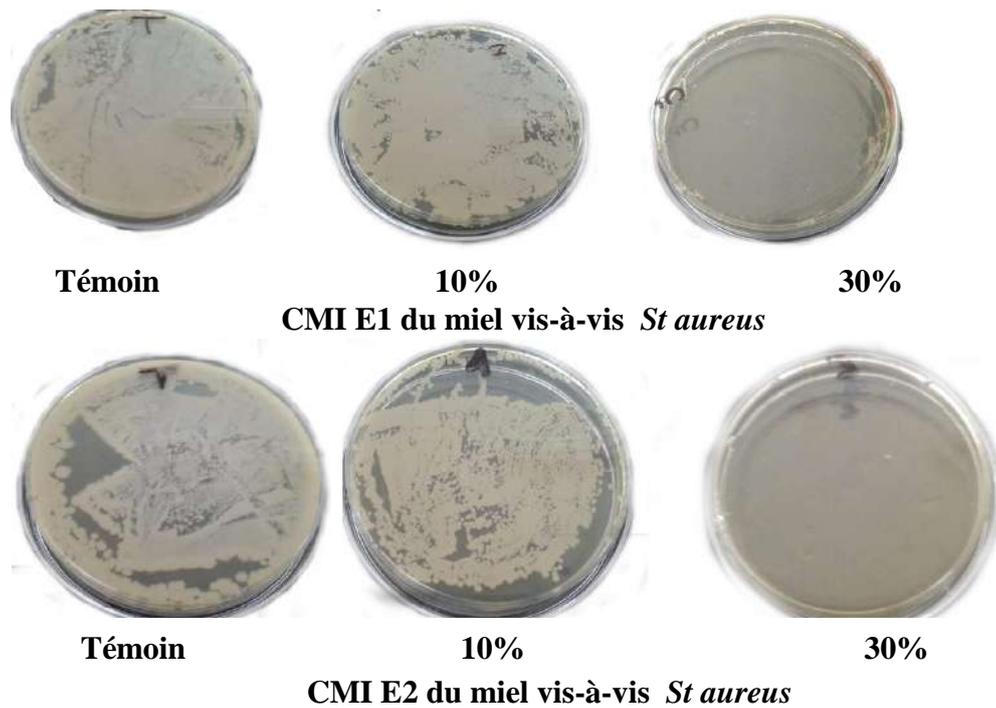


Figure N°45 : La CMI du miel des 2 échantillons E1, E2 vis-à-vis *St aureus*

Les deux variétés ont montré une forte activité inhibitrice sur les deux micro-organismes : *Escherichia coli* les CMI ont été de : 30% E1 30% (E2), et pour *Staphylococcus aureus* de 30% (E1), 30%(E2).

La figure 44 montre l'action antibactérienne des différents types de miel sur *E. Coli*. Il est facile de se rendre compte que l'inhibition est marquée principalement presque dans la concentration 30% et 40 % car on signale l'absence totale de toute croissance bactérienne de cette souche.

En revanche, *St. aureus* (gram +), c'est montrée plus sensible que *E. coli* ; d'après la **figure 45**, on remarque que l'activité inhibitrice des différentes sortes de miels sur *St.aureus* est importante pour les concentrations 30% et 40 %.

Melliou et Chinou (2011) ont confirmé que, l'activité antibactérienne du miel est révélée particulièrement efficace à fortes doses.

D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, on peut constater ce que suit :

Toutes les souches microbiennes testées sont sensibles à l'action inhibitrice des miels analysés, avec des différences d'un type à un autre et d'une souche à une autre, ce qui indique son large spectre d'action antibactérienne.

Les souches *Staphylococcus aureus* sont les plus sensibles à l'effet des échantillons de

miel, *E. coli* est moyennement sensible.

L'action du miel naturel sur les microorganismes dépend, d'une part de la structure de la paroi de la cellule cible, et d'autre part de la composition du miel lui-même (**French et al., 2005**).

La composition du miel elle-même dépend à son tour de nombreux facteurs, tels que : la nature du sol, la race des abeilles et l'état physiologique de la colonie (**Jean-Prost, 1979 ; Voidarou et al., 2011**). En fait, **Donadieu (1978) ; (2006); (1981)** a montré que chaque miel mono floral se caractérise par des propriétés thérapeutiques propres à lui. D'autres facteurs influent également sur la composition et la nature du miel et ses particularités tels que :

1. L'origine florale de l'alimentation (**Biri, 1999**);
2. Le climat de l'environnement, la saison de l'élevage de l'abeille et de la production de miel (**Fidaleo et al., 2010**);
3. Le mode d'extraction de miel (**Lee et al., 2008**);
4. La durée et les conditions de conservation, telles que la température et la lumière qui conditionnent l'activité des enzymes de miel et leur efficacité (**Caillas, 1974; Chauhan et al., 2010**)

L'activité inhibitrice du miel naturel sur *E. coli* est semblable à celle des antibiotiques les plus actifs. Concernant *Staphylococcus aureus*, une souche poly résistante aux antibiotiques, l'activité inhibitrice du miel naturel sur cette souche est excellente (deux fois plus que les antibiotiques).

Grâce à sa composition, le miel est un milieu défavorable aux microorganismes. Premièrement, cette solution concentrée de sucre retire après absorption l'eau indispensable à la vie d'agents pathogènes (**Bogdanov, 1997; Morais et al. 2011**). Deuxièmement, son degré d'acidité, valeur du pH le plus souvent faible inhibe la multiplication de bactéries (**Torres et al. 2004**).

L'eau oxygénée (H₂O₂), appelée aussi peroxyde d'hydrogène, produit de l'oxydation de l'eau et du glucose, est aujourd'hui considérée comme la principale inhibine (**Mandal et al., 2011**). D'après (**Kerkvliet ,1996**); (**Al-Habsi et Niranjana ,2012**), l'effet antimicrobien du miel peut partiellement être expliqué par son contenu important en enzyme, le glucose oxydase, qui active la transformation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène. L'enzyme reste active tous le temps de la transformation du nectar en miel. Dans le miel mûr, l'enzyme n'est plus active mais reste intacte. Si le miel est dilué avec un peu d'humidité, l'enzyme est réactivée (**Manyi-Loh et al., 2010 ; Kwakman et Zaat, 2012**). Cette idée a été annoncée depuis plus de 14 siècles par notre prophète MOHAMED qui insiste

sur "boire du miel dilué".

En revanche, la présence d'autres inhibines non peroxydes a été prouvée dans le miel mûr, par exemple les lysozymes, les flavonoïdes et des acides aromatiques (**Escuredo et al., 2012**). La flore mellifère visitée par les abeilles entre en ligne de compte comme source possible de ces inhibines non peroxydes (**Bogdanov et Blumer, 2001**).

Ces résultats montrent clairement que le miel est doté d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les souches bactériennes à Gram+ et à Gram-, ainsi que les souches fongiques testées. Cet effet inhibiteur a été constaté pour la plupart des échantillons testés avec une certaine variabilité d'un échantillon à un autre et d'une souche à une autre.

Ces résultats pourraient trouver une application possible dans le traitement des différentes maladies causées par des germes pathogènes.

La valeur médicinale du miel comme antibiotique naturel est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue l'importance de son utilisation en médecine et dans le secteur de l'industrie pharmaceutique et cosmétique (**Agbaje et al., 2006**).

2.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du jus de citron « CMI » vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Tableau 34 : Valeurs en ml de la CMI du jus de citron vis-à-vis d'*E coli* et *Staphylococcus aureus*.

Volumes de jus de citron en ml	Volumes de Muller Hinton en ml	Résultats
0.3	9.7	+
0.4	9.6	CMI
0.5	9.5	-
0.6	9.4	-
0.7	9.3	-
0.8	9.2	-
0.9	9.1	-
1	9	-

+ croissance

- inhibition

CMI concentration minimal inhibitrice

Tableau 35 : Valeurs en % de la CMI du jus de citron vis-à-vis d'*E coli* et *Staphylococcus aureus*

Volumes de jus de citron en %	Volumes de Muller Hinton en %	Résultats
0.3	9.7	+
0.4	9.6	CMI
0.5	9.5	-
0.6	9.4	-
0.7	9.3	-
0.8	9.2	-
0.9	9.1	-
1	9	-

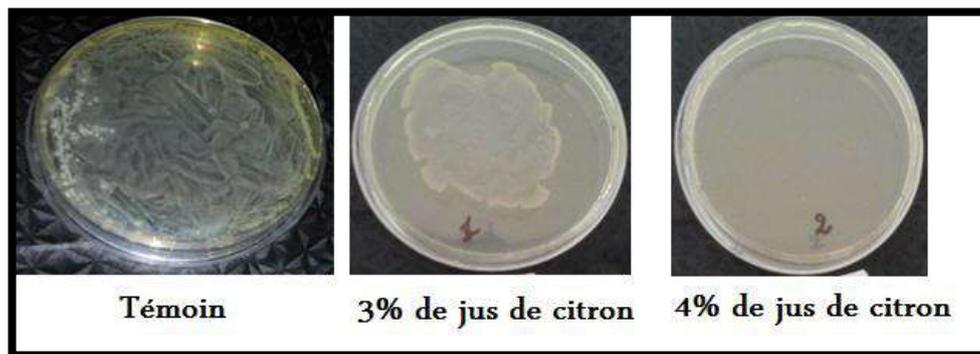


Figure 46 : CMI de jus de citron vis-à-vis *E. coli*.

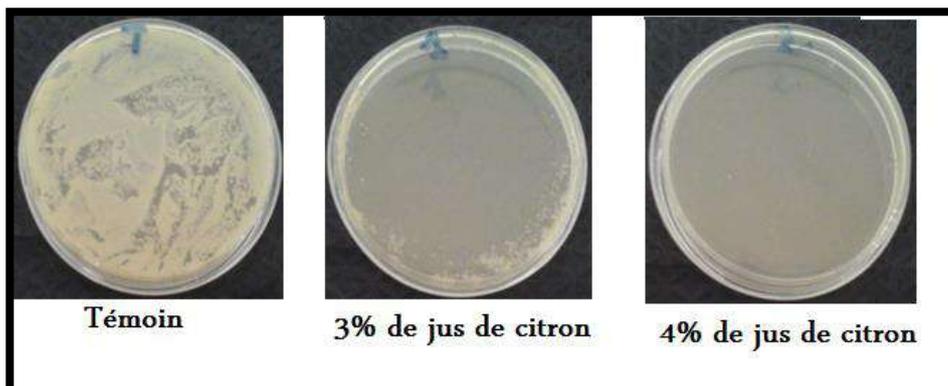


Figure 47 : CMI de jus de citron vis-à-vis *St. aureus*.

D'après les résultats obtenus, on constate que le jus de citron jaune présente une vigoureuse activité antibactérienne contre les deux bactéries *S. aureus* et *E. coli* à un volume de 0,4 ml (4 %).

Donc d'après ces résultats on peut dire que le jus de citron jaune est très efficace, il a montré une excellente activité antibactérienne vis-à-vis de *St. aureus* et *E. coli*.

- L'étude réalisée par **Idir, (2010)** a confirmé que sur cinq espèces bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Shigella Jlexneri*) *S. aureus* était l'espèce la plus sensible à l'action des huiles essentielles de citron.
- Le mécanisme d'action antimicrobien du citron est dû à une combinaison de différents composés de ce dernier.
- L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du citron a été étudiée par plusieurs chercheurs. (**Ferdeş et Ungureanu, 2012**) ont confirmé que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne. De même, (**Deb Roy et al., 2012**) ont trouvé un diamètre de zone d'inhibition, de la croissance d'*E. coli* par l'HE extraite à partir l'écorce du citron, de l'ordre de 8 mm.
- Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules bactériennes et fongiques (**Cox et al., 2000 ; Burt, 2004; Cristani et al., 2007**). Le α -terpinène et le limonène affectent la perméabilité de la membrane cytoplasmique de *Candida tropicalisa* entraînant la perte des composants cytoplasmiques de la cellule (**Adegoke et al., 2000**)
- Plusieurs auteur sont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limon* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalool (**Rodov et al., 1995 ; Alma et al., 2004 ;Bezic et al., 2005 ;Tepe et al.,2006**). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers Composants (**Deba et al., 2008**). (**Veldhuizen et al., 2006**) ont attribué cette activité aux composés phénoliques dont l'amphipathicité de ces composés peut expliquer leurs interactions avec les constituants membranaires et ainsi l'activité antimicrobienne.
- Les fruits contiennent beaucoup de substances médicales qui renferment un effet antibactérien considérable, parmi ces fruits le citron est très riche en sources de composés qui présentent une forte activité antibactérienne (**Bisignano.,Cimino.,Saija.2011**).

