

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

Généralité sur le miel

1. Définitions.....	2
2. Sources naturelles du miel.....	3
2.1. Nectar.....	3
2.2. Pollen.....	3
2.3. Miellat.....	3
3. Composition moyenne du miel.....	4
3.1. Saccharides.....	4
3.2. Acides organiques.....	4
3.3. Acides aminés et protéines.....	4
3.4. Lipides.....	5
3.5. Sels minéraux.....	5
3.6. Enzymes.....	5
3.7. Vitamines.....	5
3.8. Pigments.....	5
3.9. Autres composants.....	6
4. Propriétés thérapeutiques.....	6
5. Propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel.....	6
5.1. Propriétés antibactériennes du miel.....	7

5.1.1. Osmolarité.....	7
5.1.2. PH acide.....	7
5.1.3. Système peroxyde d'hydrogène.....	7
5.1.4. Facteurs photochimiques.....	8
5.1.5. Défensine-1.....	8
5.1.6. Méthylglyoxal.....	8
5.1.7. Effets du miel sur certaines souches bactériennes.....	9
5.2. Propriétés cicatrisantes du miel.....	10
5.2.1. Processus en jeu.....	11
5.2.2. Réparation tissulaire favorisée.....	11

Les antibiotiques

1. Historique.....	12
2. Découverte des antibiotiques.....	12
3. Définition d'un antibiotique.....	13
4. Classification des antibiotiques.....	13
4.1. Critères de classification.....	13
4.2. Classification.....	13
4.2.1. Classification des antibiotiques selon leur origine.....	13
4.2.1.1. Fermentation ou extraction.....	13
4.2.1.2. Semi-synthèse.....	14
4.2.1.3. Synthèse chimique totale.....	14
4.2.2. Classification des antibiotiques selon la structure chimique.....	14
4.2.3. Classification des antibiotiques selon la cible bactérienne.....	14
4.2.3.1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne.....	15
4.2.3.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique.....	15
4.2.3.3. Antibiotiques agissant au niveau des ribosomes.....	15
4.2.3.4. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques.....	15
4.2.3.5. Antibiotiques agissant par autres mécanismes.....	15
4.2.4. Classification des antibiotiques selon le spectre d'activité.....	15
4.2.5. Classification des antibiotiques par famille.....	15
5. Activité antibactérienne.....	19
5.1. Mécanismes d'action antibactérienne.....	19
5.2. Spectre d'activité / sensibilité.....	20
5.3. Mode d'action antibiotique : bacteriostase / bactéricide.....	21

5.4. Effets indirects des antibiotiques.....	22
6. La résistance aux antibiotiques.....	23
6.1. Définitions.....	23
6.2. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance.....	23
6.3.Étapes du développement de résistance à grande échelle.	25
6.4. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique.....	25
6.4.1. Résistance naturelle (ou intrinsèque).....	25
6.4.2. Résistance acquise.....	26

Matériel et méthode

1. Object.....	27
2. Choix des échantillons de miel.....	28
3. Analyses physico-chimiques.....	28
3.1. Détermination de la teneur en eau par réfractomètre.....	28
3.2. Détermination de la teneur en cendres.....	29
3.3. Détermination du pH	30
3.4. Mesure le taux de l'absorbance.....	31
4. Analyse pollinique des miels.....	32
5. Choix des souches bactériennes.....	34
6. Confirmation de la pureté des souches.....	34
6.1. Observation macroscopique	34
6.2. Observation microscopique	34
7. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	36
8. Activité antimicrobienne des différents miels.....	36
8.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode de disque).....	36
8.2. Méthode des puits.....	37

Résultat et interprétation

1. Résultats d'analyses physico-chimiques.....	39
1.1. La teneur en eau ou taux d'humidité.....	39
1.2. La teneur en cendres.....	40
1.3. Détermination le pH.....	41
1.4. Détermination de l'acidité libre Acidité des lactones et acidité totale.....	42

1.5. Détermination de l'absorbance.....	43
2. L'analyse pollinique	44
3. Résultat de confirmation de l'identification des souches pathogènes.....	49
3.1. Examen macroscopique.....	49
3.2. Examen microscopique.....	49
4. Test de la sensibilité aux antibiotiques	52
5. Effet antibactérien des miels.....	55
5.1. Résultats de méthode de puits.....	55
5.2. Résultats de méthode de diffusion sur disques.....	57
Discussion.....	59
Conclusion.....	67
Référence bibliographiques.....	77

Remerciements

Louange à DIEU, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux de m'avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.

*Merci infiniment à mon encadreur **Mr. BEREUKCHE Abdelkrim** qui a dirigé ce travail et veillé à ce qu'il soit mené à terme. Je tiens surtout à vous remercier pour vos conseils qui m'ont été de grande utilité.*

*Grand et respectueux remerciement va au **Mr Halimi** d'avoir accepté de présider le jury de mon mémoire.*

*Merci aux membres du jury **Mr. BERRGUIGE M** Je vous remercie surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions et **Mr. Gallai A** pour leur présence nécessaire et utile au sein du jury.*

*De très précieux remerciements vont au **Pr. KAID Mohamed** qui n'a pas hésité de me venir humblement en aide, et de ne m'avoir jamais privé de son savoir.*

*Je tiens à remercier mes très **chers parents**, mes **frères** et ma **sœur** pour leur soutien morale et physique, ainsi que tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans ma tâche.*

*Nous remercions chaleureusement **Melle Amara S** pour ses précieux conseils.*

*Je n'oublie pas de remercier vivement les membres de l'équipe laborantine, en particulier **Melle Hakima**, **Melle Fouzia** et **Mr Ahmed** pour leur aide et soutien morale ainsi que ma collègue **Kharfia**, **Soumia**, **Benkadour** qui a partagé avec moi la vie quotidienne au sein du laboratoire.*

Une grand remercie à tous les membres du laboratoire de CACQE pour le travaille fait analyse physico-chimique.

Je remercie mes collègues de la promotion 2014-2015 et les étudiants de master II et je leur souhaite beaucoup de réussite.

A mes très chers amis Ahlam, Siham, Nadjet, Shahra zed, Zeuaouia, Ibtessam.

Finalement, je tiens à remercier à tous les enseignants d'université, qui nous ont enrichis de connaissances et de savoir.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Ma mère et mon père qui n'ont cessé de me soutenir et de m'aider à dépasser mes limites par leurs encouragements à tout moment.

Ma grand-mère Chacha qui a toujours été présents pour moi et qui ont fourni tellement d'efforts pour d'aider tout au long de ma vie.

Mes frères et soeurs : Houari, Belaid, Baghdad et sa femme, Abdelkader et sa femme .

Ma très chère sœur Neussaiba, Houria et ton marie.

Ma belle mère Kheira et mon beau père Amar pour leur soutien et leur sympathie.

Mon oncle Yahya, Djilali, Abderrahmane, boullam et tout la famées.

Mes tantes Malika, Fatna, Meriem et Mama. Mes cousins : Bébé (Omar), Mohamed, Mokhtar, Anas, Abdelfatah, Abdelraouf.

Mes ami(e)s et collègues : Habiba, Amel, Rabiaa et ton marie, Fatima, Imane, Khadidja , Fatiha, Salima.

Mon binôme Zenasni Bakhta ainsi qu'à toute sa famille

Ma promotion 2^{ème} année Master Biochimie et physiologie cellulaire.



Houryat Kaïd

Liste des abréviations

E.Coli : *Escherichia coli*.

St.auraus : *staphylocoques auraus*

P.A : *Pseudeumonas aeruginosa*

S.A : *Staphylocoques aureus*

B.S : *Bacillus Subtilus*

Gram+ : Gram positive.

Gram- : Gram négative.

ATB : Antibiotique.

CMI: concentration minimale inhibitrice

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

E.P.A : l'Effet Post-Antibiotique.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

DHPS : Dihydroptéroate synthétase.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

NAD:

EF-G: Groth Factor E

Ppm : partie par million.

H2O2 : peroxyde d'hydrogène

kDa : Kilo Dalton

MGO: méthylglyoxal

GN : Gélose nutritive

GMH: Gélose Muller-Hinton

P.H.E: point pH Equivalent

C° : Degré Celsius.

% : Pourcentage.

Liste des abréviations

ml : millilitre.

g: grame.

Kg: Kilogramme.

N: Normalité.

nm: Nanometer.

PH : potentielle hydrométrique

UE : Union Européenne.

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

MEq / Kg : milléquivalent / Killogramme.

NaOH : hydroxyde de sodium.

IR : Indice de réfraction.

UFC : Unité formant colonie.

V : Volume.

P : Poids.

ATCC: American Type Culture Collection.

Figure 1. Abeille <i>Apis mellifère</i> sur une fleur de mûrier.....	2
Figure 2. Réaction enzymatique.....	8
Figure 3. Antibiogramme permettant de tester la sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis de différents miels.....	10
Figure 4. Sélection de souches résistantes aux antimicrobiens.....	25
Figure 5. Emergence et propagation de souches résistantes.....	25
Figure 6 : schéma de révivation et purification des souches utilisées.....	35
Figure 7: Schéma de la méthode de diffusion sur disque.....	38
Figure 8 : Teneur en eau des échantillons des miels.....	39
Figure 9: Taux de cendres dans les échantillons des miels.....	40
Figure 10 : Le pH des différents échantillons de miel.....	41
Figure 11 : Acidité libre, lactone et totale des échantillons des miels.....	42
Figure 12 : Les résultats de l'absorbance de différents miels.....	44
Figure 13 : Les grains de pollen du miel de Sider et Multi fleur	46
Figure 14 : Les grains de pollen du miel d'Eucalyptus	46
Figure 15 : Les grains de pollen du miel d'Orange.....	47
Figure 16 : Les grains de pollen du miel de Forêt (Sidi bel Abbas).....	48
Figure 17 : Vue microscopique des grains de pollen du miel de Forêt (Saida).....	49
Figure 18 : l'examen macroscopique de bactéries testées.....	50
Figure 19 : coloration de Gram de bactéries testées (Gx100).....	51
Figure 20 : Test de sensibilité aux antibiotiques.....	54
Figure 21 : Les zones d'inhibition d'effet du miel étudié avec méthode de puits pour les souches testées.....	56
Figure 22 : Les zones d'inhibition de test Antibiogramme des cinq types de miel étudié avec méthode de disques pour les souches testées.....	58

Listes de tableau

Tableau 1. Détermination de l'activité antibactérienne de différents miels.....	10
Tableau2 : Date de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles.....	12
Tableau 3: Classification des antibiotiques par famille.....	17
Tableau 4 : Classification d'antibiotiques suivant leur mode d'action.....	22
Tableau 5 : Principaux antibiotiques dose-dépendants et temps-dépendants.....	23
Tableau 6. Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques.....	26
Tableau 7. Présentation des échantillons du miel étudiés.....	28
Tableau8 : présentation des souches utilisées.....	34
Tableau 9 : Les antibiotiques utilisés dans le teste antibiogramme.....	36
Tableau 10 : La teneur en eau de chaque variété de miel.....	39
Tableau 11 : La teneur en matière minérale (cendres) de chaque variété de miel.....	40
Tableau 12 : Les valeurs de pH de chaque variété de miel.....	41
Tableau 13 : L'acidité libre, acidité des lactones et acidité totale de chaque variété.....	42
Tableau 14 : Les valeurs de l'absorbance de chaque variété de miel.....	44
Tableau 15 : Résultats de sensibilité aux antibiotiques contre les microorganismes cibles.....	52
Tableau 16 : Résultats de l'activité antibactérienne de miel dilué des échantillons étudiés avec les 5 bactéries (Méthode de disques)	55
Tableau 17 : Résultats de l'activité antibactérienne de miel dilué des échantillons étudiés avec les 5 bactéries (Méthode de disques)	57

INTRODUCTION

Le miel, substance sucrée totalement naturelle, est l'un des produits issus de la ruche employée depuis des millénaires par de nombreuses civilisations, pour ses qualités nutritionnelles et ses utilisations thérapeutiques.

Au cours de l'Antiquité le miel a eu une valeur religieuse importante. Il était employé sous forme d'hydromel, boisson alcoolisée à base de miel connue comme étant la boisson des dieux.

Dans la religion musulmane, le saint coran révèle les miracles scientifiques du miel comme le stipule les versets 68 et 69 de la sourat El nahl « Prenez des demeures dans les montagnes, les arbres et les treillages que [les hommes] font. Puis mangez de toute espèce de fruits, et suivez les sentiers de votre Seigneur, rendus faciles pour vous. De leur ventre, sort une liqueur, aux couleurs variées, dans laquelle il y a une guérison pour les gens. Il y a vraiment là une preuve pour des gens qui réfléchissent. ».

Il était offert aux divinités lors de sacrifices ou construction de temples ou bien faisait partie des rituels de naissance ou de mort. Il est aussi symbole de prospérité ou d'abondance comme l'évoquait la Bible qui décrit la Terre promise comme « le pays où coulent le lait et le miel ».

Des usages médicaux sont également évoqués dans diverses pharmacopées, notamment pour le soin des plaies infectées ou pour donner du tonus.

De nos jours, devant l'essor des médecines naturelles et face à certaines pathologies résistantes aux traitements conventionnels, le miel peut être un atout grâce à ses activités thérapeutiques.

C'est pourquoi, après avoir rappelé le processus de fabrication du miel nous analyserons la composition qualitative et quantitative du miel, importante pour expliquer certaines activités. Ensuite nous ferons une synthèse des connaissances actuelles sur les propriétés générales et spécifiques du miel et notamment sur son pouvoir anti-microbien révélé *in vivo* et *in vitro*. Enfin nous citerons les mécanismes d'action potentiels expliquant ces propriétés et à quelles applications pratiques elles peuvent aboutir.

Chapitre I :

Chapitre II

Matériels et méthodes

Bibliographie

Conclusion générale

Annexes

Introduction générale

Sommaire

Résultats

Discussion

1. Définitions

Le miel est la matière sucrée recueillie par l'abeille sur les plants vivants et qu'en la modification, elle emmagasine dans ses rayons de cire (**Andria manalina F, 2003**). Définit comme étant « la denrée produite par les abeilles mellifiques à partir du nectar des fleurs ou de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou se trouvant sur elles, qu'elles butinent, transforment, combinent avec des matières spécifiques propres, emmagasinent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. Cette denrée peut être fluide, liquide ou cristallisée » (**Donnadieu, 2003**).

Le Codex alimentarius définit le miel comme suit : « le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeille(*Apis mellifère*) à partir du nectar des plants ou à partir des sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivants de plantes, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elle-même, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche(**Codex ,2001**). Autres définition indiquent que le miel est un produit par les abeilles, le miel est un assemblage complexe, fruit de l'interaction entre les fleurs butinées, le sol et les systèmes métaboliques liés à la singularité génétique des abeilles. Ce mélange de sucres, de composés phénoliques, de vitamines, d'acides aminés, d'oligoéléments et de molécules spécifiques peut lui conférer des activités biologiques particulières.

Le miel est fabriqué par les abeilles dites "mellifères", présentes un peu partout à travers le monde. Les abeilles sont des insectes appartenant à l'ordre des hymé - noptères et il en existe plus de 20 000 espèces dont une majorité ne produit pas de miel. Celles de nos contrées existent depuis l'apparition des plantes à fleurs et se sont adaptées aux climats et aux biotopes. Elles sont caractérisées par un comportement hautement social avec, au sein d'une colonie, trois castes assurant chacune une tâche particulière : la reine, les ouvrières et les faux-bourçons (Mâles). Le genre qui nous intéresse est le genre "*Apis*" dont font partie les abeilles mellifères (**figure 1**).



Figure 1 : Abeille *Apis mellifère* sur une fleur de mûrier

2. Sources naturelles du miel

L'élaboration du miel est un procédé naturel complexe (Rossant, 2010). Les éléments de base de la nourriture des abeilles sont le nectar et le pollen des fleurs, et le miellat.

2.1. Nectar

Le nectar, exsudation sucrée plus ou moins visqueuse, contient environ 90 % de sucres, les plus courants étant le saccharose, le glucose et le fructose. Les proportions de chacun d'entre eux sont relativement stables pour une même espèce végétale. Le nectar contient également des acides organiques (acides fumarique, succinique, malique, oxalique, etc.), des protéines, notamment des enzymes, des acides aminés libres (acides glutamique et aspartique, méthionine, sérine, tyrosine, etc.), et des composés inorganiques (comme les phosphates). Dans certains nectars peuvent se retrouver des composés huileux, des alcaloïdes ou des substances bactéricides. Chaque espèce végétale fournit un nectar aux caractéristiques propres qui confèrent au miel sa saveur et son parfum. Ce nectar est produit par des glandes nectarifères ou nectaires et sa quantité dépend de très nombreux facteurs dont la structure des inflorescences, la durée de floraison, l'humidité de l'air et le moment de la journée.

Dans de bonnes conditions, lorsqu'une espèce végétale produit un nectar en quantité, une colonie peut en récolter jusqu'à 5 kg par jour.

2.2. Pollen

L'appareil sexuel mâle des fleurs possède une ou plusieurs étamines, chacune étant constituée de deux parties, le filet et l'anthère qui contient les grains de pollen. Les grains de pollen représentent les gamètes mâles chez les plantes supérieures.

En moyenne, un grain renferme 20 % de protides, dont 50 % sont des acides aminés indispensables, 5 % de lipides, 36 % de glucides, 11 % d'eau et 3 % de sels minéraux (potassium, magnésium, calcium, fer, etc.). Il comporte également de nombreux pigments (caroténoïdes, rutine) et des vitamines issues des groupes B, C, D, E, et A.

Le pollen constitue la principale source de protéines pour l'abeille. Au total, 10 à 30 mg sont ramassés par voyage, travail qui peut être réalisé en dix minutes. Une ruche récolte ainsi 30 à 40 kg de pollen durant le printemps et l'été.

2.3. Miellat

Le miellat est un liquide épais et visqueux constitué par les excréments liquides des homoptères (psylles, cochenilles et surtout pucerons). Il est plus dense que le nectar, plus riche en azote, en acides organiques, en minéraux et sucres complexes. Il est récolté par les abeilles en complément ou en remplacement du nectar et produit un miel plutôt sombre,

moins humide que le miel de nectar. La récolte du miellat par les abeilles est très aléatoire, se réalisant essentiellement sur les arbres forestiers ou d'ornementation comme le sapin, l'épicéa, le pin sylvestre, le tilleul et le chêne.

3. Composition moyenne du miel

Le miel est un produit très complexe, de pH acide (entre 3,5 et 6), dont les étapes de fabrication influent sur sa composition finale. Généralement, il est constitué d'hydrates de carbone (sous formes de sucres ou polysaccharides divers) pour 80 % environ, d'eau pour 17 % environ et de divers éléments (acides organiques, acides aminés, protéines, lipides, sels minéraux, enzymes, pigments et vitamines). La matrice sucrée du miel est susceptible d'influer sur la biodisponibilité des molécules qu'elle contient.

3.1. Saccharides

Les monosaccharides avec, en moyenne, 31 % de glucose et 38 % de fructose (ou lévulose) sont les deux principaux sucres du miel. Ils proviennent en grande partie de l'hydrolyse du saccharose (présent dans le nectar ou le miellat) par l'invertase ou les acides. Parmi les disaccharides (ou diholosides) figurent le maltose (7,3 %) et le saccharose (1,3 %), mais aussi des molécules plus rares comme le kojibiose. Les tri- et polysaccharides représentent 1,5 à 8 %. Parmi eux, citons l'erlose, le raffinose, le mélizitose, le dextrantriose et le mélibiose.

3.2. Acides organiques

C'est l'acide gluconique, dérivé du glucose, qui prédomine dans le miel. Mais une vingtaine d'acides organiques tels que les acides acétique, benzoïque, citrique, lactique, malique, oxalique, butyrique, pyro glutamique et succinique y sont également représentés.

D'autres composés permanents, les lactones, assurent parallèlement une fonction acide. Des dérivés naturels de l'acide benzoïque se retrouvent en partie par million (ppm).

3.3. Acides aminés et protéines

Les acides aminés et les protéines sont présents en faible quantité dans le miel (0,26 %) et la teneur en azote est négligeable, de l'ordre de 0,041 %. Il s'agit essentiellement de peptones, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines qui proviennent soit de la plante, soit des sécrétions de l'abeille. De faibles quantités d'acides aminés libres comme la proline, la trypsine, l'histidine, l'alanine, la glycine ou la méthionine sont également retrouvées.

3.4. Lipides

La proportion de lipides est infime, sous forme de glycérides et d'acides gras (acide palmitique, oléique et linoléique).

3.5. Sels minéraux

Les matières minérales ne sont présentes qu'à un taux d'environ 0,1 % dans les miels courants, mais sont plus abondantes dans les miels foncés. Du potassium, du calcium, du sodium, du magnésium, du cuivre, du manganèse, du chlore, du soufre, du silicium, du fer ainsi que plus de trente oligo-éléments sont trouvés dans le miel. Leur teneur dépend des plantes visitées par les Abeilles ainsi que du type de sol sur lequel les végétaux poussent.

3.6. Enzymes

Les enzymes proviennent soit des nectars, soit des sécrétions salivaires de l'abeille. Les plus connues sont la gluco-invertase qui est responsable de l'hydrolyse des disaccharides, et les amylases alpha et bêta qui permettent la dégradation de l'amidon. Une catalase, une phosphatase, des enzymes acidifiantes et un glucose oxydase qui transforme le glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène coexistent.

Ces enzymes sont détruites par la chaleur. Leur présence ou leur absence peut servir d'indicateur de surchauffe du miel lorsqu'il est monté en température pour, notamment, faciliter sa manipulation, ce qui peut provoquer une Dénaturation si la température utilisée est excessive.

3.7. Vitamines

Le miel ne contient que très peu de vitamines, essentiellement des vitamines du groupe B provenant des grains de pollen en suspension, telles que la thiamine B1, la riboflavine B2, la pyridoxine B6, l'acide pantothénique B5, l'acide nicotinique B3, la biotine B8 ou H et l'acide folique B9. De la vitamine C y est également présente. Les vitamines du miel sont d'autant mieux conservées que le pH est faible.

3.8. Pigments

Les caroténoïdes et les flavonoïdes sont principalement responsables de la coloration du miel. Les flavonoïdes, qui appartiennent aux groupes des polyphénols, possèdent des propriétés anti-oxydantes très intéressantes, car ils participent à la neutralisation des radicaux libres. La quantité et le type de flavonoïdes varient selon la source florale. En règle générale, plus les miels sont foncés (comme ceux issus du tournesol, du sarrasin et de miellat), plus ils en sont riches. La pinocembrine, la pinobanskine, la chrysin, la galangine, la quercétine, la lutéoléine et le kaempférol font partie des flavonoïdes contenus dans le miel.

3.9. Autres composants

Des oligoéléments, des pollens, des spores, des algues unicellulaires, des levures osmotolérantes (responsables de la fermentation) et des champignons microscopiques peuvent également faire partie de la composition du miel. L'hydroxyméthylfurfural, substance issue de la transformation du fructose en milieu acide, est présent dans les miels anciens ou ayant subi un sur chauffage ; il peut donc constituer un marqueur de sa conservation.

4. Propriétés thérapeutiques

Certaines personnes paraissent sensibilisées au miel, qui déclenche chez elles des malaises. Cependant on attribue au miel un très grand nombre de propriétés thérapeutiques (propriété antiseptiques, antianémiques et antitussives par exemple) (**Guarch, 2008 ; Chanaud P, 2010**).

D'après certaines études, un miel riche en fructose peut même être consommé par des personnes diabétiques (**Apimondia, 2001**).

Le miel est doué d'un pouvoir bactériostatique important, de par sa haute teneur en sucres (plus de 95% de la matière sèche), sa faible teneur en eau libre (0,50 à 0,62%) et en humidité (14 à 20%), son acidité et la présence de substances à activité antibactérienne (peroxyde d'hydrogène libre et inhibine).

Cependant, lors d'un chauffage prolongé, le miel perd ses propriétés (de moitié pour un chauffage à 80°C pendant 30min, d'un quart pour un chauffage à 65°C pendant 5 minutes) (**mémoire de Mesquine M et Djebari Z. 2013**). Il est par conséquent préférable d'utiliser en thérapeutique un miel qui n'a pas été chauffé à plus de 40°C.

5. Propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel

Il a été clairement démontré que plusieurs mécanismes sont impliqués dans les propriétés antibactériennes du miel et agissent en synergie, notamment l'osmolarité, le pH acide, Le système peroxyde d'hydrogène (inhibine) et la présence de facteurs photochimiques, la défensine-1 et de méthylglyoxal. De plus, de nombreux travaux scientifiques démontrent que le miel présente des activités spécifiques favorisant les différentes phases nécessaires à la cicatrisation. Il a, plus particulièrement, un effet positif sur le débridement et une action modulatrice sur l'inflammation, favorisant ainsi la formation du tissu de granulation. Les propriétés antibactériennes du miel, connues depuis l'Antiquité, sont démontrées par des études contemporaines. Ses propriétés cicatrisantes, quant à elles, font l'objet de nombreux travaux récents de recherche.

5.1. Propriétés antibactériennes du miel

La puissante activité *in vitro* du miel observée vis-à-vis de bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de son application sur des plaies ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricide et bactériostatique (**Olaitan P.B et al, 2007**). Bien que tous les mécanismes impliqués ne soient pas totalement connus, aujourd'hui six facteurs principaux sont décrits (**Kwakman PH et Zaat SA, 2012**).

5.1.1. Osmolarité

L'osmolarité est la conséquence de la forte teneur en sucre du miel. En effet, il est connu qu'une osmolarité importante, induite par une forte teneur en sucre, présente un effet bactéricide et favorise la cicatrisation (**Archer HG et al, 1990**). Le miel agit donc de manière osmotique, en provoquant une forte déshydratation des germes qui n'ont alors plus suffisamment d'eau pour survivre. Cependant, il est intéressant de noter qu'à osmolarité équivalente avec une solution de sucre, le miel est plus efficace pour inhiber la prolifération de nombreux germes et notamment celle des staphylocoques à coagulas négative (**French VM et al, 2005**).

5.1.2. PH acide

Le pH du miel est relativement acide, situé entre 3,5 et 6. Même si de nombreuses bactéries sont capables de supporter un pH bas, ce pH semble être efficace pour ralentir ou éviter la croissance de certaines espèces de bactéries pathogènes.

5.1.3. Système peroxyde d'hydrogène

La principale "inhibine" que contient le miel est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) encore appelé eau oxygénée. De nombreuses études ont été réalisées pour apprécier le rôle du peroxyde d'hydrogène dans les effets antibactériens du miel (**Brudzynski K, 2006**). Il s'agit d'un très bon antiseptique, produit par réaction enzymatique. C'est la glucose-oxydase sécrétée par les glandes hypo pharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel qui permet cette réaction (**figure 2**). La production d'eau oxygénée et d'acide gluconique résulte de l'oxydation de l'eau et du glucose. L'eau oxygénée produite a donc une origine végétale grâce au glucose provenant du nectar des plantes, mais sa formation implique une enzyme d'origine animale, la glucose-oxydase, qui est sécrétée par l'abeille.

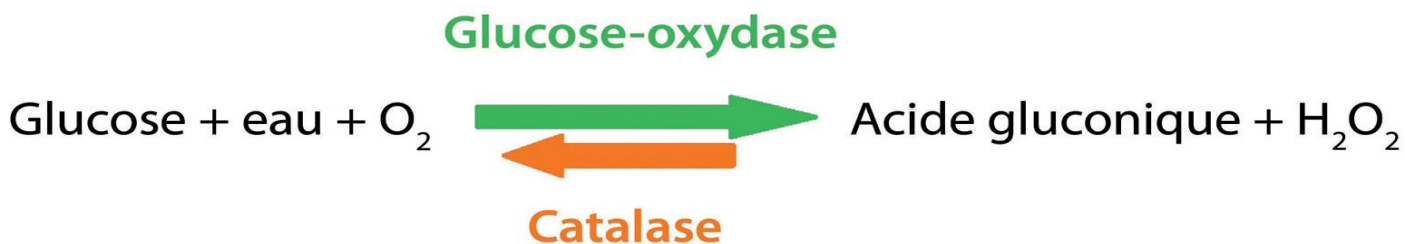


Figure 2. Réaction enzymatique.

L'acide gluconique formé accroît l'acidité du miel et le rend ainsi peu favorable au développement de colonies bactériennes. Lors de l'application de miel, la libération de peroxyde d'hydrogène s'opère de façon lente et prolongée, permettant ainsi une action locale efficace. L'action du peroxyde d'hydrogène contenu dans le miel sur des bactéries résistantes (*Staphylocoques aureus* résistant à la pénicilline et quatre souches d'*Entérocoques faecium* résistantes à la vancomycine) prélevées dans des plaies infectées a été récemment soulignée (Brudzynski K, Lannigan R, 2012).

5.1.4. Facteurs photochimiques

Parmi les facteurs photochimiques se retrouvent les huiles essentielles des nectars de fleurs dont le pouvoir antibactérien est déjà connu, comme le thymol du thym ou la pinocembrine, flavonoïde identifié récemment dans une douzaine de miels. De par son effet antiseptique, Cette dernière jouerait un rôle important dans le maintien de l'hygiène à l'intérieur de la ruche. D'autres composés ayant une activité antibactérienne ont été identifiés dans le miel mais ils sont en quantité trop faible pour contribuer de manière significative à cette activité.

5.1.5. Défensine-1

La défensine-1 est une protéine fabriquée par les glandes hypo pharyngiennes et mandibulaires des abeilles. Elle est retrouvée dans le miel et la gelée royale. Chez l'homme, les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité innée. Ce sont des petits peptides, de masse moléculaire variant de 3,5 à 6 kDa, qui possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne. Il a été montré récemment que la grande majorité des propriétés antibactériennes du miel provient de cette protéine (Kwakman PH *et al*, 2010).

5.1.6. Méthylglyoxal

Le méthylglyoxal (MGO) est un antibactérien naturel retrouvé en particulier dans le miel de Manuka (*Leptospermum scoparium*, encadré 1).

5.1.7. Effets du miel sur certaines souches bactériennes

Il n'est pas aisé de quantifier la contribution des différents facteurs qui interviennent car ils peuvent avoir une activité redondante, être mutuellement dépendants, ou présenter une action additive ou synergique selon l'espèce bactérienne ciblée (**Kwakman PH et al, 2012**). Tous les miels n'ont pas la même activité antibactérienne.

Au Laboratoire départemental d'analyses et de recherche de la Haute-Vienne, de nombreux travaux sont réalisés, notamment des antibiogrammes. Généralement, quatre souches de bactéries sont testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Entérocoques faecalis*, *Staphylocoques aureus*) afin de déterminer

Précisément l'activité antibactérienne de différents d'un ou plusieurs miels et à observer les conséquences miels. Le principe consiste à placer un milieu de culture (une gélose) contenant la bactérie à tester en présence sur le développement et la survie de celle-ci. En fonction du diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne, les différentes bactéries ont été classées : "sensibles" si la zone d'inhibition est supérieure à 12 mm, "modérément sensibles" si elle est comprise entre 6 et 11 mm, "résistantes" si elle est inférieure à 5 mm (**figure 3**). Dans le *tableau 1* sont répertoriés quelques résultats ainsi obtenus. Au vu des valeurs présentées, les quatre bactéries testées sont toutes "sensibles" ou "modérément sensibles" aux différents miels testés. En revanche, une activité antibactérienne croissante entre le miel de colza, le miel de lavande et le miel de thym est observée. De plus, des travaux sur microplaque permettent d'évaluer la croissance bactérienne et d'étudier plusieurs concentrations de miel sur différentes souches de bactéries afin de déterminer la concentration minimale efficace nécessaire pour l'inhiber. Habituellement, trois souches de bactéries sont utilisées (*Staphylocoques aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). De nombreuses recherches ont été effectuées pour déterminer un spectre antibactérien du miel en vue de l'appliquer sur des plaies contaminées par les germes sensibles. Les espèces les plus sensibles sont les *Streptocoques pyogènes*, *Staphylocoques aureus* et *Escherichia coli*. Les autres espèces telles qu'*Entérocoques faecalis*, *Klesiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus species*, *Clostridium welchii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Clostridium tetani* ont une sensibilité moindre au miel. Ainsi, le spectre d'activité est large, intéressant les germes Gram positifs et négatifs, aérobies et anaérobies (**Olaitan P.B et al, 2007**) dont *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Cooper R et al, 2012**). Il existe cependant des différences selon le type de miel employé (**Nasir NA et al, 2010**). Souvent, le miel reste actif sur les staphylocoques méthicilline-résistants ainsi que sur les entérobactéries (**Kwakman PH et al,**

2008), ce qui présente un intérêt pour la prise en charge des plaies chroniques et des infections au niveau des sites opératoires.

Cependant, il a été récemment montré que, chez des patients hospitalisés en unités de soins intensifs, le miel ne modifie pas la colonisation bactérienne de la peau au niveau des sites d'insertion des cathéters veineux (Kwakman PH *et al*, 2012).

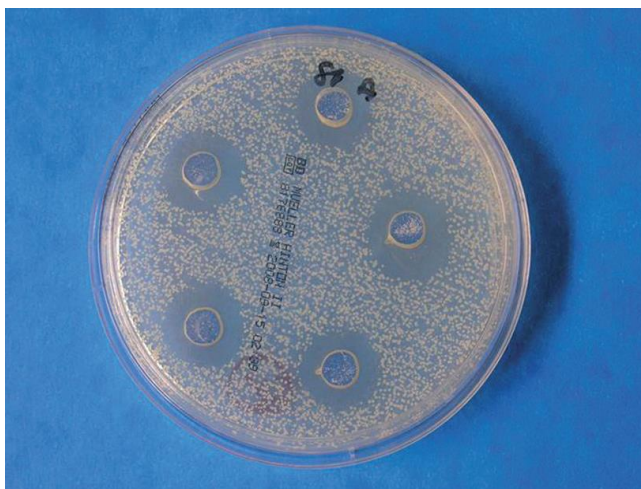


Figure 3. Antibiogramme permettant de tester la sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de différents miels. En périphérie des puits contenant le miel, les bactéries ne peuvent pas se développer. Plus la plage ne contenant pas de bactéries (autour du puits initial dans lequel le miel a été déposé) est importante, plus les propriétés antibactériennes du miel étudié sont efficaces.

Tableau 1. Détermination de l'activité antibactérienne de différents miels

Moyennes des diamètres de destruction des germes en mm					
Types de miels	pH	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colza	3,4	7,77	8,91	7,52	9,17
Lavande	3,2	9,92	10,72	9,29	12,08
Thym	3,6	11,66	12,20	12,22	12,71

5.2. Propriétés cicatrisantes du miel

De nombreux travaux expérimentaux ont démontré les propriétés cicatrisantes du miel (Bergman A *et al*, 1983) et les mécanismes impliqués commencent à être élucidés (Al-Waili N *et al*, 2011). Au contact d'une plaie, le miel réalise une barrière physique et contribue à maintenir un milieu humide du fait de sa teneur en eau. De plus, du fait de son hyper osmolarité au niveau des plaies, il absorbe les exsudats et favorise la diminution de l'œdème lésionnel, améliorant ainsi indirectement la microcirculation locale.

5.2.1. Processus en jeu

Lors de la dégradation du glucose (du miel) en présence d'eau et d'oxygène par la glucose-oxydase, il y a formation d'acide gluconique et d'eau oxygénée. L'eau oxygénée, outre ses propriétés antiseptiques, joue un rôle très important dans les processus de cicatrisation. En effet, au contact des tissus et du sang, elle se décompose en eau et en oxygène créant ainsi une "micro effervescence" et un nettoyage mécanique de la plaie (détersion). De plus, l'eau oxygénée favorise la prolifération des fibroblastes *in vitro* et l'angiogénèse *in vivo* (Tur E, Bolton L *et al*, 1995). En fait, dans le miel, de nombreux composants semblent stimuler la multiplication cellulaire et sont capables, au cours de la cicatrisation, de moduler la réaction inflammatoire (Tonks AJ *et al*, 2003). Le miel stimule notamment la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales qui participeront à la réparation tissulaire. Dans le même temps, il favorise le développement d'une néo vascularisation dans le tissu cicatriciel (Descottes B *et al*, 2009). Le miel induit également la synthèse de collagène (Suguna L *et al*, 1992) en activant vraisemblablement le *Transforming Growth Factor-β1* (qui présente un puissant pouvoir réparateur) et favorise la formation du tissu de granulation en augmentant sa contraction (Osuagwu FC *et al*, 2004) (Iftikhar F *et al*, 2010). Cela s'ajoutent des pouvoirs antioxydants et globalement régulateur de l'inflammation (Taormina PJ *et al*, 2001).