Les différentes variétés du citrus à savoir *Citrus limon* et *C. sinensis* et *C. bergamia* présentent un effet considérable d'inhibition de la croissance de plusieurs espèces de *Vibrio* mais à des degrés différents (**Dung et al.,2008**).

Par ailleurs, l'étude de (Fisher et Phillips, 2006), a montré que le pH du citron est aussi un facteur très important qui joue un rôle dans l'inhibition de la croissance bactérienne

Selon ces mêmes auteurs Le citron possède un grand potentiel comme agent antimicrobien contre certains microorganismes pathogènes, il peut être utilisé en médecine alternative pour le traitement de certaines infections bactériennes.

D'après (Bansode et chavon, 2012), Les flavonoïdes qui sont des substances phénoliques hydroxylées synthétisées par la plante de citronnier renferment un effet antibactérien contre un large spectre des microorganismes, cette activité est due à la capacité de ces substances de former un complexe avec les protéines extracellulaires et les stéroïdes de la membrane bactérienne, ce complexe empêche la croissance bactérienne.

Les résultats de cette étude montrent que les deux bactéries, Gram positif (*S. aureus*) et Gram négatif (*E. coli*) sont sensibles au citron, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Lambert et al., 2001).

2.4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice synergique du mélange (miel + jus de citron « CMIS » vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*)

Les tableaux (36,37) et les figures (48,49) regroupent tous les résultats dans des conditions opératoires précisées, des CMIS du mélange miel et jus de citron contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Tableau 36: Gammes de mélange en ml (miel, jus de citron) et Gélose pour *E. coli* et *S. aureus*.

Echantillons de miel	Volume du miel (en ml)	Volume du jus de citron (en ml)	Résultats de la CMI	Témoins
E1	1.6	0.4	+	+++
	1.7	0.3	+	
	1.8	0.2	+	
	1.9	0.1	CMIS	
	2	1	-	
	2.1	0.9	-	
	2.2	0.8	-	
	2.3	0.7	-	
	2.4	0.6	-	
	2.5	0.5	-	
	2.6	0.4	-	

	2.7	0.3	–	+++
	2.8	0.2	–	
	2.9	0.1	–	
E2	1.6	0.4	+	
	1.7	0.3	+	
	1.8	0.2	CMIS	
	1.9	0.1	–	
	2	1	–	
	2.1	0.9	–	
	2.2	0.8	–	
	2.3	0.7	–	
	2.4	0.6	–	
	2.5	0.5	–	
2.6	0.4	–		

+ Croissance

– inhibition

CMIS : concentration minimale inhibitrice synergique.

Tableau 37 : Gammes de mélange en % (miel, jus de citron) et Gélose pour *E. coli* et *S. aureus*.

Echantillons de miel	Volume du miel (en ml)	Volume du jus de citron (en ml)	Résultats de la CMI	Témoins
E1	16	4	+	+++
	17	3	+	
	18	2	+	
	19	1	CMIS	
	20	10	–	
	21	9	–	
	22	8	–	
	23	7	–	
	24	6	–	
	25	5	–	
	26	4	–	
	27	3	–	

	28	2	-	+++
	29	1	-	
E2	16	4	+	
	17	3	+	
	18	2	CMIS	
	19	1	-	
	20	10	-	
	21	9	-	
	22	8	-	
	23	7	-	
	24	6	-	
	25	5	-	
26	4	-		

+ Croissance

- inhibition

CMIS : concentration minimale inhibitrice synergique.



Témoin

17% miel

19% miel

3% jus de citron

1% jus de citron

CMIS du miel E1 vis-à-vis *E. coli*



Témoin

16% miel

18% miel

4% jus de citron

2% jus de citron

CMIS du miel E2 vis-à-vis *E. coli*

Figure 48 : CMIS du mélange (des deux échantillons de miel + le Jus de citron) vis-à-vis D'E. *Coli*.

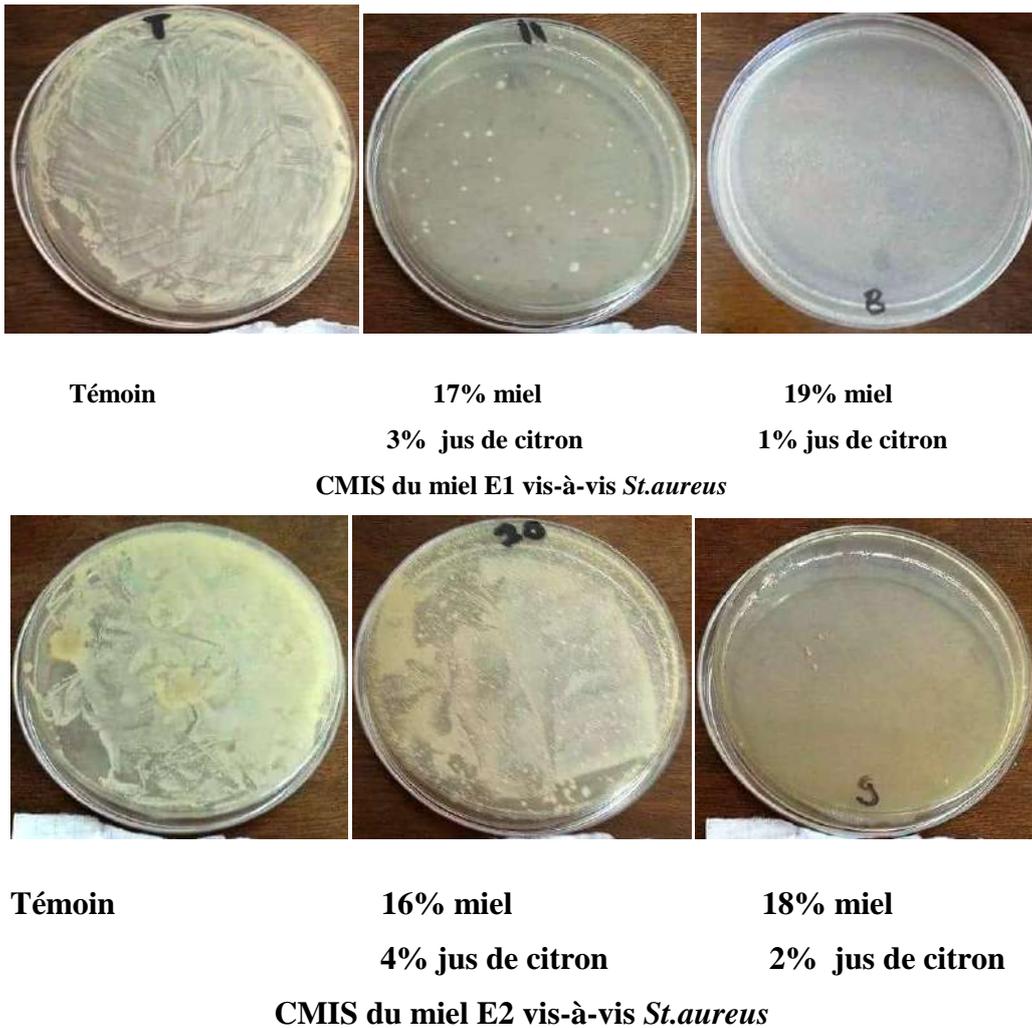


Figure 49 : CMIS du mélange (des deux échantillons de miel + le jus de citron) vis-à-vis de *S. aureus*.

Les résultats ci-avant montrent qu'il existe effectivement une action inhibitrice synergique antibactérienne du mélange miel-jus de citron que ce soit vis-à-vis d'*Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*. Cet effet synergique est dû à l'effet combiné des composants actifs du miel et du jus de citron.

Les CMIS vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* pour les deux variétés de miel sont de 18% (E2), 19% (E1) pour le miel avec 2% et 1% de jus de citron respectivement.

Il ressort aussi de ces résultats que la CMI de chaque variété de miel testé sur *Staphylococcus aureus* et *E. coli* diminue considérablement sous l'action conjointe du miel et du jus de citron.

➤ **Miel multi floral (E2)**

La concentration minimale inhibitrice «CMI» est de 30% vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *E.coli* et diminue pour atteindre 18% après l'association du miel avec le jus de citron à 2%.

➤ **Miel de Sidr (E1)**

La concentration minimale inhibitrice du miel «CMI» est de 30% vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et diminue de 11% pour atteindre 19% après l'association du miel avec le jus de citron à 1%.

Les activités de miel et de citron mélanges sont additifs et non antagonistes. Ce qui signifie que les agents agissent de façon additive. Ceci est également parce que le rapport de la concentration de chacun des agents à leurs diverses concentrations minimales inhibitrices dans les mélanges sont pas les mêmes. (Spoorthi et al., 2011).

Plus la concentration du miel et du jus de citron, meilleure est l'activité. Cependant, comme la dilution augmente, l'efficacité est réduite. Ceci est en accord aux travaux effectués par (Kawaii et al., 2000); (Ifra et Sheikh, 2009), qui a indiqué que la solution mère des échantillons de miel inhibe la croissance de tous les isolats bactériens, mais quand les dilutions ont été faites à l'efficacité réduite.

Par conséquent, comme l'a démontré de façon éclatante dans cette recherche, miel, citron et le mélange miel / citron ont été trouvés à posséder une activité antibactérienne; mais à des degrés divers. Le mélange en proportions variables a donné une meilleure activité par rapport au miel seul, de citron seul (dans certains des organismes) et de l'activité par rapport au citron dans d'autres organismes.

Selon ces résultats, nous déduisons un effet très net de la combinaison du miel et du jus de citron sur la réduction de l'activité des microorganismes testés. Ceci nous conduit à dire que l'un (miel et le jus de citron) a un effet positif sur l'autre (additif ou synergique).

Donc, il existe une synergie entre le miel et le jus de citron, quant à l'effet antibactérien, mais les paramètres qui permettent d'expliquer que cette synergie diffère selon le type de miel ne semblent pas pour le moment assez clairs et suffisants

2.5. In vivo

2.5.1. Les variations du poids représenté par le diagramme suivant :

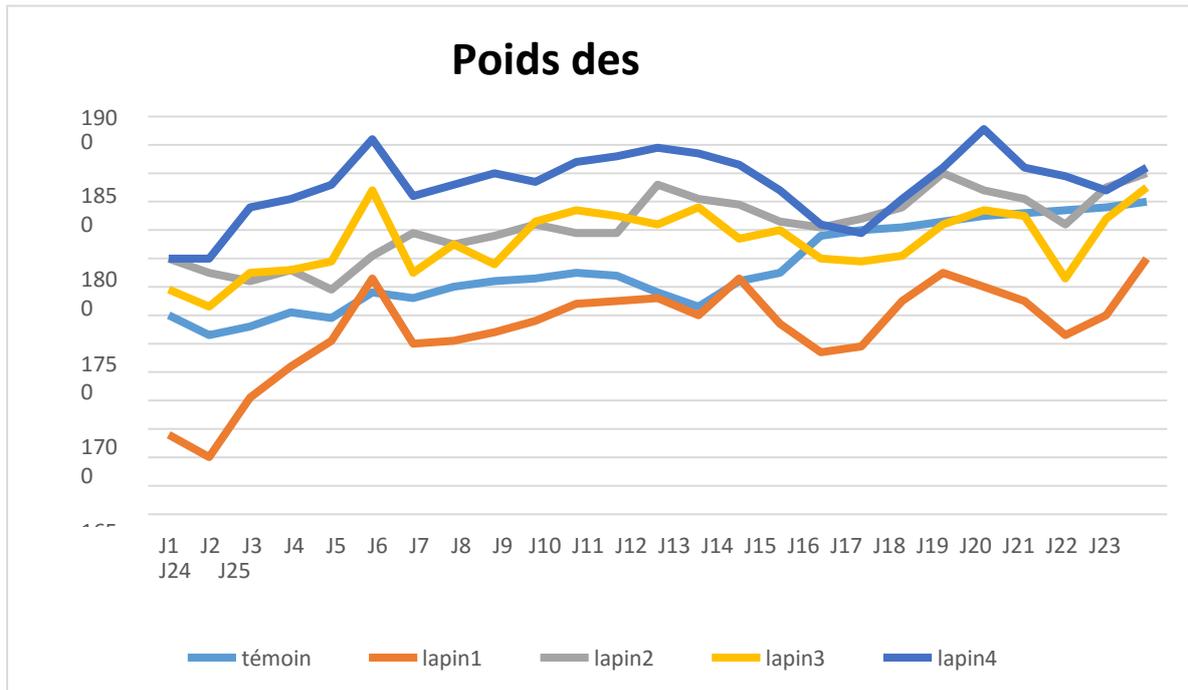


Figure 50 : poids des lapins pendant l'expérimentation.