5.2.2. Réparation tissulaire favorisée

Tous ces mécanismes activent de façon favorable la cicatrisation et font du miel un pansement humide bioactif dont l'efficacité ne doit pas être ignorée (Gupta SS *et al*, 2011). Il a également été démontré dans des études expérimentales menées chez le rat que le miel est capable, sans entraver la cicatrisation, de réduire la formation des adhésions intra-abdominales (Saber A *et al*, 2010)(Yuzbasioglu MF *et al*,2009). Ces travaux soulignent les propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires et l'intérêt de ce produit complexe qui, tout en ayant une activité antibactérienne incontestable, est capable de favoriser une réparation tissulaire harmonieuse.

1. Historique

La découverte des antibiotiques revient à sir Fleming Alexander en 1929. Au cours d'examens de routine de cultures de staphylocoques en boîtes de Pétri au Saint Mary's Hospital de Londres, il découvre le développement accidentel de certaines moisissures de *Penicillium notatum* autour desquelles les colonies bactériennes ne cultivaient pas. Il émet l'hypothèse que ce champignon devait sécréter une substance nuisible à la croissance des staphylocoques et il a démontré que le bouillon filtré de ce champignon permet de reproduire ce phénomène. Il a donné à ce produit qui a pu empêcher la croissance de ces bactéries le nom pénicilline qui est introduit en thérapeutique pendant la deuxième guerre mondiale (1941). Parallèlement sont préparés en 1935, les sulfamides, le premier groupe d'antibactériens artificiels. Par la suite de nombreux autres antibiotiques ont été isolés à partir de champignons inférieurs, mais aussi et surtout des bactéries telluriques (genre *Actinomycètes*, *Bacillus* ...) les plus productrices d'antibiotiques. Les tétracyclines sont découvertes dans les années 1950, (Duval et Soussy, 1990) ; (Puyt et Guérin-Faubleé, 2006).

2. Découverte des antibiotiques

Les dates de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles sont rappelées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Date de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles, (Anonyme 2 e, 2005) ; (Chatellet, 2007) ; (Anonyme 7 d, 2008).

Micro-organisme	Famille	Molécule	Date de découverte
Penicillium	Pénicillines	Pénicilline	1929
Streptomyces	Aminoglycosides	Streptomycine	1944
		Néomycine	1949
		Kanamycine	1957
		Tobramycine	1967
		Amikacine	1975
Céphalosporum	Tétracyclines	Chlorotétracycline	1948
		Oxytétracycline	1949
	Quinolones	Acide nalidixique	1962
Céphalosporum	Macrolides	Chloramphénicol	1946
	Phénicolés	Erythromycine	1952
	Céphalosporines	Céphalotine	1954

3. Définition d'un antibiotique

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est-à-dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber spécifiquement la vitalité d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe, (Gogny, Puyt et al, 2001) ; (Morin et al, 2005) ; (Gauthier, 2006) ; Anonyme7 d, 2008).

4. Classification des antibiotiques

4.1. Critères de classification

Selon Duval et Soussy (1990) ; Anonyme 3 a (2006); Fontaine (1992) les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- leur origine (biosynthétisés par des champignons, des bacilles ou des Streptomyces, issus du génie chimique)
- leur composition chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques)
- leur activité (antibactériens, antifongiques, antimitotiques).

Nous nous intéresserons ici uniquement aux antibiotiques à activité antibactérienne.

De toutes ces classifications possibles, la classification la plus courante est celle par famille, possédant un certains nombre de caractères communs : composition chimique ou origine, spectre d'action similaire ou très rapproché, cibles bactériennes identiques, résistance bactérienne et sensibilisation croisée, effets indésirables rapprochés, etc., (Duval et Soussy, 1990) ; (Maur, 1990).

4.2. Classification

4.2.1. Classification des antibiotiques selon leur origine

Les anti-infectieux peuvent être produits de trois façons, par fermentation (naturelle), par semi-synthèse ou par synthèse chimique.

4.2.1.1. Fermentation ou extraction

Les antibiotiques sont fondamentalement des substances naturelles issues du métabolisme azoté de divers micro-organismes, (Maur, 1990) ; (Mevius et al, 1999) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006) :

- Soit des champignons inférieurs (mycètes) : du genre *Penicillium* pour les Pénicillines, Griséofulvine et genre *Céphalosporium* pour les Céphalosporines
- Soit des bactéries : du genre *Streptomyces* (90 % des antibiotiques sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*) et genre *Bacillus*.

Comme antibiotiques dont l'origine est bactérienne on trouve, la Bacitracine, Polymyxine-Colistine, Mupirocine, Céphamycines, Monobactames (les obtenues initialement par extraction, sont obtenues actuellement par synthèse).

4.2.1.2. Semi-synthèse

Les antibiotiques ainsi produits par voie fermentaire sont parfois utilisés pour la préparation de dérivés artificiels voisins, mais qu'il est impossible de faire sécréter par la souche microbienne, même en recourant à des précurseurs.

Dans ce but, on fait subir certains traitements chimiques simples à des antibiotiques produits par voie fermentaire, notamment des hydrolyses pour séparer la partie fondamentale de la molécule, trop complexe pour être préparée par synthèse à un coût raisonnable ; on greffe ensuite sur ce squelette de base différents groupements particuliers grâce à des estérifications ou des amidifications. On obtient ainsi des antibiotiques de semi-synthèse. C'est le cas des pénicillines ou des céphalosporines dont la plupart des représentants sont ainsi produits. Certains sont des pro-drogues antibiotiques, totalement dénuées par elles-mêmes d'activité biologique mais qui acquièrent leur pouvoir antimicrobiens après hydrolyse de la fonction ester qui a été greffée, (Mevius et al, 1999) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

4.2.1.3. Synthèse chimique totale

Certains antibiotiques dont la structure est assez simple sont produits plus économiquement par synthèse que par fermentation. C'est le cas du Florphénicol, Chloramphénicol, Monobactames, et tous les agents antibactériens de synthèse : Sulfamides, Triméthoprime, Quinolones, Nitrofuranes, etc.

Le fait que certains antibiotiques (Chloramphénicol, Aztréonam etc.) obtenus au début par fermentation sont actuellement produits par synthèse chimique, fait de plus en plus disparaître la distinction initiale entre antibiotiques et agents antibactériens de synthèse, (Maur, 1990) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

4.2.2. Classification des antibiotiques selon la structure chimique

Très variable, souvent une structure de base comme le cycle β -lactame (famille des Bitalactamines) sur laquelle il y a hémi synthèse. Elle donne souvent, le nom à la famille (Anonyme 3 a, 2003).

4.2.3. Classification des antibiotiques selon la cible bactérienne

Selon la cible bactérienne au niveau de la quelle ils agissent, les antibiotiques peuvent être classés en quatre groupes :

4.2.3.1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne

Contrairement aux cellules animales, les bactéries possèdent une enveloppe extérieure rigide : la paroi. C'est elle qui lui donne sa forme, et la protège des perturbations osmotiques que pourrait lui imposer le milieu environnant. Cette structure est tout à fait originale. Ainsi tout antibiotique agissant spécifiquement sur cette paroi, aura une grande sélectivité d'action et sera dépourvu d'effets sur les cellules animales. La paroi est constituée essentiellement de peptidoglycane, ou mucopeptide, qui est une macromolécule polysaccharidique constituée par une succession régulière d'acétoglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Ces acides aminés sont attachés en petits peptides et ceux-ci sont reliés entre eux par des ponts peptidiques conférant une grande rigidité à l'ensemble. Cette transpeptidation est la dernière étape de la synthèse de la paroi bactérienne et elle se fait sous l'influence d'une enzyme, la transpeptidase, (**Bourin et al, 1993**). Privées de leur paroi, les bactéries deviennent molles, fragiles et sans défense vis-à-vis des agressions mécaniques et des perturbations osmotiques ; on les appelle alors des protoplastes ou sphéroplast, et leur vie est brève. Les antibiotiques agissants de cette façon sont soit des inhibiteurs sélectifs de synthèse de la paroi bactérienne grâce à leur ressemblance structurale avec les acides aminés sur lesquels agit la transpeptidase. Ils se fixent sur cet enzyme et inhibent son action, empêchant ainsi la formation des ponts poly-glycines du mucopeptide pariétal rigides, soit des inhibiteurs du transfert et de la polymérisation du mucopeptide pariétal, soit enfin des inhibiteurs de la première phase de l'utilisation de l'alanine au niveau de la paroi. Parmi ces antibiotiques on trouve les Béta-lactamines, Vancomycine, Fosfomycine, et la Cyclosérine, (**Maur, 1990**) ; (**Bourin et al, 1993**) ; (**Anonyme 3 a, 2006**).

4.2.3.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

Ces antibiotiques agissent même sur les bactéries en phase de repos. Ils exercent une action directe et immédiate sur la membrane cytoplasmique. Cette action est comparable à celle des antiseptiques actifs. Parmi ces antibiotiques, on trouve la tyrothricine, les polypeptides cycliques, poly myxines, colistine...etc., (**Bourin et al, 1993**), (**Maur, 1990**), (**Anonyme 3 a, 2006**).

4.2.3.3. Antibiotiques agissant au niveau des ribosomes

Ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines bactériennes par action sur les ribosomes, (**Maur, 1979 et 1990**), (**Anonyme 3 à, 2006**) :

- inhibition au niveau des sous unités 30 S des ribosomes : Aminoglycosides (lecture de l'ARNm est perturbée)

- inhibition au niveau des sous unités 50 S des ribosomes : soit par inhibition du site A (aminoacyl) avec translocation perturbée pour les macrolides, soit par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN pour les tétracyclines, soit par inhibition du facteur d'élongation EF-G pour l'acide fusidique, soit enfin par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN et l'inhibition de la peptidyltransférase pour les Phénicolés.

4.2.3.4. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques

Selon **Anonyme 3 a (2006)** ces antibiotiques inhibent soit :

- la réplication de l'ADN : inhibition de l'ADN-gyrase ou topoisomérase II (sous unité A), c'est le cas des quinolones

- la transcription de l'ARN : inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante (sous unité B), c'est le cas des rifamycines

4.2.3.5. Antibiotiques agissant par autres mécanismes

Ces antibiotiques agissent en tant qu'antimétabolites bactériens en inhibant une des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries. C'est le cas des sulfamides, triméthoprime (qui inhibent la dihydroptéroate synthétase : DHPS), et l'isoniazide (analogues structuraux du NAD), (**Anonyme 3 a, 2006**).

4.2.4. Classification des antibiotiques selon le spectre d'activité

Chaque antibiotique est caractérisé par un spectre qui correspond à l'éventail des germes qu'il peut toucher, à dose plus ou moins élevée. Il est différent pour chaque famille d'antibiotiques, bien qu'il puisse se recouper, en partie ou en totalité, avec celui d'autres antibiotiques, c'est à dire que les mêmes germes peuvent être sensibles à plusieurs antibiotiques à la fois. On a ainsi des antibiotiques à spectre très large, large, moyen, ou étroit, (**Maur, 1979**).

Ce spectre va guider le vétérinaire dans son choix, même si les sensibilités mesurées en laboratoire ne sont pas forcément celles obtenues en élevage. Les bactéries, en effet, peuvent acquérir des résistances et un certain nombre d'entre elles ne manquent pas d'imagination pour se protéger des antibiotiques, (**Anonyme 4, 2003 ; Anonyme 1 a, 2007**).

4.2.5. Classification des antibiotiques par famille

Les antibiotiques sont divisés en familles (**tableau3**) ; le classement n'est pas tout à fait cohérent, puisque le point commun des divers antibiotiques d'une classe peut être tantôt chimique (les bêta-lactamines, les sulfamides, les polypeptidiques, les aminosides, les

macrolides, les fluoroquinolones), tantôt une bactérie sur laquelle ils sont efficaces (les antituberculeux, les anti staphylococciques). Il peut s'y rajouter une notion de moment d'apparition : ex : céphalosporines de 1ère, de 2ème...génération.