Le poids du témoin était 1550g le premier jour de l'expérimentation, puis elle est devenue 1500g le 2^{ème} jour et le 3^{ème} jour 1560g, Après le poids augmente jusqu'à ce qu'il atteigne 1570g (le dernier jour de l'expérimentation).

Le poids du lapin1 était 1540g le premier jour de l'expérimentation, puis elle est devenue 1570g le 2^{ème} jour et le 3^{ème} jour 1575g, Après le poids augmente jusqu'à ce qu'il atteigne 1725g (le dernier jour de l'expérimentation).

Le poids du lapin2 était 1650g le premier jour de l'expérimentation, puis elle est devenue 1625g le 2^{ème} jour et le 3^{ème} jour 1610g, Après le poids augmente jusqu'à ce qu'il atteigne 1830g (le dernier jour de l'expérimentation).

Le poids du lapin3 était 1595g le premier jour de l'expérimentation, puis elle est devenue 1565g le 2^{ème} jour et le 3^{ème} jour 1625g, Après le poids augmente jusqu'à ce qu'il atteigne 1800g (le dernier jour de l'expérimentation).

Le poids du lapin4 était 1650g le premier jour de l'expérimentation, puis le deuxième jour est resté le poids de 1650g le 2^{ème} jour et le 3^{ème} jour 1740g. Après le poids augmente jusqu'à ce qu'il atteigne 1840g (le dernier jour de l'expérimentation).

D'après les résultats qui sont trouvés dans la **figure N°50**, nous n'avons constaté que tous les lapins pendant la période de l'infection (1^{er} jour) il y a eu une chute du poids corporel chez les lapins (lapin1, lapin2, lapin3, lapin4 et témoin). A partir de 2^{ème} jour (début du

traitement par miel et jus de citron), on a assisté à une prise du poids chez tous les lots (traité) mais à des fréquences différentes. Par contre le poids du témoin n'est pas constant, certains jours le poids est augmenté et autre jours le poids est diminué. Ceci est dû à plusieurs facteurs.

Le traitement par le miel et jus de citron a amélioré la prise du poids corporel en comparaison avec le témoin non traité.

2.5.2. Diamètres de la plaie du lapin :

Les variations du Diamètres de la plaie du lapin représenté par le diagramme suivant :

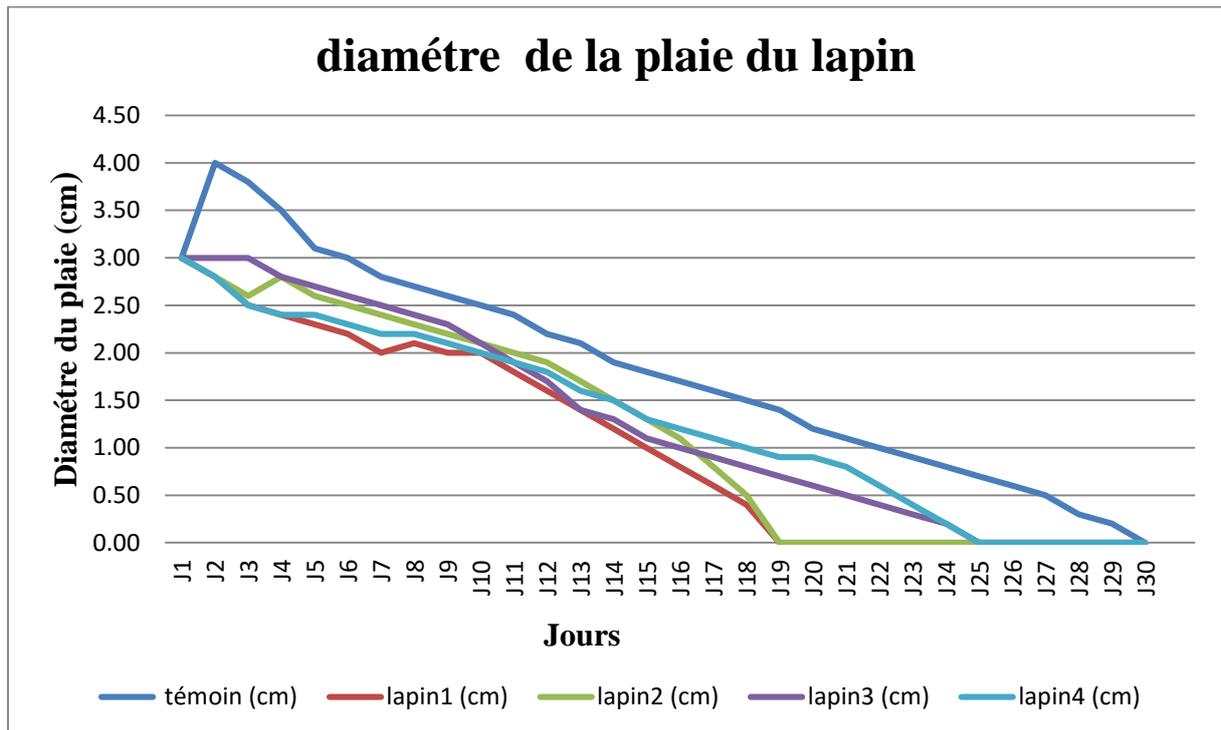


Figure 51 : les diamètres des plaies des lapins pendant l'expérimentation.

2.5.3. Dénombrement des colonies



J1

J10

J1

Figure 52 : Lapin 1 traité par miel

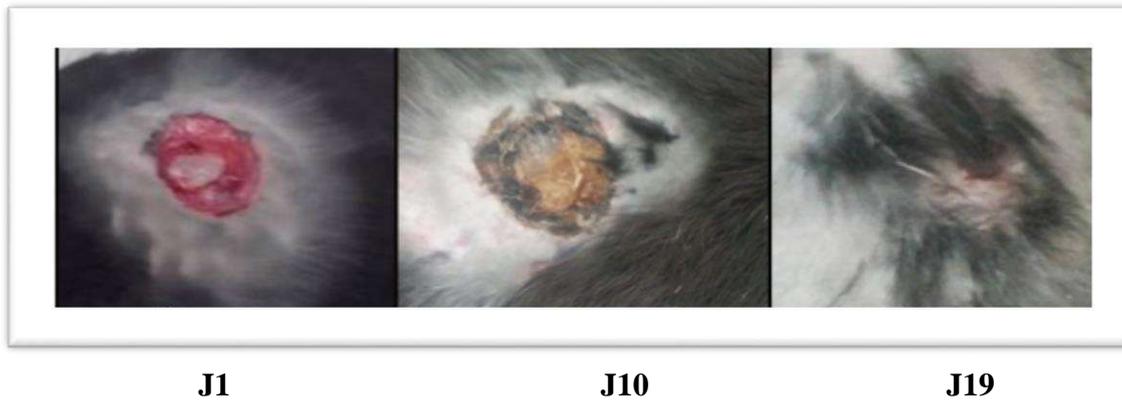


Figure 53 : lapin 2 traité par le miel

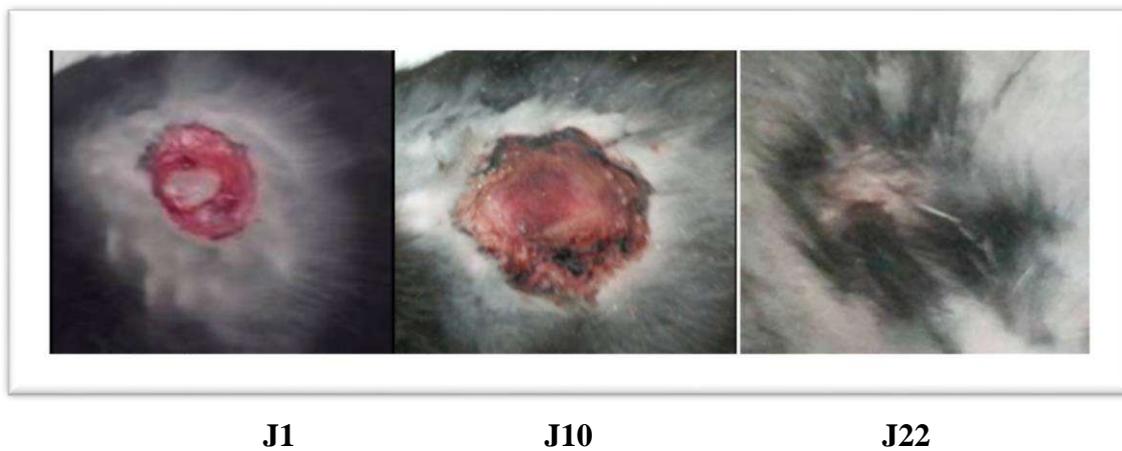


Figure 54 : lapin 3 traité par jus de citron

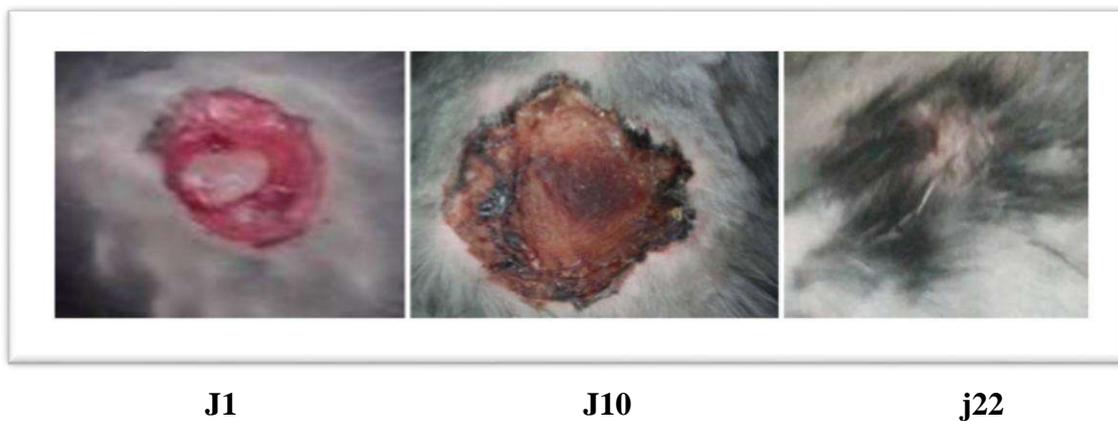


Figure 55 : lapin 4 traité par jus de citron



J1

J20

J30

Figure 56 : lapin (témoin) sans traitement.

D'après les résultats obtenus qui sont illustrés dans (les figures 52.53.54.55.56) : le miel (Sidr) a cicatrisé la plaie du lapin le 19^{ème} jour pour lapin1 et lapin2, par rapport le jus citron qui cicatrise la plaie le 25^{ème} jour pour lapin 3 et lapin4, par contre la cicatrisation de la plaie du témoin à l'état normal (sans traitement) ce fait à 30^{ème} jours.