Les familles chimiques contiennent plusieurs molécules, dont les spectres d'action sont semblables, mais non identiques, et les effets indésirables assez voisins. D'où l'intérêt de savoir toujours situer un antibiotique dans sa classe, même si les différentes molécules d'une classe peuvent parfois être très différents en terme de devenir dans l'organisme, (**Anonyme 3 d, 2006**).

Tableau 3: Classification des antibiotiques par famille, (**Gogny et Puyt, 2001**).

1- Bétalactamines Antibiotiques bactéricides, actifs par voie orale (à l'exception de la benzylpénicilline ou pénicilline G), de distribution extracellulaire, caractérisés par une forte élimination urinaire.	
1.1. Pénicillines	
1.1.1. Pénicillines du groupe G Spectre d'activité : bactéries à Gram positif et pasteurelles. Sensibles aux β -lactamases. - Benzylpénicilline (pénicilline G), action immédiate : sel sodique ; action semi retard : sel de procaïne ; action retard : sel de benzathine - Pénéthacilline (ester basique et lipophile dérivé de la pénicilline G qui favorise la distribution intracellulaire et l'élimination mammaire)	
1.1.2. Pénicillines du groupe M Spectre d'activité identique à celui de la benzylpénicilline mais étendu aux staphylocoques producteurs de β -lactamases. Résistantes aux pénicillinases staphylococciques. Sel sodique d'action brève réservée au traitement des mammites en cours de lactation, sel de benzathine à action prolongée réservée au traitement des mammites hors lactation) : - Oxacilline et Cloxacilline (sels sodique ou de benzathine), - Dicloxacilline et Nafcilline (sels sodique).	
1.1.3. Pénicillines du groupe A Spectre d'activité élargi aux bactéries à Gram négatif. Résistantes aux pénicillinases des bactéries à Gram négatif mais sensibles aux pénicillinases staphylococciques : Ampicilline, Amoxicilline.	
1.2. Céphalosporines Antibiotiques à large spectre antibactérien. Activité de plus en plus prononcée sur les bactéries à Gram négatif de la première à la quatrième génération. Résistances accrue vis-à-vis des β -lactamases par rapport aux pénicillines du groupe A.	
Génération	Antibiotique
Première génération	Céfalexine Céfapirine Céfazoline

Deuxième génération	Céfalonium Céfuroxime
Troisième génération	Ceftiofur Céfopérazone
Quatrième génération	Cefquinome
<p>1.3. Acide clavulanique Bêtalactamine dépourvue d'action antibactérienne mais à forte activité inhibitrice sur les bêta-lactamases bactériennes, d'où un effet synergique en association avec les pénicillines et des céphalosporines. Seule l'association avec l'Amoxicilline est disponible.</p>	
<p>2. Aminosides (aminocyclitols) Antibiotiques bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, non résorbés par voie digestive, à distribution extracellulaire et élimination urinaire. Spectre d'activité : étroit, essentiellement bactéries anaérobies à Gram négatif pour la plupart ; spectre large (bactéries à Gram positif et négatif) pour la gentamicine. Inactives sur les bactéries anaérobies. Résistances se développant rapidement. - Dihydrostreptomycine, Framycétine, Kanamycine, Néomycine, Gentamicine, Apramycine - Spectinomycine (aminocyclitol apparenté aux aminosides, caractérisés par une action bactériostatique avec un spectre étendu aux mycoplasmes ainsi que par une moindre toxicité (néphrotoxicité et ototoxicité)</p>	
<p>3. Tétracycline Antibiotiques bactériostatiques, à spectre large, résorbés par voie digestive. - Tétracycline, Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline</p>	
<p>4. Phénicolés Antibiotiques bactériostatiques à large spectre, résorbés par voie digestive et à large diffusion dans l'organisme. - Chloramphénicol (antibiotique interdit chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR), Thiamphénicol (uniquement disponible en aérosols) et Florfénicol</p>	
<p>5. Macrolides et apparentés</p>	
<p>5.1. Macrolides Antibiotiques bactériostatiques, à spectre étroit surtout dirigé vis-à-vis des bactéries à Gram positif, des mycoplasmes, et pour certains composés vis-à-vis des pasteurelles, résorbés par voie digestive, à forte distribution intracellulaire et à fortes concentrations dans les sécrétions acides (lait dans toutes les espèces, urine et salive des carnivores) - Érythromycine, Oléandomycine, Spiramycine (également additif), Tylosine (également additif), Josamycine, Tilmicosine</p>	
<p>5.2. Apparentés aux macrolides Antibiotiques apparentés aux macrolides par leur activité antibactérienne. - Lincosamides (clindamycine et lincomycine), Rifamycines (rifaximine) - Pleuromutilines: antibiotiques actifs sur les mycoplasmes, les tréponèmes, Hemophilus et Campylobacter, résorbés par voie digestive. Tiamuline - Synergistines : virginiamycine (exclusivement additif) - Autres : novobiocine, acide fusidique</p>	
<p>6. Antibiotiques polypeptidiques</p>	

<p>6.1. Polymyxines Antibiotiques bactéricides à spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif, non résorbés par voie digestive, à distribution extracellulaire et élimination urinaire. - Colistine (polymyxine E), Polymyxine B (usage local exclusivement)</p>	
<p>6.2. Antibiotiques polypeptidiques non tensio-actifs Antibiotiques bactériostatiques à spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram positif, non résorbés par voie digestive. - Bacitracine (additif également sous forme de sel de zinc) - Tyrothricine, Thiostrepton (antibiotique polypeptidique soufré)</p>	
<p>7. Sulfonamides antibactériens Dérivés de l'acide para-amino-benzoïque, bactériostatiques, à large spectre d'activité antibactérienne (bactéries à Gram positif et négatif) ainsi que parfois anticoccidienne, en majorité résorbés par voie digestive.</p>	
<p>7.1. Sulfonamides d'action générale</p>	
<p>7.1.1. Sulfamides à brève durée d'action (3 à 6 heures) - Sulfamérazine, Sulfadimidine (sulfadimérazine)</p>	
<p>7.1.2. Sulfamides semi-retard (6 à 10 heures) - Sulfapyridine, Sulfaméthoxazole, Sulfanilamide, Sulfadiazine</p>	
<p>7.1.3. Sulfamides retard (10 à 24 heures) - Sulfaméthoxyridazine, Sulfadiméthoxine, Sulfadoxine.</p>	
<p>7.2. Sulfonamides d'action digestive Sulfamides pratiquement pas résorbés par voie digestive. - Sulfaguanidine, Phtalylsulfathiazole.</p>	
<p>7.1.5. Sulfamides coccidiostatiques</p>	
<p>8. Diaminopyrimidines Antibactériens bactériostatiques à large spectre d'activité, possédant une synergie d'action (effet bactéricide) en association avec des sulfamides, bien résorbés par voie orale et présentant une distribution intracellulaire : Triméthoprime, Baquiloprime.</p>	
<p>9. Quinolones Antibactériens bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, bien résorbés par voie orale.</p>	
Génération	Antibiotique
Première génération	Acide oxolinique : Spectre antibactérien étroit (bactéries à Gram négatif : entérobactéries).
Deuxième génération	Fluméquine : Spectre antibactérien plus large (bactéries à Gram négatif et à Gram positif), distribution tissulaire élargie.
Troisième génération	Enrofloxacin, Marbofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin et sarafloxacin (en développement) : Spectre antibactérien large, y compris sur les mycoplasmes ; excellente distribution tissulaire et action à très faible concentration.
<p>10. Nitrofuranes Composés bactériostatiques à spectre large, tous interdits chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR.</p>	

<p>Nitrofuranes d'action générale : Résorbés par voie digestive. Furaltadone, Nitrofurantoïne (action urinaire). Nitrofuranes d'action locale digestive : Peu absorbés par voie digestive, mais risques d'intoxication lors de surdosage (chez veaux et volailles) : Furazolidone.</p>
<p>11. Nitro-imidazoles Activité mixte à la fois antibactérienne à spectre étroit (aérobies à Gram positif, anaérobies à Gram positif et négatif, fusiformes et spirochètes : <i>Treponema hyodysenteriae</i>, <i>Fusiformis</i>) et antiparasitaire protistocide (<i>Trichomonas</i>, <i>Histomonas</i>, <i>Balantidium</i>). Le dimétridazole et le ronidazole (prochainement le métronidazole) sont interdits chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR. Les autres nitro-imidazoles utilisés comme médicaments en productions animales seront interdits au 1er janvier 98, si des LMR ne sont pas fixés rapidement avant cette date. À noter toutefois que ces interdictions ne portent pas sur les utilisations des nitro-imidazoles comme additif en alimentation animale. - Dimétridazole (aussi additif), Métronidazole (carnivores domestiques), Ronidazole (aussi additif), Carnidazole (pigeons), Ipronidazole (exclusivement additif).</p>
<p>12. Hydroxyquinoléines Composés bactériostatiques, spectre d'activité large (bactéries à Gram positif et négatif, protozoaires, certains champignons, utilisés essentiellement en antiseptie externe : Oxyquinol (oxyquinoléine), Clioquinol (chloroiodoquine).</p>
<p>13. Polyéthers ionophores (exclusivement additifs) Antibiotiques à la fois antibactériens bactéricides, à spectre étroit (bactéries à Gram positif), et antiprotozoaires (anticoccidiens), utilisés exclusivement à titre d'additifs alimentaires comme facteurs de croissance et anticoccidiens. - Monensin, Lasalocide, Narasin, Salinomycine, Maduramycine, Avilamycine, Semduramicine (additif en développement).</p>
<p>14. Quinoxaline N-dioxydes (exclusivement additifs) Facteurs de croissance à large spectre antibactérien utilisés uniquement en tant qu'additifs : Carbadox, Olaquinox.</p>
<p>15. Antibiotiques divers - Avoparcine, Flavophospholipol et Efratomyne (exclusivement additifs).</p>

5. Activité antibactérienne

L'étude expérimentale de l'activité antibactérienne des antibiotiques **in vitro** sur des cultures bactériennes, permet de définir certaines notions fondamentales en matière d'antibiothérapie ; mécanisme d'action, spectre d'activité et mode d'action antibactérienne (**Fontaine et Cadoré, 1995**).

5.1. Mécanismes d'action antibactérienne

L'activité antibactérienne des diverses substances antibiotiques est en relation avec leurs mécanismes d'action, généralement spécifique, sur les bactéries (**Gogny et al, 1999**).

Les connaissances actuelles peuvent laisser dire que les antibiotiques sont essentiellement des inhibiteurs de diverses réactions de synthèse bactériennes. On distingue :

- Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane (Bêta-lactamines).
- Les antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires (Polymyxine E ou colistine).
- Les antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques (Aminoside Macrolides, Tétracyclines).
- Les antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques (quinolones).
- Les antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates (Sulfamides, Triméthoprime, associations TMP-Sulfamides) (**Duval 1989a ; Adam et al.1992**).

5.2. Spectre d'activité / sensibilité

Le spectre d'activité, pour un antibiotique donné, est défini comme la liste des espèces microbiennes dont la majorité des souches s'avèrent sensibles *in vitro*. Selon que le nombre d'espèces bactériennes couvertes est important ou non, on dit que l'antibiotique possède un spectre large ou étroit. En dehors de n'importe quelle résistance acquise, toutes espèces non incluses dans ce spectre seraient naturellement résistantes (**Duval et Soussy, 1990 ; Martel, 1996**).

En termes cliniques, le spectre d'activité d'un antibiotique est la collection des microorganismes dont les infections associées peuvent être traitées d'une manière efficace aux dosages habituels. Le spectre clinique prend en considération outre la CMI des bactéries, les propriétés pharmacocinétiques de l'antibiotique et les résultats cliniques habituellement obtenus (**Mogenet et Fedida, 1998**).