Durant la période de l'étude expérimentale, la surface et le volume des plaies prises en charge ont été enregistrés, permettant ainsi une étude randomisée, réalisée en 1988. Elle comparait la vitesse de cicatrisation du miel à celle de la BIOGAZE® et du DEBRISAN® pour des plaies de taille égale en moyenne à 8,5 cm² (Descottes, 2009). La BIOGAZE® est un pansement gras protecteur composé d'une compresse imprégnée d'huile essentielle de niaouli et de thym, et de lanoline. Le DEBRISAN® d'extranomère est un pansement osmotique utilisé pour la détersion des plaies chroniques existant sous forme de poudre ou de pâte (Rossant, 2011).

Cette étude a permis de mettre en évidence une vitesse de cicatrisation beaucoup plus importante avec le miel (0,78 cm² par jour) qu'avec les autres traitements (0,39 cm² par jour pour la BIOGAZE® et 0,47 cm² par jour pour le DEBRISAN®). La durée moyenne de 92 cicatrisations était de 21 jours pour des plaies non infectées et de surface inférieure ou égale à 10 cm², contre 75 jours pour des plaies supérieures ou égales à 30 cm².

Les figures ci-dessus (52.53) correspondent au suivi de la cicatrisation d'une plaie chirurgicale traitée par le miel. On assiste progressivement à une détersion de la plaie, suivie du développement rapide d'une néovascularisation, et d'une prolifération fibroblastique aboutissant à la constitution de bourgeons cicatriciels qui viendront combler l'ensemble de la perte de substance. Enfin, l'épithélialisation se fait de la périphérie vers le centre de la plaie (Descottes, 2009).

Durant 25 ans d'expérience, le miel a permis une cicatrisation complète, satisfaisante et esthétique dans 98 % des cas pris en charge. Les seuls échecs rencontrés sont survenus chez des patients dont la cicatrice avait subi de la radiothérapie. De plus, le miel a montré que son application dans les plaies n'était pas douloureuse, voire entraînait une réduction partielle de la douleur. Seuls de brefs picotements disparaissant quelques minutes après l'application du miel et ne nécessitant jamais l'utilisation d'antalgiques ont été signalés par certains patients (Descottes, 2009).

Ces résultats, très satisfaisants, ont encouragé la poursuite de l'utilisation du miel qui, à ce jour, est employé de façon courante comme agent cicatrisant dans divers services du CHU.

2.5.4. Dénombrement des colonies

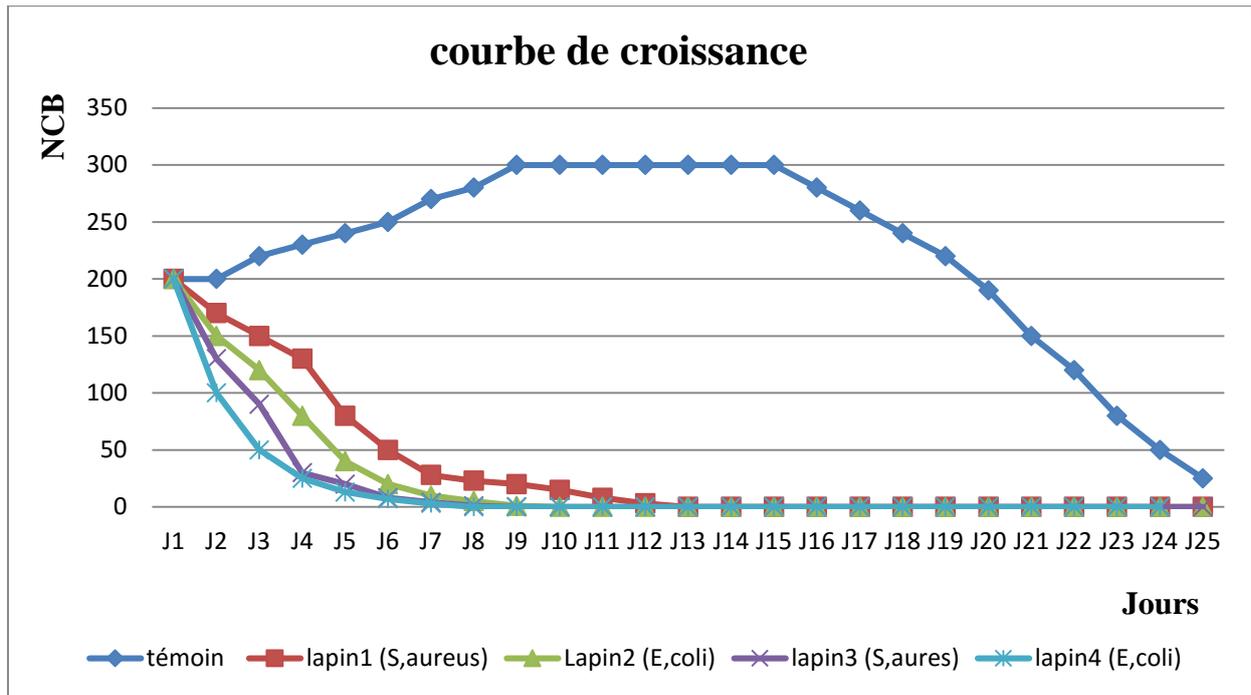
Tableau 38 : dénombrement des colonies après traitement vis-à-vis témoin.

Jour Lapin	Témoin	Lapin 1 <i>S.aureus</i>	Lapin 2 <i>E. coli</i>	Lapin 3 <i>S.aureus</i>	Lapin 4 <i>E. coli</i>
J1	+	+	+	+	+
J2	+	+	+	+	+
J3	+	+	+	+	+
J4	+	+	+	+	-
J5	+	+	+	-	-
J6	+	+	-	-	-
J7	+	+	-	-	-
J8	+	+	-	-	-
J9	+	-	-	-	-
J10	+	-	-	-	-
J11	+	-	-	-	-
J12	+	-	-	-	-
J13	+	-	-	-	-
J14	+	-	-	-	-
J15	+	-	-	-	-
J16	+	-	-	-	-
J17	+	-	-	-	-
J18	+	-	-	-	-
J19	+	-	-	-	-
J20	+	-	-	-	-

J21	+	-	-	-	-
J22	+	-	-	-	-
J23	+	-	-	-	-
J24	+	-	-	-	-
J25	-	-	-	-	-

+ Croissance

- Inhibition



➤ NCB : Nombre de Colonies Bactériennes.

Figure 57 : Effet inhibiteur de jus de citron et miel vis-à-vis *E. coli* et *S.aureus*.

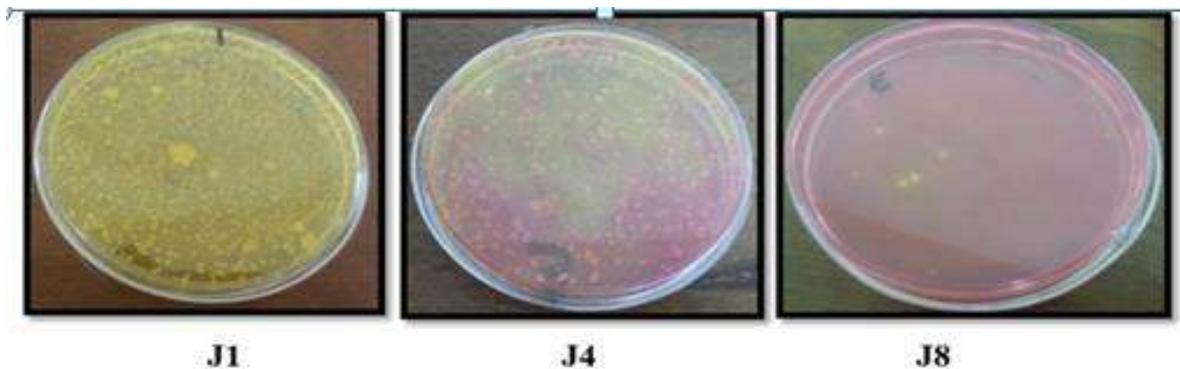


Figure 58 : inhibition de *St. aureus* au cours le traitement par le miel.



Figure 59 : inhibition d'*E. coli* au cours le traitement par le miel.

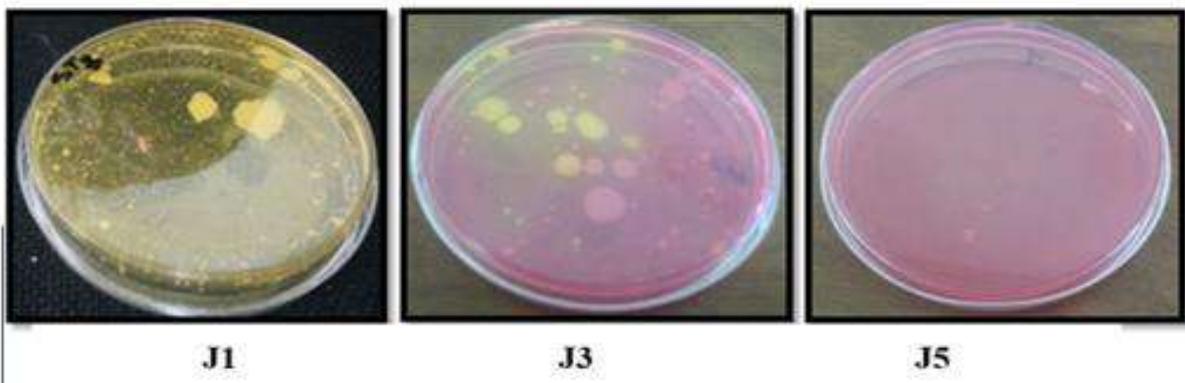


Figure 60: inhibition de *St. aureus* au cours le traitement par le jus de citron.

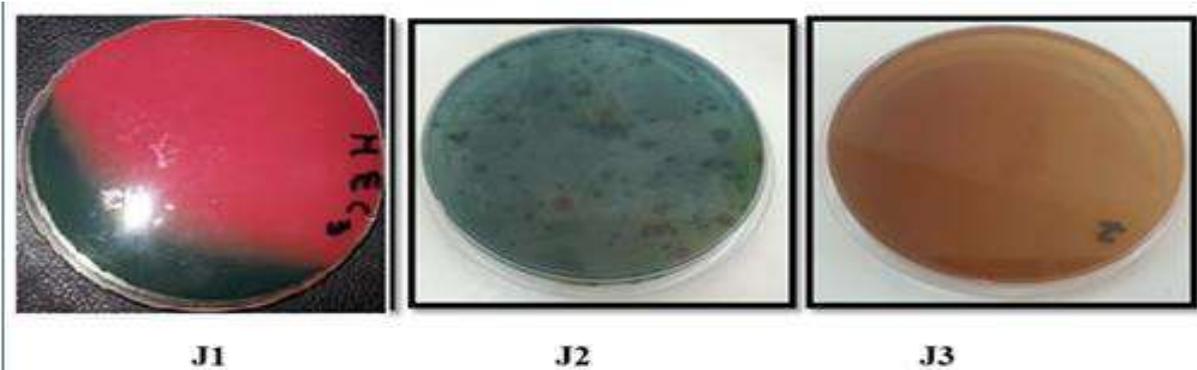


Figure 61 : inhibition d'*E. coli* au cours le traitement par le jus de citron.

D'après les résultats obtenu qui sont illustrées dans les figures (60,61) et le tableau (38) : le jus de citron a inhibé la multiplication bactérienne au niveau de la plaie le 4^{ème} jour pour *S.aureus* (lapin3) et 3^{ème} jour pour *E. coli* (lapin4) par rapport le miel qui inhibe la multiplication bactérienne au niveau de la plaie le 8^{ème} jour pour *S.aureus* (lapin1)et 5^{ème} jour pour *E. coli* (lapin2),par contre l'inhibition de la croissance bactérienne sans traitement (témoin) au niveau de la plaie le 25^{ème} jours.

Nous avons trouvé que l'activité antibactérienne du citron forte que le miel (sidr) a une concentration du 4 %.

Depuis plus de 50 ans, les produits naturels nous ont servi et dans la lutte contre les bactéries infectieuses et les champignons. Microbial et métabolites secondaires des plantes ont permis de doubler notre vie durée au cours du 20e siècle, a réduit la douleur et la souffrance, et a révolutionné la médecine (**Demain, 2009**).