Au moyen de l'Antibiogramme on détermine la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) qui représente la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute culture visible de la souche étudiée. L'évaluation de la sensibilité repose ensuite sur l'intégration des données bactériologiques, représentées par la CMI, et pharmacocinétiques conditionnant les taux d'antibiotique présents dans le foyer infectieux : une molécule ne sera active sur le plan thérapeutique que lorsque, après administration, les concentrations sanguines et tissulaires qu'elle est capable d'atteindre sont supérieures à la CMI (**Fontaine et Cadore, 1995**).

L'idéal pour évaluer le degré de sensibilité serait de comparer la CMI de la souche avec la concentration de l'antibiotique au sein du foyer infectieux. Faute de pouvoir connaître ce taux avec précision, on se réfère aux données pharmacocinétiques connues pour la molécule à tester (**Duval et Soussy, 1990**).

Classiquement, trois catégories de souches bactériennes sont distinguées et, délimitées chacune par deux valeurs : la concentration critique supérieure (C) et inférieure (c) qui sont spécifiques à chaque antibiotique :

- **Souches sensibles** ($CMI < \text{ou} = c$) : Les concentrations produites sont sensiblement plus élevées que la CMI. La probabilité de la réussite d'une telle thérapeutique étant assez importante ;
- **Souches intermédiaires** ($c < CMI < \text{ou} = C$) : Les concentrations produites sont proches de la CMI. L'issue thérapeutique est imprévisible ;
- **Souches résistantes** ($CMI > C$) : Les concentrations produites ne peuvent pas atteindre la CMI, même aux doses élevées de l'antibiotique. Le risque d'échec est important (**Duval et Soussy, 1990 ; Martel, 1996 ; Mogenet et Fedida, 1998**).

5.3. Mode d'action antibiotique : bacteriostase / bactéricide

Tous les antibiotiques ont le pouvoir de détruire (effet bactéricide) ou, d'inhiber la multiplication (effet bactériostatique) de certaines bactéries. Selon **leur concentration**, ils peuvent agir selon deux modalités différentes correspondant à des degrés dans l'intensité de leur action : la bactéricide et la bactériostase (**Duval et Soussy, 1990 ; Fontaine et Cadoré, 1995**).

Tableau 4 : Classification d'antibiotiques suivant leur mode d'action (**Mogenet et Fedida, 1998**).

Action bactériostatique		- Tétracyclines - Macrolides - Sulfamides
Action bactéricide	Actifs uniquement sur les germes en voie de multiplication (septicémie, infections aiguës)	Bêta-lactamines
	Actifs sur les germes au repos (infections chroniques), et en voie de multiplication.	- Aminosides - Colistine - Quinolones

Pour les antibiotiques bactériostatiques, un effet bactéricide peut être obtenu mais à des concentrations beaucoup plus importantes que celles reconnues bactériostatiques ($CMB \geq 18 CMI$) ($CMB = \text{Concentration Minimale Bactéricide}$)

Des études récentes ont permis (mais uniquement pour un couple fixé *anti-infectieux/germe*) après analyse des cinétiques de bactéricidie pour les antibactériens bactéricides, de développer une nouvelle classification : antibiotiques **dose-dépendants** et antibiotiques **temps-dépendants**.

L'action bactéricide des premiers est d'autant plus rapide que la concentration sérique est élevée au-dessus de la CMI : le paramètre le plus important pour l'activité de ces antibiotiques correspond à la hauteur du pic sérique. Pour les seconds, la dose d'antibiotique n'a pas (ou peu) d'influence sur la vitesse de bactéricide : le paramètre le plus important est alors le temps pendant lequel est maintenue dans le sérum une concentration bactéricide (Martel, 1996 ; Jean-Loup, 1997).

Tableau 5 : Principaux antibiotiques dose-dépendants et temps-dépendants (Martel, 1996 ; Mogenet et Fedida, 1998).

Antibiotiques dose-dépendants	
- Aminosides	vis-à-vis de la plus part des bactéries
- Amoxicilline	vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> , et certains streptocoques.
- Fluoroquinolones	vis-à-vis des bactéries à Gram-
Antibiotiques temps-dépendants	
- PénicillineG	vis-à-vis de la plus part des bactéries
- Céphalosporines	vis-à-vis de la plus part des bactéries
- Fluoroquinolones	vis-à-vis des bactéries à Gram+
-Macrolides et apparentées	vis-à-vis de la plus part des bactéries

5.4. Effets indirects des antibiotiques

Aux concentrations thérapeutiques ou, même à des concentrations sub-inhibitrices, les antibiotiques peuvent produire d'autres types d'effets antibactériens (Corpet et Brugere, 1995 ; Martel, 1996 ; Anonyme 8, 2000) :

- Certains antibiotiques continuent à inhiber la recroissance bactérienne, alors que leurs taux sériques sont redescendus en dessous de la CMI : c'est l'Effet Post-Antibiotique (E.P.A).

Cet effet peut être d'autant plus long que la dose antibiotique initiale est élevée (fluoroquinolones) ou, que le temps de contact avec l'antibiotique est prolongé.

Les plus longs EPA enregistrés (3 heures ou plus) sont obtenus avec les tétracyclines et les macrolides sur les bactéries Gram+, et avec les aminosides sur les bactéries Gram-. Pour les macrolides, cet effet est assez important et est directement lié à leur accumulation cellulaire (phénomène de bactériopause). (Corpet et Brugere, 1995 ; Martel, 1996 ; Anonyme 8, 2000) ;

- Certains d'autres, en interférant avec les mécanismes de synthèse protéique, sont responsables d'une inhibition de l'attachement bactérien aux cellules de l'hôte, ainsi

qu'à l'inhibition de la production des toxines bactériennes. Ce sont les **pilus** ou facteurs d'attachement et les **toxines** qui confèrent aux bactéries leur pathogénicité ;

- D'autres antibiotiques aussi, en se concentrant dans les leucocytes peuvent maintenir une activité intracellulaire (macrolides et apparentés, fluoroquinolones). Cependant, la valeur de cet effet chez la volaille est probablement limitée (**Corpet et Brugere, 1995**).

6. La résistance aux antibiotiques

6.1. Définitions

Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce¹. Les CMI ciblées pour une sensibilité, une sensibilité intermédiaire ou une résistance microbiologique pour chaque espèce de bactéries et pour chacun des antibiotiques sont déterminées par un laboratoire indépendant, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et mises à jour régulièrement. En fait, une souche est dite « résistante » lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre *in vivo* à la suite d'un traitement.

Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un autre antibiotique, et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée. Les bactéries sont dites multi-résistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (**Jones RN, 2001 ; Ahmad M et al, 1999**).

6.2. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission de micro-organismes résistants (**Simonsen GS et al.2004**). L'exposition à un antimicrobien favorise la survie des souches bactériennes résistantes présentes dans une population. La réduction de la pression sélective des antibiotiques est importante pour prévenir l'émergence d'une résistance microbienne et préserver le plus longtemps possible l'efficacité des médicaments disponibles.

La figure 4 présente la manière dont la pression sélective de la résistance s'effectue (**CDC, 2009**). Elle décrit les événements qui suivent une mutation spontanée dans une

population bactérienne. Si la mutation favorise l'émergence d'une résistance a un antibiotique, celui-ci va détruire les autres bactéries et sélectionner la souche mutante. Les mutants vont se multiplier et devenir prédominants.

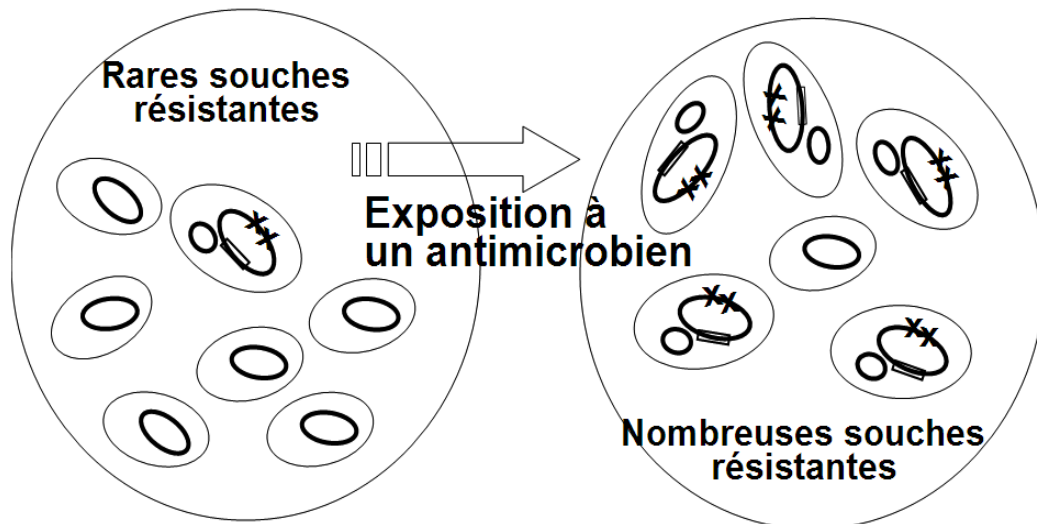


Figure 4. Sélection de souches résistantes aux antimicrobiens (CDC, 2009).

Lorsque les mesures de lutte contre les infections sont inadéquates, comme le lavage des mains, les clones résistants peuvent se propager d'un patient à l'autre en produisant une éclosion monoclonale ou oligoclonale, c'est-à-dire que toutes les bactéries résistantes sont identiques à la souche originale mutante ou présentent un nombre restreint de clones. Par opposition, la pression de sélection aux antibiotiques favorise une épidémiologie poly clonale, c'est-à-dire la présence de clones multiples. Figure 5 illustre l'interaction de ces deux facteurs sur l'émergence et la propagation de souches bactériennes résistantes (Ahmad M et al.1999).

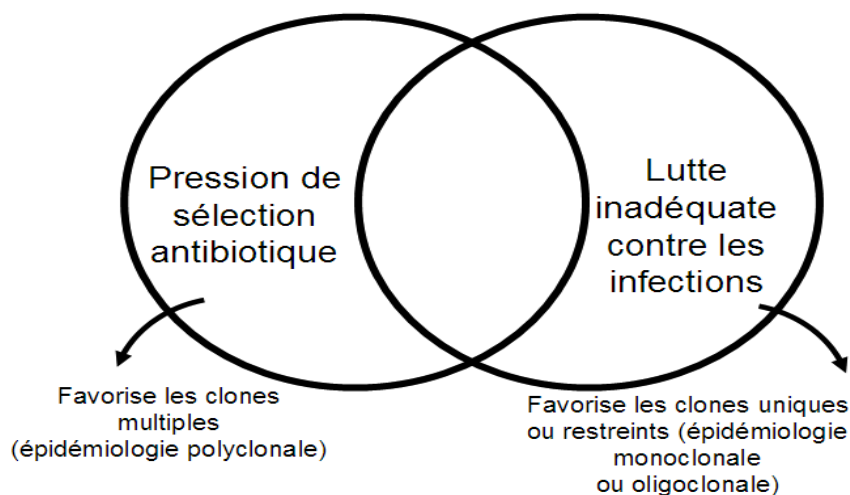


Figure 5. Emergence et propagation de souches résistantes

*Les principaux facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne sont présentes au tableau 6.

Tableau 6. Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques (Murthy .2001 ; Rybak MJ. 2004).

Facteurs E	Exemples (liste non exhaustive)
Emergence de la résistance	Usage abusif d'antibiotiques ; Gravité accrue de l'état des malades hospitalisés ; Manque de fidélité au traitement ; Durée trop courte ou dose sous-thérapeutique ; Diagnostic non confirmé d'infection bactérienne ; Utilisation inadéquate d'antibiotiques dans les pays en voie de développement.
Propagation des souches résistantes	Mesures d'hygiène inadéquates dans les hôpitaux ; Non-respect des directives de lutte contre les infections ; Promiscuité des patients hospitalisés ; Réduction du personnel infirmier et de soutien ; Déplacements accrus des patients (transferts de patients colonisés ou infectés entre hôpitaux et milieu communautaire) ; Voyages internationaux.
Utilisation d'antibiotiques dans le secteur agro-alimentaire	Animaux destinés à la consommation ; agro-alimentaire Agriculture et aquaculture.
Utilisation d'antiseptiques et de désinfectants	Agents antibactériens dans les produits d'entretien ménager, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, etc.