Le citron est une plante médicinale importante de la famille des Rutacées. Elle est cultivée principalement pour ses alcaloïdes, qui ont des activités anticancéreuses et le potentiel antibactérien dans des extraits bruts de différentes parties (à savoir., Feuilles, tige, racine et fleur) de citron contre les souches bactériennes cliniquement significatives ont été rapportées (**Kawaii et al. , 2000**).

Une étude phytochimique et microbiologique du *citrus* a été réalisée par **Bansode et chavon, (2012)**, permettant de savoir que le citron est très riche en composés phénoliques, en huiles essentielles, en antioxydants naturels, en flavonoïdes et acides phénoliques ; ces substances possèdent une forte activité antibactérienne.

Selon **parshar et al.,2014**, l'effet antibactérien du citron est dû particulièrement aux flavonoïdes et au méthanol présent dans le citron ainsi que les phénols contenus dans les huiles essentielles et qui présentent une forte activité antibactérienne.

Selon ces mêmes auteurs Le citron possède un grand potentiel comme agent antimicrobien contre certains microorganismes pathogènes, il peut être utilisé en médecine alternative pour le traitement de certaines infections bactériennes.

Flavonoïdes d'agrumes ont un large spectre d'activité biologique, y compris antibactérienne, antifongique, antidiabétiques, anticancéreux et les activités antivirales (**Burt, 2004**). Les flavonoïdes sont en général présents dans des formes glycosylées chez les plantes, et le fragment sucre est un facteur important pour déterminer leur biodisponibilité.

Tandis que le professeur **Stol** : on constaté le miel, appliqué localement sur les muqueuses nasale et pharyngée de porteurs de bacilles diphtériques, supprimait rapidement la virulence de ceux-ci.

L'action bactériolytique du miel, est particulièrement manifeste à l'égard du bacille de *loeffler*. Non seulement le miel arrête la croissance des bacilles diphtérique, mais il modifie leur aspect, de sorte qu'ils prennent la forme de bacille pseudo diphtérique non photogène (**Masson, 2002**).

L'effet antimicrobien du miel sur des bactéries causant des diarrhées sévères dans le sud-ouest Nigérien était examiné ; les échantillons de miel utiliser était efficace pour inhiber la

croissance de tous les germes. L'effet inhibiteur des échantillons de miel sur *E. coli* était comparable à celui de l'amoxicilline (20.0mm) et du chloramphénicol (17.0mm). Il est en conséquence suggérer que dans l'absence de ces antibiotiques, le miel naturel peut être utilisé pour le traitement des diarrhées bactériales causé par les germes citées (**Adeboulu, 2005**).

Conclusion

Conclusion

Notre étude nous a permis de comparer l'effet antibactérien et cicatrisant du jus de citron et miel *in vivo* et *in vitro* vis-à-vis de deux germes pathogènes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

De déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de deux variétés de miel (Sidr et multi floral), et du jus de citron. et effet synergique antibactérien entre le miel et le jus de citron.

Cet effet varie selon le type de miel pour une même espèce bactérienne, et pour le même miel pour deux espèces bactériennes différentes et de même les concentrations du jus de citron additionnés.

Nous avons noté que la sensibilité des deux bactéries testés (*S. aureus* et *E. coli*) est plus accentuée avec le miel de Sidr qu'avec le miel multi floral avec une CMI de 30% (E1 :Sidr , E2 :multi floral). par contre le CMI du jus de citron de 4%.

Quant aux résultats des tests de la synergie avec le jus de citron ont révélées très intéressantes par son pouvoir synergique par rapport au *S. aureus* et *E. coli*. Avec une CMIS de 18% (E2), 19% (E1) pour le miel avec 2% et 1% de jus de citron respectivement.

Nous avons ainsi constaté qu'il y a un effet antimicrobien et cicatrisant du miel (Sidr) et jus de citron sur les plaies du lapin.

Le miel (Sidr) a cicatrise la plaie du lapin le 19 éme jours par contre le jus de citron a cicatrise la plaie du lapin le 25éme jours.

Le jus de citron a inhibe la multiplication bactérienne au niveau de la plaie le 4 éme jour pour *S.aureus* et 3 éme jour pour *E.coli* par rapport le miel qui inhibe la multiplication bactérienne au niveau de la plaie le 8 éme jour pour *S.aureus* et 5 éme jour pour *E.coli*.

Cet effet varie selon le type de traitement (soit miel, soit jus de citron) pour une même espèce bactérienne, et pour le même traitement pour deux espèces bactériennes différentes sur les plaies des lapins.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que le jus de citron semble être plus approprié comme agent naturel antibactérien quand il est additionné au miel. Aussi, le miel semble être approprié comme agent cicatrisant à des plaies.

Aujourd'hui nous pouvons dire que le miel est actif sur de nombreux organismes pathogènes, les expériences animales et cliniques ont montrés des résultats encourageants. Cependant les études scientifiques ne sont pas suffisamment nombreuses pour confirmer les propriétés antibactériennes et promouvoir l'usage du miel à plus grande échelle. L'enjeu est donc d'en apporter les preuves.

C'est pourquoi, devant le potentiel thérapeutique du miel, des laboratoires développent des médicaments autour de ce produit naturel et peu coûteux et mènent les études nécessaires pour en démontrer les bénéfices.

En outre, les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. De même que le jus de citron présente un pouvoir antibactérien assez important sur les souches bactériennes *S. aureus* et *E. coli*, cette activité permet à notre citron d'être utilisé comme bactéricide naturel.

Donc on peut déduire que ce miel et jus de citron de bonne qualité thérapeutique et exemptés de toute sorte de micro-organismes susceptibles d'alter leurs propriétés organoleptiques et médicinales.

Annexes

Annexe 01 : Table de **Chataway** de la relation entre indices de réfraction et teneur en eau
(Commission internationale du miel, 2002)

Teneur en eau (%)	Indice de réfraction (à 20c°)	Teneur en eau (%)	Indice de réfraction (à 20c°)
13,0	1,5044	19,0	1,4890
13,2	1,5038	19,2	1,4885
13,4	1,5033	19,4	1,4880
13,6	1,5028	19,6	1,4875
13,8	1,5023	19,8	1,4870
14,0	1,5018	20,0	1,4865
14,2	1,5012	20,2	1,4860
14,4	1,5007	20,4	1,4855
14,6	1,5002	20,6	1,4850
14,8	1,4997	20,8	1,4845
15,0	1,4992	21,0	1,4840
15,2	1,4987	21,2	1,4835
15,4	1,4982	21,4	1,4830
15,6	1,4976	21,6	1,4825
15,8	1,4971	21,8	1,4820
16,0	1,4966	22,0	1,4815
16,2	1,4961	22,2	1,4810
16,4	1,4956	22,4	1,4805
16,6	1,4951	22,6	1,4800
16,8	1,4946	22,8	1,4795
17,0	1,4940	23,0	1,4790
17,2	1,4935	23,2	1,4785
17,4	1,4930	23,4	1,4780
17,6	1,4925	23,6	1,4775
17,8	1,4920	23,8	1,4770
18,0	1,4915	24,0	1,4765
18,2	1,4910	24,2	1,4760
18,4	1,4905	24,4	1,4755
18,6	1,4900	24,6	1,4750
18,8	1,4895	24,8	1,4745
		25,0	1,4740

- Si la température de mesure est au-dessus de 20°C, additionner 0,00023 par °C. -Si la température de mesure est au-dessus de 20°C, soustraire 0,00023 par °C.

Annexe 02 : Norme concernant la qualité du miel selon le projet CL 1998/12-S du *Codex Alimentarius* et selon le projet de PUE 96/0114 (CNS)

Critères de qualité	Projet du Codex-	Projet de PUE
Teneur en eau	21 g/100g	21 g/100g
-Général	23 g/100g	23 g/100g
-Miel de bruyère, de trèfle	25 g/100g	25 g/100g
-Miel industriel ou miel de pâtisserie		
Teneur en sucres réducteurs	65 g/100g	65 g/100g
-Miels qui ne sont pas mentionnés ci-dessous	45 g/100g	60 g /100g
-Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar	53 g/100g	53 g/100g
- <i>Xanthorrhoea pr.</i>		
Teneur en saccharose apparent	5 g/100g	5 g/100g
-Miels qui ne sont pas mentionnés ci-dessous	10 g/100g	10 g/100g
- <i>Robini, Lavandula, Hedysarum, Trifolium, Zitrus, Medicago, Eucalyptus cam. Eucryphia lue. Banksia menz.</i>	15 g/100g	-
- <i>Calothamnus san., Eucalyptus scab., Banksia gr., Xanthorrhoea pr.</i> Miel de miellat et mélanges de miel de miellat et de nectar		
Teneur en matières insolubles dans l'eau	0,1 g/100g	0,1 g/100g
-Général	0,5 g/100g	0,5 g/100g
-Miel pressé		
Teneur en matières minérales (cendres)	0,6 g/100g	0,6 g/100g
-Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar, - miel de châtaignier	1,2 g/100g	1,2 g/100g
Acidité	50 meq/kg	40 meq/kg
Activité diastasique, (indice diastasique en unités de Schade)	8	8
	3	3
Après traitement et mise en pot (Codex) Tous les miels du commerce (UE)		
Teneur en hydroxyméthylfurfural Après traitement et mise en pot (Codex) Tous les miels du commerce (UE)	60 mg/kg	40 mg/kg

Annexe03 : Tableau de poids des lapins pendant les jours de l'expérimentation.

	témoin (g)	lapin1 (g)	lapin2 (g)	lapin3 (g)	lapin4 (g)
J1	1550	1340	1650	1595	1650
J2	1515	1300	1625	1565	1650
J3	1530	1405	1610	1625	1740
J4	1555	1460	1630	1630	1755
J5	1545	1505	1595	1645	1780
J6	1590	1615	1655	1770	1860
J7	1580	1500	1695	1625	1760
J8	1600	1505	1675	1675	1780
J9	1610	1520	1690	1640	1800
J10	1615	1540	1710	1715	1785
J11	1625	1570	1695	1735	1820
J12	1620	1575	1695	1725	1830
J13	1590	1580	1780	1710	1845
J14	1565	1550	1755	1740	1835
J15	1610	1615	1745	1685	1815
J16	1625	1535	1715	1700	1770
J17	1690	1485	1705	1650	1710
J18	1700	1495	1720	1645	1695
J19	1705	1575	1740	1655	1755
J20	1715	1625	1800	1710	1810
J21	1725	1600	1770	1735	1878
J22	1730	1575	1755	1725	1810
J23	1735	1515	1710	1615	1795
J24	1740	1550	1775	1720	1770
J25	1750	1650	1800	1775	1810

Annexe 04 : Table du diamètre de plaie mesuré pendant les jours de l'expérimentation.

	témoin(cm)	lapin1 (cm)	lapin2 (cm)	lapin3 (cm)	lapin4 (cm)
J1	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
J2	4,00	2,80	2,80	3,00	2,80
J3	3,80	2,50	2,60	3,00	2,50
J4	3,50	2,40	2,80	2,80	2,40
J5	3,10	2,30	2,60	2,70	2,40
J6	3,00	2,20	2,50	2,60	2,30
J7	2,80	2,00	2,40	2,50	2,20
J8	2,70	2,10	2,30	2,40	2,20
J9	2,60	2,00	2,20	2,30	2,10
J10	2,50	2,00	2,10	2,10	2,00
J11	2,40	1,80	2,00	1,90	1,90
J12	2,20	1,60	1,90	1,70	1,80
J13	2,10	1,40	1,70	1,40	1,60
J14	1,90	1,20	1,50	1,30	1,50
J15	1,80	1,00	1,30	1,10	1,30
J16	1,70	0,80	1,10	1,00	1,20
J17	1,60	0,60	0,80	0,90	1,10
J18	1,50	0,40	0,50	0,80	1,00
J19	1,40	0,00	0,00	0,70	0,90
J20	1,20	0,00	0,00	0,60	0,90
J21	1,10	0,00	0,00	0,50	0,80
J22	1,00	0,00	0,00	0,40	0,60
J23	0,90	0,00	0,00	0,30	0,40
J24	0,80	0,00	0,00	0,20	0,20
J25	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00
J26	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00
J27	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
J28	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
J29	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
J30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Composition des milieux de culture :**1. Gélose nutritif pH : 7,2**