6.3.Étapes du développement de résistance à grande échelle

Les bactéries développent de la résistance à la suite d'une exposition aux antibiotiques. La résistance antibiotique se développe à grande échelle selon les étapes suivantes : sélection d'organismes résistants, élimination de la flore normale sensible au médicament et colonisation avec ces micro-organismes résistants, contact d'une personne à l'autre et transmission dans l'environnement puis finalement la transmission globale (Murthy. 2001).

6.4. Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (Mandell GL, *et al.*2009 ; Lewis R *et al.* 2009).

6.4.1. Résistance naturelle (ou intrinsèque)

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et du *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries à gram négatif à la vancomycine est naturelle.

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) ;(Mandell GL et al .2009 ; Lewis R. et al 2009).

6.4.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable. Ces changements peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme (Mandell GL et al .2009 ; Lewis R. et al 2009).

Le taux d'humidité

Les résultats de la teneur en eau dans tous les échantillons varient entre 15% pour la variété de Cèdre et multi fleur (E1) à 21% pour la variété de l'Eucalyptus (E2). Ces valeurs cadrent les normes qui sont respectivement inférieures à 21% pour Les miels de nectar et 23% pour le miel de bruyère (*Calluna*) et de miel de trèfle (*Trifolium*) (**Bogdanov ,1999**).

Toutes fois, les miels d'origines commerciales contiennent un taux d'humidité compris entre 13.5 et 21 % lorsque la norme ne dépasse pas 21%. D'autres laboratoires travaillent avec un taux d'humidité ne dépassant pas 18%, parce que Le risque de fermentation des miels est très faible pour les miels qui contiennent moins de 18% d'eau et nul en dessous de 17% (**Estupinan et col.1993 ; Estupinan et col.1998**). En dehors de l'origine botanique et de l'environnement l'apiculteur peut également influencer le miel par augmentation de l'humidité l'ors de la récolte et l'extraction des miels dans les locaux ayant un taux d'humidité supérieur à 60%. (**Mendes et col, 1997 ; Cano, 2003**).

D'après l'étude effectuée par Amrouche et Kessi (**2003**) sur les miels algériens a révélé des valeurs comprises entre 15 et 22,6% avec une moyenne de 17,68 %. La variation de la teneur en eau est due aux différentes conditions environnementales telles que : le climat, l'origine florale des échantillons du miel, à la teneur en eau des nectars (**Nandaa et al, 2003; Bogdanov et al, 2004**) et les techniques de traitement et les conditions de stockage (**Ozcan et al, 2006**). La teneur en humidité est un élément important d'évaluation du degré de maturité du miel et de sa durée de vie.

Selon les Normes de qualités relatives au miel la teneur en eau ne devra pas dépasser 18,5 %, à l'exception du miel de châtaignier (19 %) et du miel de callune (22 %). Le taux d'humidité le plus bas sera un gage de bonne qualité du miel.

En effet, l'humidité est un excellent critère de qualité qui intervient dans la viscosité, la cristallisation, la saveur et la fermentation du miel (**Ricciarelli et col. 1994 ; Stephen ,1945**). En revanche lorsque le taux d'humidité est plus ou moins élevé, la conservation ou le travail du miel devient difficile (**Wen et col. 1995 ; Bogdanov et col. 1995**).

La teneur en cendres

Les variétés de la matière minérale étudiées varient entre 0,017%-0,73%. Tous les résultats obtenus cadrent les normes internationales qui sont inférieure à 0.6% pour le miel de nectar. Cependant selon (**Bogdanov ,1999**), La limite établie est de 0,6% pour le miel de nectar et 1% pour le miel de miellé ou mixte.

D'après Nandaa et al (2003), signalent que la limite permise de la teneur en cendres des miels de nectar est de 0,6%. Par contre, celle du miel de miellat est de 1,2% (**Al et al, 2009**). Les valeurs de cendres trouvées étaient en dessous de 0,6% ; ces résultats sont en accord avec la limite autorisée par Codex Alimentarius (2001) pour les miels de nectar.

Comme mentionné aussi avec les miels Algériens, pour les quels les valeurs rapportées sont dans la plage de 0,06 à 0,54% (**Ouchemoukh et al, 2007**). La variation de la teneur en cendres peut s'expliquer par les procédés de récolte, les techniques de l'apiculture et les matériels collectés par les abeilles lors de la recherche de nourriture sur la fleur (**Finola et al, 2007**) et principalement déterminée par le sol et le climat caractéristique (**Acquaron et al, 2007**).

La teneur des substances minérales dépend des éléments chimiques (Na, Fe, Cl, S....etc.) du terrain dans le quel poussent les plantes où les abeilles cueillent leur nectar ou leur miellé (**Vorwohl, 1964**).Des travaux de recherche (**Bogdanov ,2003**) montrent également que La teneur en cendres est liée à l'origine botanique du miel. Le taux de cendre est présent en pourcentage majeur dans les miels sombres et c'est le cas du miel châtaigne, qui normalement dépasse la limite, et de miellé. Actuellement, la détermination de la teneur en cendres est en voie d'être remplacée par la mesure de la conductivité électrique. Ainsi, la teneur en cendres pourrait être maintenue provisoirement jusqu'à ce que la conductivité électrique soit reconnue comme norme internationale. (**Sancho et col., 1991; Bogdanov ,2003**).

Détermination le pH

Les résultats de PH des miels étudiés est compris entre 2,62 et 4,04.Ce résultats similaires sont mentionnés par (**Schweizer, 2005a**) les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3.5 et 4,5. Les miels de miellats. Moins acides, ont un pH supérieur à 4,5. Ceci est en accord avec le travail de **Bogdanov et al, 2004**, le miel est pH oscille en moyenne entre 3.5 et 6.

D'après (**Azeredo et al, 2003, Saxena et al, 2010**), tous les miels Algériens étaient de nature acide, avec un pH qui varie entre 3,70 et 4,00. Ces valeurs sont similaires à celles rapportées pour d'autres échantillons de miels provenant de l'Inde, le Brésil, l'Espagne et la Turquie, qui auraient un pH entre 3,49 et 4,70. La variation du pH serait due à la flore butinée, à la sécrétion salivaire de l'abeille et aux processus enzymatiques et fermentatifs pendant la transformation de la matière première (**Louveaux, 1968**).

Le pH caractérise l'acidité ou la basicité d'un produit (le miel est toujours acide). IL influence fortement la vitesse de dégradation des sucres et des enzymes (**Russo, 1997; Singh et col, 1997**). Les miels plus acides (ronces, phacélie...) vont se décomposer rapidement tous les miels sont acides et c'est probablement l'abeille qui leur confère cette propriété.

Détermination de l'acidité libre Acidité des lactones et acidité totale

Les résultats obtenus révèlent que les valeurs d'acidité libre varient entre 18.90 mEq/Kg et (E5) et de 39.86 mEq/Kg. Nos résultats réalisés par (**Bogdanov, 1999**), On enregistre que tous les résultats cadrent les normes qui sont Max 50mek/Kg d'acidité libre.

Concerne l'acidité des lactones varient entre 6.92 et 13.93 mEq/Kg. les valeurs de l'acidité totale des miels étudiées varient entre 29.56 et la valeur 53.81 mEq/Kg.

Ce résultats s'accorde avec le projet du Codex Alimentarius, elle a été augmentée à 50 mEq/kg, étant donné qu'il existe quelques sortes de miels qui ont une teneur naturelle en acide plus élevée ((**Horn et Lüllmann, 1992**). Par contre l'ancienne norme prescrit une valeur maximale de 40 mEq/kg.

Selon (**Russo, 1997; Singh et col, 1997**), L'acidité des miels est essentiellement due à l'acide gluconique. Cet acide est présent dans tous les miels. C'est une enzyme de l'abeille, la gluco-oxydase qui est à l'origine de celui-ci.

Le pH et l'acidité libre vont influencer la stabilité du miel et ses conditions de conservation. Ils nous donnent également des informations sur son origine géographique ou botanique .La fermentation du miel provoque une augmentation de l'acidité dans le miel, c'est pourquoi une valeur maximale est très utile, bien qu'il existe une fluctuation naturelle considérable (**Kohlich et col. ,1985**). D'après les travaux de (**RAMÍREZ CERVANTES et al, 2000**) Le traitement thermique n'a pas eu d'influence significative sur l'acidité de miel. Néanmoins, la croissance a été significative durant l'entreposage et proportionnelle à sa durée ce qui concorde avec les résultats rapportés par (**HADORN ,1962; IMÁN ,1990**).

Selon (**Pe'rez-Arquillue et al. 1995**), La variation de l'acidité dans les différents miels peut être attribuée à l'origine florale ou à des variations en raison de la saison de la

récolte. D'après Schweitzer (2004), l'acidité naturelle du miel s'accroît lorsque le miel vieillit, lorsqu'il est extrait des rayons avec de la propolis et notamment lorsqu'il s'altère par fermentation. L'acidité est un critère important de qualité, elle donne des indications très importantes de l'état du miel (**Bogdanov, 1999, Gonnet, 1982**).

Détermination de l'absorbance

Les résultats d'absorbance observés varient entre 0,068 et 0,222. Tandis que l'échantillon a faible absorbance sont (E3) orange contiennent de couleur clair, et (E2) eucalyptus présente une absorbance plus élevée à 0,222, Cela est dû à leur couleur très foncée. Cette couleur pourra être expliquée par la présence de certaine quantité de miellat. Similaires sont mentionnés par **Louveaux (1968)**, indique que la couleur du miel est liée à la teneur en matière minérale et en protéines. Ainsi les miels foncés sont plus riches en cendre, en protéines, et en colloïdes.

L'analyse pollinique du miel

L'activité antibactérienne

Les résultats concernant l'activité antimicrobienne obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur disque et méthode de puits montrent que l'activité antibactérienne du miel testé en fonction de la bactérie ciblée. On vu de nos résultats, on a constaté que les miels a une bonne activité vis-à-vis les bactéries. Ce résultat remarqué, s'accorde avec les travaux de (Pr. Sebastian AJ Zaat), chercheur du département de microbiologie médicale du centre médical académique d'Amsterdam, «*le miel ou ses composants isolés pourraient être d'une grande valeur pour la prévention et le traitement des infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques.*» En effet, dans leurs expériences, quantités d'espèces testées, incluant des bactéries impliquées dans des intoxications alimentaires, *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli* résistantes à plusieurs antibiotiques, ou des bactéries impliquées dans des infections nosocomiales, ayant développé des résistances aux antibiotiques (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecium*), ont toutes été tuées par une basse concentration en 10 à 20% de miel (1 ou 2 millilitres de miel dans 10 millilitres de bactéries). L'efficacité de miel contre *E. coli* et *P.aeruginosa* confirmé par (**Cooper R et al, 2012**). Selon Martos et al, 2000, Les actions thérapeutiques du miel sont dues à des propriétés antioxydants et antimicrobiennes (**Martos et al, 2000**).

Concernant la sensibilité d'*Escherichia coli* notre résultat est diffère à celui obtenu par (Popeskovic D et Dakic M. 1979), qui représente *E. coli* la bactérie la plus résistante.

L'activité inhibitrice du miel naturel sur *Staphylococcus aureus* est semblable à celle des antibiotiques les plus actifs (Ak 30, AM 10, DA 2, E 15, K 30, S 10, TOB 10). La souche bactérienne la plus utilisée pour tester les propriétés antibactériennes des miels d'A mellifère a été *S aureus* (Dold *et al*, 1938; Prica, 1938; White *et al*, 1962; Wooton *et al*, 1978; Yatsunami *et Echigo*, 1984; Bogdanov *et al*, 1987). Concernant *E. coli* une souche polyrésistante aux antibiotiques (E 12, Am10, DA 2), l'activité inhibitrice du miel naturel sur cette souche est excellente avec tout l'échantillon E1, E2, E3, E4, E5 (deux fois plus que les antibiotiques).