Peptone	10g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose.....	15g
Eau distillé.....	1000ml

Autoclave 20 minutes à 121°C

2. BOUILLON NUTRITIF pH 7,2

Extrait de viande.....	5g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml

Autoclave 20 minutes à 121°C

3. Muller Hinton pH : 7,2 - 7,4

Infusion de viande de bœuf déshydratée	300 g
Hydrolysate de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar agar.....	13g
Eau distillée.....	1000ml

Autoclave 20 minutes à 115°C

4. Chapman:

Peptone.....	10g
Extrait de viande de bœuf.....	1 g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar-agar.....	15g
Eau distillé	1000ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2

Autoclave 20 minutes à 121°C

5. HEKTOEN

Peptone pepsique de viande.....	12,0 g
Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
Lactose.....	12,0 g
Saccharose	12,0 g
Salicine.....	2,0 g
Sels biliaires	9,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Citrate ferrique ammoniacal	1,5 g
Bleu de bromothymol	65 mg
Fuchsine acide	40 mg
Agar agar bactériologique	13,5 g
Eau distillé	1000ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2

Autoclave 20 minutes à 121°C

6. Eau physiologie

Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000ml

7. Bouillon lactosé au bromocresol pourpre .

Tryptone.....	5,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Lactose	5,0 g
Pourpre de bromocrésol.....	25,0 mg
Eau distillé	1000ml

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,7 ± 0,2.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

Adcock D (1962) The effect of catalase on inhibine and peroxide values of various honeys-J Apic Res 1,38-40

Adeboulou T.T, 2005. Effet of natural honey on local isolated of diarrhea-causing bacteria in southwestem Nigeria, short Communication of the Departement of microbiology, Federal University of Technology, P.M.B.704,Akure,340001,ondo State, Nigeria.

Adegoke G.O., Iwahashi H., KomatsuY., Obuchi K., Iwahashi Y. 2000. Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxicogenic moulds by monoterpenes of the spice Aframomum danielii. Flavour and Fragrance Journal 15, pp. 147–150

Agbaje O., Ogunsanya T. and Aiwerioba O. I. R. (2006). Conventional Use of Honey as Antibacterial Agent. Annals of African Medicine Vol. 5, No. 2; 2006: 78 – 81.

Agusti M (2003) : Anatomia de los citricos. Page 85-86 in: Citricultura, Madrid, Spain.

Al Alam (2008): Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales bronchiques et Staphylococcus aureus sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Reims Champagne-Ardenne.

Al-Habsi Nasser A., Niranjan Keshavan (2012). Effect of high hydrostatic pressure on antimicrobial activity and quality of Manuka honey. Food Chemistry 135 (2012) 1448–1454.

Ali Karabulut, Onder Canbolatl, Cagri O. Ozkan2 and Adem Kamalak2 (2007):

Alma M. H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F. T.,Yilmaz N. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (Pistacia vera L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(12), pp. 3911–3914

Alqarni Abdulaziz S., Owayss Ayman A., Mahmoud Awad A., Hannan Mohammed A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia Journal of Saudi Chemical Society, In Press, Corrected Proof, Available online 8 December 2012.

ALVAREZ L.M., 2010 - Honey Proteins and their Interaction with Polyphenols. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science, Univ. Brock, 93 p.

AMROUCHE Y., 2010 – Les brèves du réseau Alimentation et Technologies Agro-Alimentaires, Brèves du 10 au 24 Avril 2014.

Anonyme, (1998): Honey scientifique Rapport .Office complementary medicines'. PP: 12.

Avril J.P. (2000) : Biologie chimique, 2^{cmc} Edition : Ellipse, Paris. P : 9,11 ,20.

Bachir raho et Benali (2008): Antibacterial activity of leaf oils of Eucalyptus globulus and Eucalyptus camaldulensis. African Journal of Pharmacology, 211-215.

BADAWY O., SHASII S., THARWAT E. et KAMAL M.; Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against Escherichia coli 157:H7 and Salmonella typhimurium infection. Rcv.sci.tech.off.int.epiz. 23 (3), 1011-1022 page 1018 (2004)

Badawy O.F.H., Shafii S.S.A., Tharwat E. and Kamal A.M., (2005). Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium infection. Office international des épizooties. Vol. 23, no3, pp. 1011-1022.

Badawy O.F.H., Shafii S.S.A., Tharwat E.E., & Kamal A.M., 2005 . l'activité antibactérienne du miel d'abeille et son intérêt thérapeutique contre les infections à Escherichia coli O157 :H7 et à Salmonella typhimurium . African Journal of biotechnology vol.4(10), pp.1172-1174, octobre 2005.

Ballot- Flurin C (2009) : Miels et gelée royale, leurs origines, leurs natures, leurs compositions et leurs propriétés reconnues. Photothérapie. P : 87-90.

Ballot-Flurin C (2010) : Les bienfaits de l'apithérapie. Ed.Eyrolles. p 155.

BALTRUSAITYTE V., VENSKUTONIS P. et CEKSTERYTE V.; Antibacterial Activity of honey and beebread of different origin against S. aureus and D. epidermidis. Food technology, Lithuania. 45 (2) 201-208 (2007).

Bansode et chavon, (2012) : Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Group. pp.529-548

Barone R., Pavaux C., Blin P.C., Cuq P., 1973 : Atlas d'anatomie du lapin. Masson éditeur, Paris, 220 p.

Battinelli L, Mengoni F (2003): Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells. Spain.

Belkacemi K. (2002) : Analyse physico-chimique et bactériostatique des miels. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'études supérieures (D.E.S) en microbiologie. Université d'Oran, Essenia. P : 91.

BENEDISTE A. et BACHES M., 2002 – Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96 p.

Biri M (1999) : Le grand livre des abeilles, l'apiculture moderne, édition: Vecchi. s.a. Paris. PP: 260.

- Bisignano G., Cimino F., Saija A. 2011.** Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity. London and New York: Taylor and Francis Group. pp.529-548
- BLANC M., 2010** - Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de doctorat, Univ. Limoges, 142 p.
- Blancke .R(2001)** : Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris.p288.
- Bogdanov S, Théodore Cherbuliez, Stangaciu and Peter Gaumann (2006)** : Produit apicole et santé. ALP forum 41. Station de recherche agroscope Bielefeld-Posieux .CH-3003 Berne. PP : 52.
- Bogdanov S. (1997):** Antibacterial substances in honey; Swiss Bee Research Centre, Dairy Research Station, Liebefeld. CH-3003 Bem, Switzerland. PP: 1-10
- Bogdanov S. (1999):** Stockage, cristallisation et liquéfaction du miel. Centre Suisse de recherches apicoles, station de recherche laitières, Liebefeld, CH-3003 Berne.PP: 1-5.
- Bogdanov S. (2008)** : Substances antibactériennes du miel. Journal Américain du collège de nutrition. 30(7). P : 748-753.
- Bogdanov S. (2009):** Honey composition. Bee produc science. P : 1-12.
- Bogdanov S. et Blumer P. (2001):** Propriétés antibiotiques naturelles du miel. Centre Suisse de recherches apicoles. Station fédérale des recherches laitières. Liebefeld, CH-3003 Berne. PP: 1-8.
- BOGDANOV S., BIERI K., GREMAUD G., IFF D., KANZIG A., SEILER K., STOCKLI H. et ZURCHER K., 2003** - Produits Apicoles. 23 A Miel, 1-37.
- Bogdanov S., Bieri K., Gremaud G., Iff D., Kânzig A., Seiler K., Stöckl H. et Zürcher K. (2004):** Produits apicoles: 23A Miel, revues par le groupe d'experts « Produits apicoles». (Bogdanov S. président). Agroscope Liebefeld-Posieux, Station fédérale de recherches en production animale et laitière (ALP), Centre des recherches apicoles. Liebefeld-Beme, édition: MSDA. PP: 1-37.
- BOGDANOV S., JURENDIC T., SIEBER R. et GALLMANN P., 2008** - Honey for Nutrition and Health: a Review. American Journal of the College of Nutrition, 27, 677-689.
- Bogdanov S., Ruoff K. and Persano Oddo L. (2004 b).** Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: A review. Apidologie, 35: S4–S17.
- Bogdanov V S ; Matzke ,A 2003** . la propolis – un antibiotique naturel . Edition VDB 6235 Winikon ; 72 pp
-

Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissenhard und Technology*, 30, 748–753.

BOGDANOV. S, LULLMANN. C, MARTIN. P, (2001): *Qualité du miel et norme internationale relative au miel.* Rapport de la commission international du miel. Abeille Cie N° 71-4.1 2p.

Bonacorsi S, Houdoin V and Bingen E(2002): Facteurs de virulence associés à *Escherichia coli* responsable de méningite néonatale virulence. Factors associated with *E.coli* KI néonatal meningitis. *Arch.Pediatr*8:726-731.

Bonhomme BR(2003) : Etude de contamination des milieux internes de l'œuf par *Salmonella* stéréotype Entendis. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Créteil. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

BOUCHEUR S., NUOAILLE L., 2002 : *Maladies des lapins* 2^{ème} Edition France Agricole, Paris, 271p.

BRADBEAR N., 2005 - Apiculture et moyens d'existence durables. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. ISSN 1813-6001, Rome, 64 p.

BREBION G., CARCOUE T. et MARC RAUPHIE J. C., 1999 - L'histoire des agrumes. Ed. S.E.V.E, Service des Espaces Verts et de l'Environnement.

BRUNEAU E. Les produits de la ruche. *In Le traité rustica de l'apiculture.* Paris, Rustica, 2002, p. 354-384.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253, 2004.

Burt, S.A., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *Inter. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.

Caillas A. (1974) : Le rucher de rapport, les produits de la ruche. Edition Syn. national d'apiculture. Paris PP.543

Caillas Alain. (1974). La propolis, in *L'Abeille de France et l'Apiculteur*, Mars, 1974. P : 97-98.

Caristi, C.; Bellocco, E.; Panzera, V.; Toscano, G.; Vadalà, R.; Leuzzi, U (2003):

Carvalho, C. A. L. et al. (2009). Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (*Apidae: Meliponinae*) submitted to a dehumidification process. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, n. 1, p. 143-149.

Cervantes M. A. R., Novelo-Gonzalez S. A., and Duch- Sauri E., (2000). Effect of the temporary thermic treatment of honey on variation of the quality of the same during storage. *Apiacta*, 35:162-170.

Charbonneau P, Praz G and Glauser M(2002): Pathologies infectieuses en réanimation. Elsevier Masson. P : 168-169.

Chauhan Abhishek, Pandey Vimlendu, Chacko K. M. and Khandal R. K. (2010). Antibacterial Activity of Raw and Processed Honey. *Electronic Journal of Biology*, 2010, Vol. 5(3): 58-66

Chauvin (1968) : Traité de biologie de l'abeille. Les produits de la ruche. Tome III. Edition Masson et Cie .Paris. PP.400

Citrech.it (2014) : *Les agrumes*. Librairie Larousse, Paris, pp. 3-37.

Codex alimentarius (2007) : CX 5/10.2; CL 1993/14-SH, FAO, Rome (1993).

Codex norme pour le miel Codex Stan 1981. Norme adoptée e en 1987 et 2001, www.codexalimentarius.net/download/standards/310/cxs_012f.pdf consulter le 01/05/2008

Codex norme pour le miel Codex Stan 1981. Norme adoptée en 1981. Révisions en 1987 et 2001, www.codexalimentarius.net/download/standards/310/cxs_012f.pdf consulter le 01/05/2008

Codex stan 12-1981 : Codex norme pour le miel. PP : 10.

Codex, 2001 :PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES. Commission du Codex Alimentarius. ALINORM 01/25, 1-31

COLIN et LEBAS., 1995 : Le lapin dans le monde Edition Association Française des Cuniculteurs, Paris, 287p.

Collignon A, Beljean Leymarie M, Farinotti R et Doutremepuich C (2007) :

Corne P(2004) :*Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat en Médecin. Université de Montpellier 1. P : 04.

Costa L., Albuquerque M., Trugo L., Quinteiro L., Barth O., Ribeiro M. and De Maria C. (1999). Determination of non-volatile compound of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*, 65: 347-352.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, pp. 170-175

Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. et Micieli D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 6300-6308

Croguenne I; scuck p; brûlé G. (2006): Sciences des aliments. Edition: Lavoisier tec et doc. Volume 1. P: 87,91.

Cyril, Sylvain, Georges Détaillé (2008) : Pathologie respiratoire des rongeurs et lagomorphes de compagnie. Thèse de doctorat vétérinaire, la faculté de médecine de Créteil. Ecole national vétérinaire d'Alfort. France.

D.E. Okwi and I. N. Enienike(2006) : Evaluation of the Phytonutrients and Vita-mins Contents of Citrus Fruits. *International J. Molecular Medicine and Advancc Sciences* pl-6.

De Rodriguez G. O., De Ferrer B. S., Ferrer A. and Rodriguez B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, 84 : 599- 502.

Deb Roy S., Bania1 R., Chakraborty J., Goswami1 R., Laila R., Ahmed S. A., 2012. Pharmacognostic, phytochemical, physicochemical property and antimicrobial activity studies of lemon peel oil *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 2 (3) pp. 431-435

Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control*. 19, pp. 346–352

Debré B, Saighi D et Peyromaure M (2004) : Abrégés Urologie. Connaissances et pratique. Elsevier Masson. P : 80.

Demain AL. Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health, Inc. Med. Res. Rev. 29: 821–842, 2009.

DESCOTTES B. Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 années. *Phytothérapie*, 2009, vol. 7, n° 2, p. 112-116.

descriptive sheets, *Apidologie* 35 (Suppl. 1), S38–S81.

Détermination of Nutritive Value of Citrus Tree Leaves for Sheep Using In vitro Gas Production Technique and their rôles in human health. Nigeria.

Disponible sur <http://www.biologiq.nl/UserFiles/Compendium%20Honey%202002.pdf> (consulté le 28.01.2011).

DJAGO Y., KPODEKON M., 2000 : Le guide pratique de l'éleveur de lapin en Afrique de l'Ouest, Imprimerie 2000, Cotonou, 106p.

Doctor Universidad de Santiago de Compostela. 253 p.

Dold H, Du OH, Dziao ST (1937). Nachweis anti-bakterieller, hitze- und lichtempfindlicher Hemmungsstoffe (inhibine) im Naturhonig (Blütenhonig). *Z Hyg Infectious Kr* 120, 155-167.

DONADIEU Y et MARCHISET, (1984): la cire thérapeutique naturelle. Ed Maloine S..Paris. p 69.

Donadieu Y. (1978). Le miel, thérapeutique naturelle, Paris, 2ème édition MALOINE, p.17-8, 20-5.

Donadieu Y. (1981). Les thérapeutiques naturelles, la gelée royale. Edition: Maloine, Paris. 5eme édition, p75.

Donadieu Y. (2006). Aide-mémoire d'apithérapie, Comment traiter 64 maux courants par les produits de la ruche. Editeur Santeractive.

DONADIEU Y. *Miel* [en ligne]. 2001-2008. Disponible sur: www.01sante.com

Donadieu. (1978) : le miel thérapeutique naturel. 2^{ème} édition : Maloine s-a édition .Paris ; PP 20.

Donatus Ebere Okwu(2008) : Citrus fruits: a rich source of phytochemicals

Downey G ., Hussey K ., Kelly J.D., Walshe T.F and Martin P.G.(2005).Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico- chemical data. *Food chemistry* ,91 : 347-354

Downey G., Hussey K., Kelly J. D., Walshe T. F. and Martin P. G. (2005). Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*, 91 : 347-354.

Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C. 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 3632-3639.

EL OTMANI M., 2005 - Les Agrumes, le maraichage, et le froid hivernal. Agadir, Maroc, n° 127, 4 p.

Escuredo Olga, Silva Luis R., Valentao Patricia, Seijo Maria C., Andrade Paula B. (2012). Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry* 130 (2012) 671–678.

Euzéby JP (1998) : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

- Feás X., Pires J., Estevinho M.L., Iglesias A., Pinto de Araujo J.P. (2011).** Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: pp. 1255–1262.
- Felsner M.L., Cano C.B., Bruns R.E., Watanabe H.M., Almeida-Muradian L.B., Matos J.R. (2004).** Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 17, Issue 6, Pages 737-747.
- Fidaleo M., Zuorro A., Lavecchia R. (2010).** Honey: a natural antimicrobial agent against food borne pathogens? *Special Abstracts / Journal of Biotechnology* 150S: S1–S576.
- Fiquet A (2009) :** Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) ; un état des lieux. Mémoire CIFV. Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- Flavonoids détection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from sicilian cultivars. *Agric.*
- Foschi R, Pelucchi C, 2010.** Citrus fruit and cancer risk in a network of case-control studies.
- French V. M., Cooper R. A. and Molan P. C. (2005).** The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56, 228–231.
- Giuseppe Gattuso, Davide Barreca, Claudia Gargiulli, Ugo Leuzzi and Corrado Caristi (2007):** Flavonoid Composition of Citrus Juices. Messina, Italy.
- Gomes Susana, Luis G. Dias, Leandro L. Moreira, Paula Rodrigues, Leticia Estevinho (2010).** Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 48, Issue 2, Pages 544-548.
- Gonnet M. (1982).** Le miel : composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture, 1982 : 1-18.
- Gonnet M. (1984). Un miel de soleils. *Rev. Fr. Apic.* (434) 483-485.
- GONNET. M, VACHE. G, (1985) :** *Le gout de miel*. Ed. UNAF, Paris. 150p.
- GRASSE P. P., 1949 :** *Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie* : Ed. Masson et Cie, Paris, 979p.
- Gravet A, P couppe, O Meunier, E Clyti, B Morceau (2002):** *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impétigo produces both epidermolysin A or B. *J.Clin.Microbiologie*, 39: 4349- 4356.
- Hauffman JA, Wass C, Stins MF and Kim KS (1999) :** The capsule supports survival but traversai of *Escherichia coli* K1 across the blood-brain barrier infect immune,67 : 35-66-70.
-

HENDRIX C.M. et REDD J.B., 1995 : Chemistry and Technology of Citrus Juices and By Products. In : Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.

Hermieu JF (2007): Mise au point: urgence urologique au cours de la grossesse. Pelvi-périnéologie, P : 251-261.

Houssam et F. Mesbah (2008) : Phytothérapie. Journal N°6 mai 2008. PP : 25

Huchet emmanuzlle, C. Julie et G. Laurent (1996) : Les constituants chimiques du miel. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires. Codex-France. PP: 09

HULET S., 2003 : Point sur la filière cunicole au Bénin : perspectives d'avenir. Rapport de troisième de graduation agronomie, Option agronomie des régions chaudes, Ulg, 72p

IDIR L. (2010) : Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des espèces végétales de la région de la Kabylie. Mémoire de Magister. Option Technologie Alimentaire. Université M'hamed Bougara. Boumerdes.

Infectiologie. Vol 3^{ème} édition. Le moniteur des Pharmacies. P : 290/355.

Institut de veille sanitaire(2008): Unité des agents antibactériens. Paris Codex15

JACQUEMOND C., AGOSTINI D. et CUR K., 2009 - Des agrumes pour l'Algérie, Bureau d'ingénierie en horticulture et agro-industrie, p 4.

Jean bourquin D (2004): Imagerie thoracique de l'adulte. Elsevier Masson. P.297.

Jean-Prost P., Médori P. (2005). Miel. In « Apiculture: Connaitre l'abeille « conduire le rucher ». Edition *TEC&DOC* : 180-419.

JEAN-PROST. P, (1987): *L'apiculture. Connaitre l'abeille .conduire le rucher*. 6ème édition Lavoisier.597p.

Jeffrey .A.E et Echazarret AM (1996): Medical uses of honey. Revue vol 7, N°1. Biomed. Edition: Enero-Marzo-Mexico. PP: 49.

Jocelyn Marceau, Jean Noreau et Emil houle (1994): Les HMF et la qualité du miel. L'abeille,Vol 15,N°:02. Fédération des apiculteurs du Québec

Kaškonienė V., Venskutonis P.R., Čeksterytė V. (2010). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania LWT - Food Science and Technology, Volume 43, Issue 5, June 2010, Pages 801-807.

Kawaii, S., T. Yasuhiko, K. Eriko, O. Kazunori, Y. Masamichi, K. Meisaku, Chihirolto and F. Hiroshi (2000): Quantitative study of flavonoids in leaves of Ci-trus plants. Agric.

KENOUKON C. 2005 : Répertoire actualisé des éleveurs.-Cotonou : A. Be. C., 26p.

Kerkvliet J., Ortiz A., Ivanov T., D- Arcy B., Mossel B. and Vit P. (1996). Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. *Bee World*, 80 (2): 61–69.

Khenfer Amar et Fettal Mohamed (2001): Le miel. Institut de technique des élevages. DFRV. Alger.PP:22.

KLOFT. W, (1968) : *Les insectes producteurs de miellat, in Traité biologique de l'abeille*, Tome 3. Édition Masson de Cie, Paris. Pp : 248-262.

Koper L (2004): Maladies infectieuses .édition: Masson, Paris Million. P : 372-374.

KPODEKON M., 1988(a) : Hygiène et pathologies dans les élevages cynicoles du Bénin. In: Proceeding of the 4thcongres of the word Rabbit Science Association. Budapest, Hungary, October 10-14, 498-511

KPODEKON M., 1988(b) : Le point sur l'élevage du lapin en République Populaire du Bénin. Perspectives d'avenir.*Cuni-Sciences* 4, 15-26

KPODEKON M., TOMAGNIMENA P., 1992 : Acceptabilité de la viande du lapin en république du Bénin. *Bulletin d'information du réseau de recherche et développement cunicole en Afrique*, 1, 15-21

kristina L. Penniston, Stephen Y. Sakada, Ross P. Holmes, Dean G. Assimos (2008) : Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially-Available Fruit Juice Products.

LAMBERT R. T.W., SKANDAMIS P. N. (2001). A study of the minimim inhibitory concentration and mode of action of or egano essential oil, thy mol and carvacrol . journal of Applied Microbiology P453-462.

Landraud L and Lemichez E (2007): EDIN of *S. aureus*. Edition Lavoisier, Paris. Larousse, Paris. P: 895.

Lanzara P., Pizzetti M.: “Simon & Schuster's Guide to Trees”, 44f., A Fireside Book Published by Simon & Schuster, INC.

Lazarević Kristina B., Andrić Filip, Trifković Jelena, Tešić Živoslav, Milojković-Opsenica Dušanka. (2012). Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, Volume 132, Issue 4, Pages 2060-2064.

Le loir Y et Gautier M (2009) : *Staphylococcus aureus*. Edition Lavoisier, Paris

LEBAS F., COUDERT P., DE ROCHAMBEAU H., THÉBAULT R.G., 1996 : Le Lapin, Élevage et Pathologie (nouvelle édition révisée). FAO éditeur, Rome, 227 p

LEBAS F., COUDERT P., ROUVIER R., ROCHAMBEAU de H., 1984 : Le lapin élevage et pathologie, Edition FAO, Rome, 298p

Lee Hyungjae, Churey John J., Worobo Randy W. (2008). Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology*. 126 : 240–244.

Leminor L, Verron M (1990): Biologie médicale. 2^{ème} édition. Edition: Flammarion, France. Pp: 395-406.

Lescat M et Picard B (2007) : Place des *Escherichia coli* enterovirulents dans l'étiologie des diarrhées infectieuses : 2^{ème} partie ; identification des souches feuillet de biologie, 48 : 13-990.

Lévy-Dutel L., Scotto E., 2011 . Vivre heureux et centenaire. Groupe Eyrolles, 345p.

Lobel B soussy CJ (2007): Les infections urinaires. Springer-Verlag. Paris, France. P : 09

Loussert R., 1989. Techniques agricoles méditerranéennes, les agrumes, Vol. 1 :03-41.

Louveaux J. (1968). Composition propriété et technologie du miel. Les produits de la ruche in traité de biologie de l'abeille. Tome 03 Ed Masson et Cie. 389 p.

Louveaux J. (1980). Les abeilles et leur élevage. Edition: Hachette. Pp 1.

Louveaux J. (1985). Les produits du rucher. In « Les abeilles et leur élevage »: 165 -199.

LOUVEAUX, 1970 : Atlas photographique d'analyse pollinique des miels. Tome III. Des Annexes microphotographiques aux méthodes officielles d'analyse. Service de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité, 24 pp.p 31

LOUVEAUX. J, (1968): *Composition propriété et technologie du miel*. Les produits de la ruche, in Traité de biologie de l'abeille. Tome 03. Ed Masson et Cie. 389p.

Makhloufi C, Kerkvliet D, Ricciardelli D'albore G, Choukri A, Samar R (2010). Characterization of Algerian honeys by palynological and physicochemical methods. *Apidologie* 41:509-521.

Mandal Shyamapada, DebMandal Manisha, Pal Nishith Kumar, Saha Krishnendu. (2010). Antibacterial activity of honey against clinical isolates of *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa and *Salmonella enterica* serovar Typhi. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Volume 3, Issue 12, Pages 961-964.

Manyi-Loh Christy E., Clarke Anna M., Munzhelele Thilivhali, Green Ezekiel, Mkwetshana Noxolo F., and Ndip Roland N. (2010). Selected South African Honeys and Their Extracts Possess In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity. Archives of Medical Research. 41: 324 - 331.

Marchenay P (1984) : L'homme et l'abeille, édition: Berger Levrault. PP: 43-49

Marutiet , 2011 : *Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids,*”

Masson M, 2002. " Le miel comme antibiotique" Découvert Encyclopédie de AàZ; Reportage- 13 OCTOBER2002 [En ligne]. Disponible sur -<<http://www.academicjournals.org/AJB>> (consulter le 11.10.2007) MSDA 2004(2003): complément, novembre (2003) 23A Miel l'OFSP,264-273.

MAURIZIO. A, (1968): *La formation du miel. Les produits de la ruche, in Traité de biologie de l'abeille.* Tome 03 .Ed Masson et Cie .389p.

mediante electroforesis capilar. Memoria presentada para optar al grado de

Melliou Eleni, Chinou Ioanna (2011). Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobial activity. Food Chemistry 129: 284–290.

Mescle J. F, et Zucca J. (1996): Les facteurs de développement in Microbiologie alimentaire; Tomel, édition: Lavoisier, Technique et Documentation, Londres Paris New York. Chapitre 1 .PP: 4-33.

Meyer A, Deiana J et Beranard A (2004) : Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés. Biosciences et techniques, 2^{ème} Edition, Doin, P : 84-323. Microbiologie.2^{ème} édition. De Boeck.Université. P.28-118-297.

MIRAGLIO A. M. *Honey-Health and therapeutic qualities* [en ligne]. 2003.

Molan P. C. (2000): Establishing honey as a recognized medicine. The journal of the American apitherapy society. The following article was taken from the summer 2000 issue. Vol.7 n°1. PP: 12

Molan P. C. (2002): Honey as an antimicrobial agent. Waikato honey research unit, University of Waikato. http://honey.bio.waikato.ac.nz/honey_ref.shtml.*

Molan P.C (2001): Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. Department of biological sciences, university of Waikato, New Zealand. PP: 13

Montério R. (2007): Comment la bactérie *Escherichia coli* leurre la défense immunitaire pour envahir l'organisme. Institut national de la santé et de la recherche médicale ISERM. Volume 13. P: 1368-1374.

Mora a, Lopez C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Uerra a, Mamani R, Boncoris S, Moulin-Schouleur M, Blanco J (2009): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1: K1 : H7/ NM from human and avian origin: détection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC. Microbial*, 36-84.

Morais Margarida, Moreira Leandro, Feas Xesus, Estevinho Leticia M.(2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1096–1101.

Morgan NL, Higton G and Rockey JS (2001): *Industrial Microbiology: An Introduction* 3^{ème} édition. Wiley-Blackwell. London. UK. P: 09.

Moussa A (2007) : Evaluation *in vitro* de l'effet synergique de l'amidon sur l'activité antifongique du miel, en relation avec l'indice de diastase vis-à-vis de deux espèces pathogènes : *Candida albicans* et *Aspergillus niger* .Mémoire pour obtenir le diplôme du Magister option : Pathologie infectieuse et hygiène alimentaire, Université de Tiaret. 28p.

Mulu, Belay Tessema et Fetene Derbic (2004): In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. Gondar university .College. Gondar Ethiopia. PP: 06.

Nanda V., Sarkar B. C., Sharma H. K. and Bawa A. S. (2003). Physicochemical

National Honey Board (2005): honey. A reference guide to nature's sweetener. National honey board. PP: 08

Parfonry R., 2001. Plantes à fruits. In : Raemaekers H. (éd), *Agriculture en Afrique tropicale*, Direction générale de la Coopération internationale, Bruxelles, p. 555-588.

Pataca Luiz C.M., Neto Waldomiro Borges, Marcucci Maria C., Poppi Ronei J. (2007). Determination of apparent reducing sugars, moisture and acidity in honey by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectrometry *Talanta*, Volume 71, Issue 5, Pages 1926-1931.

Pengov A and Jurcevie A (2003): Comparison of methods to differentiate *Staphylococcus* and *Micrococcus* species isolated from bovine mammary glands. *Acta Vet*, 53: 157-160.

Persano Oddo L., Piro R. (2004). Main European unifloral honeys:

Pesenti Marion E., Spinelli Silvia, Bezirard Valérie, Briand Loïc, Pernollet Jean Claude, Tegoni Mariella, Cambillau Christian (2008). Structural Basis of the Honey Bee PBP Pheromone and pH-induced Conformational Change. *Journal of Molecular Biology*, Volume 380, Issue 1, Pages 158-169.

- Philippe J.M. (1999):** Le guide de l'apiculture. 3^{me} édition : Sari édition la calade
Planta Med. 62, 222-226,
- PRALORAN C., 1971 -** Les agrumes. Ed. editeur 8348, Paris, n° 5, p. 25.
- Prescott LM, Hartley JP, Klein DA, Bacq-Calberg CM and Dusart J (2003):**
properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in
Northern India. Journal of Food Composition and Analysis, 16: 613-619.
- Ramteke PW and Tewari S (2007):** Sérogroupes of *Escherichia coli* from drinking Water,
Env. Mon. Ass, 130: 215-220.
- Remy R, Scarniet I et Vermandere E(2002):** Le butin des butineuses. Test. Achats-
N°451.PP:16
- Rossant A (2011) :** Le miel, un composé complexe à propriétés surprenantes. Thèse pour le
diplôme de docteur en pharmacie. Université de LIMOGES. P : 133.
- ROSSANT A., DESMOULIERE A. (dir.).** Le miel, un composé complexe aux propriétés
Surprenantes. 132 p. Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : Université de Limoges : 2011.
- RUEGG M. and Blanc B., 1981 -** The water activity of honey and related solutions, Le
bensmitt. Wiss. Technol. 14, 1-6.
- Sibel Babacan et Arthur G. Rand (2007):** Characterization of honey amylase. JFSC: Food
chemistry and toxicology. PP: 10
- Silva Luís R., Videira Romeu, Monteiro Andreia P., Valentão Patrícia, Andrade Paula
B. (2009).** Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral
contents. Microchemical Journal, Volume 93, Issue 1, Pages 73-77.
- Somayeh Sadat Fakoor Janati, Hamed Reza Beheshti, Javad Feizy, Niloofar Khosh
bakht Fahim (2012):** Chemical composition of lemon (citrus limon) and peels its
considérations as animal food Mashhad, Iran.
- SPIEGEL-ROY P. et GOLDSCHMIDT E.E., 1996 :** Biology of Citrus. 1ère édition;
Edition Cambridge University Press. 239 p
- Spoorti, N. J., Vishwanatha, T., Reena, V., Divyashree, B. C., Sampath, A.,
Siddhalingeswara, K. G., ...Ramesh, I. (2011).** Antibiotic Synergy Test: Checker board
Method on Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Research Journal of
Pharmacy*, 2 (12): 196-198.
- Tan S (2009) :** Intérêt du linézolide dans les infections ostéo-articulaires à Staphylocoque.
Thèse de doctorat en médecine. Faculté de médecine. Université Paris Descartes.
-

- Tchoumboue J, Tchouamo IR, Pinta JY, Njia Mambou N. (2001).** Caracteristiques socio-economiques et techniques de l'apiculture dans les hautes terres de l'ouest Cameroun. *Tropicultura*, 66 – 72.
- Tchoumboue J., Awah-Ndukum J., Fonteh F.A., Dongock N.D., Pinta J., & Mvondo Z.A. (2007).** Physico-chemical and microbiological characteristics of honey from sudan-guinean zone of West Cameroon. *Africa J. Biotech.*, 6, 908- 913.
- Templer SJ and Brito MO (2009):** Bacterial Skin and Soft Tissue infections. *Hospital Physician*, 45: 9-16.
- Terrab , Angeles F. Recamales , Dolores Hernanz , Francisco J. Heredia (2004).** Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry* 88: 537–542.
- Terrab A. and Heredia F. J. (2004).** Characterization of avocado (*Persea americana* Mill) honeys by their physicochemical characteristics. *Journal of the*
- Theunissen.F, Grobles.S et Gedalia.L (2001):** The antifungal action of three south African honeys on *Candida albicans* .Revue: *Apidologie* N°32. Edition: INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences. PP: 397
- TOMCZAK C., 2010** - Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat, ecole nationale veterinaire, Univ. Lyon, 185 p.
- Torres, Assegid Garedeu, Erik Schmolz,, Ingolf Lamprecht (2004).** Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey—a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. *Thermochimica Acta* 415: 107–113.
- UNCTAD, 2014.** United Nations Conference on Trade and development.
- Valnet Jean, 1985.** Traitement des maladies par les légumes, fruits et les céréales. 9e Edition. Paris
- Vandecasteele J (2005):** Microbiologie pétrolière, Volume I.I^{ere} Edition, Collection IFP Publications. P : 43-45.
- Vanhanen Leo P., Emmertz Andrea, Savage Geoffrey P. (2011).** Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chemistry*, Volume 128, Issue 1, Pages 236-240.
- Veckiar SA, Protopadakis EE, Papadopoulou P,Papanicolaou D, Panou C, **Vamvakias M(2002)** : Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a Cretan lemon variety. P147-153 *Agric.*
- Vierling E., 2008.** Aliments et boissons ; Filières et produits. Doin éditeurs d'Aquitaine, France, 330 p.
-

VIRBEL-ALONSO C., 2011- Citron et autres agrumes. Ed. Groupe Eyrolles, 15 p.*

White .J. (1962): cite par lauveaux J: composition, propriétés et technologie du miel in traite de la biologie de l'abeille .Tome 3 les produits de la ruche.

White J., (1980). Hydroxyméthylfurfural and honey adulteration 1 ASSOC.OFFAMEL Chem.63.pp:7-10.

White J.et Rudyi., (1978). The protein of honey, Juicers. 17. pp: 234-238.

Wilson J, George B, Umukoro GE (2011): Effects of honey on the Histology of liver in adult wistar rats. Biology and Medicine. 3(1): 1-5

WYKES G.R. (1952). An investigation of the sugars present in the nectar of flowers of various species.*New Phytol.*, 51, 210-215

Yu J, Wang L, Walzem RL et al. 2005. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. J Agric Food Chem. Agric.

ZIEGLER. H, (1968) : *La sécrétion du nectar, in Traité biologique de l'abeille, Tome 3.* Édition Masson de Cie, Paris. Pp : 218-247.

CHOUIA Amel : Analyses polliniques et caractérisations des composés phénoliques du miel naturel de la région d'Ain zaâtout ; Mémoire de magistère en Biologie ; Biskra ; Université Mohamed Khider 2013-2014 page 31 .