Le rôle antibactérien du miel a été à l'origine de son utilisation dans les plaies à haut risque d'infections. Grâce à ses propriétés antibactériennes (Al-Waili NS *et al*, 2011), il a permis une réduction de la charge bactérienne après 8 jours par rapport à un traitement conventionnel avec un coût économique inférieur dans la prise en charge des maux perforants plantaires (Moghazy AM *et al*, 2010). Aucune différence significative en termes de temps de cicatrisation dans ces mêmes plaies n'a été trouvée dans l'étude de Shukrimi *et coll.* (2008). Dans le traitement des brûlures superficielles, les cicatrifications sont apparues, dans le cadre d'une étude randomisée, plus rapides chez les patients traités par le miel (21 jours) par rapport à ceux traités par la sulfadiazine argentique (24 jours). Par ailleurs, les 6 patients traités avec le miel présentaient des plaies colonisées avec *Pseudomonas aeruginosa* alors qu'ils étaient 27 dans le groupe traité par la sulfadiazine argentique. Cette étude suggère donc l'efficacité du miel dans les brûlures superficielles (Malik KI *et al*, 2010).

Une étude prospective menée sur 20 patients para- ou tétraplégiques présentant des escarres (stade 3 ou 4) a noté, quant à elle, une cicatrisation complète des plaies chez 18 patients après 4 semaines de traitement à base de miel et une diminution de la charge bactérienne des plaies (Biglari B *et al*, 2012). Ainsi, il existe des preuves d'efficacité biologique et clinique suggérant l'intérêt de l'utilisation du miel dans le traitement des plaies mais il manque encore des études avec de bons niveaux de preuves pour confirmer des effets thérapeutiques indiscutables (Lee DS, 2011).

L'autre domaine dans lequel le miel pourrait apporter une contribution essentielle à un problème mondial de santé publique, est celui d'enrichir l'arsenal thérapeutique à notre disposition, pour lutter contre les super-bactéries devenues résistantes aux antibiotiques (streptocoque, staphylocoque doré résistant à la méthicilline, entérocoque). Le développement des infections nosocomiales et des résistances aux antibiotiques seront peut-être l'occasion de

réintroduire le miel dans la pharmacopée moderne. Une utilisation judicieuse, pertinente du miel doit permettre de réduire la surconsommation d'antibiotiques en France, surconsommation dont on sait qu'elle favorise l'émergence de ces souches bactériennes résistantes aux traitements. Compte tenu de son très grand champ d'application, à la fois préventif et curatif, antiseptique et antibiotique et de sa grande efficacité dans de nombreuses indications, de sa facilité de mise en œuvre, de sa parfaite innocuité et de l'absence d'effets secondaires, contre-indications ou incompatibilité, l'utilisation du miel représente une possibilité thérapeutique de premier plan qui ne demande qu'à être mieux connue. Le miel trouvera, dans un avenir proche, à n'en pas douter, une place importante dans l'arsenal thérapeutique médical. Toutefois, il est urgent d'agir et de protéger les cultures dont les abeilles se nourrissent. Il ne faudrait pas attendre que les abeilles aient disparu pour se rendre compte à quel point le miel est précieux.

Les propriétés antimicrobiennes du miel ont été exploitées par les hommes, on sait aujourd'hui que le miel provenant d'une ruche saine ne contient pas de bactéries, sous forme végétative. Comme explication de l'activité anti bactériostatique et bactéricide du miel, on avait donné sa teneur en sucre ou bien, la présence de pollen transformé ou encore son pH (**LIBIS., 1971**). Selon le même auteur la valeur antibiotique du miel est attribuée à l'inhibée, qui est une enzyme très fragile à la chaleur et à la lumière ; il affirme que pour conserver l'activité de cette enzyme il ne faut pas dépasser 80°C pendant de 30 minutes Selon **DESCOTTES (2004)**

Les substances contenues dans le miel murent qui sont responsables de l'activité antibactérienne On a déjà décelé différentes «inhibines dites non peroxydes» telles que des lysozymes, flavonoïdes, acminés du miel. Il s'est révélé que des substances volatiles et aromatiques du miel possédaient également une propriété antibactérienne (**les publications de Molan, 1992 et 1997** offrent un aperçu complet des substances antibactériennes et des effets du miel).

Certaines caractéristiques du miel tel son pH, sa grande viscosité qui limite la dissolution d'oxygène et sa faible concentration en protéines lui confèrent un effet antibactérien important (**Arvanitoyannis IS et al 2005**). D'ailleurs, la possibilité de prévenir et de traiter certaines affections gastro-intestinales mineures comme de l'inflammation ou un ulcère gastrique par une administration orale de miel n'est pas exclue. En effet, ce dernier diminuerait l'adhérence des cellules bactériennes aux cellules épithéliales de l'intestin ce qui

empêcherait les bactéries de se fixer (**Alnaqdy A et al 2005**) et de proliférer, en plus de mettre à profit ses propriétés anti-inflammatoires. Le miel, quant à lui, crée un milieu humide dans lequel la croissance des bactéries est évitée grâce à son activité antibactérienne.

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 (**PROST P. 1979**). la nature des fleurs de nutrition de l'abeille et l'origine florale de l'alimentation (**VERDAN J. 2002, BIRI. M. 1999**). En fait, DONADIEU (1978) a montré que tous les miels ont des propriétés communes, mais chaque miel mono floral, se caractérise par des propriétés thérapeutiques propres à lui (**DONADIEU Y. 2006, DONADIEU Y. 1981**).

Les raisons de l'activité antibactérienne du miel sont matière à controverse. L'une des interprétations admises actuellement est celle de White *et* Subers (**1963**) selon laquelle le bioxyde d'hydrogène qui provient de la glucose-oxydase du miel, serait la substance inhibitrice des bactéries. Cependant, il est connu que le miel lui-même et les bactéries produisent de la catalase qui élimine le bioxyde d'hydrogène et que la production de catalase par les bactéries varie en fonction de leur cycle de développement (**McCanthy et Hinshelwood, 1959**). Yatsunami *et* Echigo (**1984**) suggèrent que cette activité du miel est associée à une haute concentration en sucres, à de basses valeurs du pH et à l'accumulation du bioxyde d'hydrogène. La théorie de l'inhibition des bactéries par des substances autres que des peroxydes a fait récemment plusieurs adeptes : **lalomiteanu et Daghie, 1973; Popesdovic D et Dakic M, 1979; Molan et Russell 1988**.

Notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida, durant l'année 2014-2015.

2. Choix des échantillons de miel

Nous avons travaillé sur 05 échantillons de miel provenant des différentes régions des wilayas de Saida et Sidi bel Abbas, notamment au sein des forêts. A chaque échantillon, il a été attribué un chiffre allant de 1 jusqu'à 5 comme le montre le tableau suivant :

Tableau 7. Présentation des échantillons du miel étudié.

Echantillons	Date de récolte	Région de récolte	Origine florale Présumée
E1	Août 2014	Saida(Rebahia)	Sudre et multi fleur
E2	Juillet 2014	Saida(Rebahia)	Eucalyptus
E3	Juillet 2014	Saida(Rebahia)	Orange
E4	Mai 2014	Sidi Bel Abbes	Forêt
E5	Juin 2014	Saida	Forêt

3. Analyses physico-chimiques

3.1. Détermination de la teneur en eau par réfractomètre (Arrêté n°80-367)

Objet

La présente méthode a pour objet de déterminer la teneur en eau du miel, à l'aide du réfractomètre.

Définition

On entend par teneur en eau, le pourcentage pondéral d'eau déterminé selon le protocole ci-après.

Principe

Déterminer l'indice de réfraction du miel parfaitement liquéfié. La table ci-jointe indique la teneur en eau correspondante.

Appareillage

- Flacon avec fermeture hermétique.
- Bain marie à 50°C.
- Baguette de verre.
- Réfractomètre du type Abbe.

Mode d'opération

A-Préparation de l'échantillon

Introduire dans le flacon quelques grammes de miel homogénéisé, obturer le flacon et le placer au bain marie pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre. Homogénéiser par agitation et laisser refroidir.

B-Mesure de l'indice de réfraction et détermination de la teneur en eau

A l'aide de la baguette de verre déposer rapidement une goutte de miel sur le prisme de réfractomètre, fermer l'appareil, lire l'indice de réfraction, et noter la température du prisme. Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20°C. La correction est additive. Si la mesure est faite au-dessus de 20 °C. Soustractive dans le cas contraire. Le terme correctif est de 0,000 23 par degré C.

C-Expression des résultats

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

3.2. Détermination de la teneur en cendres (Sancho *et al*, 1992)

But

La détermination standard de la procédure est de déterminer la teneur en cendres de miel. La teneur en cendre est utilisée pour estimer le type du miel. La détermination de la teneur en cendre est un critère de qualité qui dépend de l'origine botanique du miel.

Réactif

- Huile d'olive.

Appareillage

- ✓ Capsule de platine.
- ✓ Four électrique réglé à 600° + 25° C.
- ✓ Dessiccateur garni d'un déshydratant efficace.
- ✓ Balance analytique.

Mode opératoire

Le taux du miel est le pourcentage de matière minérale. Les cendres obtenues par la dessiccation du miel dans un four à une T° de 600°C pendant 2 heures. On place les capsules vides dans l'étuve pendant 15 min. On pèse la capsule vide (**m₂**) 5g de l'échantillon ont été prés de 0,001g dans une capsule (**m₀**), préalablement calcinée et tarée, et on ajouté 2 gouttes d'huile d'olive. Puis les capsules sont placées dans le four à 600°C pendant 2 heures laisser la capsule avec les cendre jusqu'au poids constant (**m₁**).

Expression des résultats

La proportion du cendres W par g /100 g de miel est calculée par la formule suivant:

$$W = (m_1 - m_2) / m_0 \times 100$$

Dont :

W: teneur en cendres.

m₁: poids du plat de cendres plus les cendres.

m₂: poids de plat de cendres.

m₀: poids de miel.

3.3. Détermination du pH

Le pH est mesuré dans une solution de miel à 10% à l'aide d'un pH-mètre (**Codex Alimentarius, 2001**).

3.4. Détermination de l'acidité libre des lactones et de l'acidité totale. (AOAC 31-168)

Dissoudre 10g de l'échantillon dans 75ml d'eau distillée exempte de CO₂ dans un bécher de 250ml mélangé à l'aide d'un agitateur magnétique immerger l'électrode titrer avec hydroxyde de sodium (NaOH) 0.05N à une vitesse de 5ml/min arrête l'ajoute de hydroxyde de sodium à PH 8.50. Immédiatement ajouter à l'aide d'une pipette 10ml d'hydroxyde de sodium 0.05N et faire un dosage en retour à l'aide d'acide sulfurique (H₂SO₄) 0.05N jusqu'à PH 8.30 ; faire un essai à blanc.

Réactifs

- ✓ Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,05 N.
- ✓ Solution d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 0,05 N.

- ✓ Eau distillée ou de pureté équivalente exempte des CO₂.

Appareillage

- PH mètre.
- Agitateur magnétique.
- Vase cylindrique de 50 ml.
- Deux microburettes de 10 ml.
- Balance analytique.
- Becher de 25ml.

Mode opératoire

Peser au centigramme près 10 grammes environ de miel. Dissoudre dans 75ml millilitres d'eau distillée. Verser dans un bécher et Agiter modérément le liquide avec un agitateur magnétique et doser l'acidité du miel avec NaOH, jusqu'à le pH 8.5 noté le volume de NAOH et versé 10ml NAOH. Restant dans la micro burette une solution d'acide sulfurique H₂SO₄ (0,05 N) pour opérer un dosage potentiométrique en retour jusqu'à PH 8.3 et noté volume de H₂SO₄. Noté le volume de blanc (eau distillée) de NAOH et H₂SO₄.

Expression des résultats

Calcule :

$$\text{Acidité libre} = \frac{\text{Vol NAOH} - \text{Vol-blanc} \times 50}{\text{PE}}$$

$$\text{Lactones} = \frac{10\text{ml} - \text{Vol H}_2\text{SO}_4 \times 50}{\text{PE}}$$

$$\text{Acidité totale} = \text{Acidité libre} + \text{Lactones}$$

3.4. Mesure le taux de l'absorbance

Appareillage

- Spectrophotomètre.
- Fiole.

Mode d'opération

La mesure de l'absorbance a été faite selon la méthode de la FAO(1969). Peser 5g de miel et dissoudre dans 100ml d'eau distillée pour une solution de 5% de concentration. La mesure de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 575 nm après avoir étalonner l'appareil avec de l'eau distillée.

4. Analyse pollinique des miels

Examen microscopique de miel et des produits au miel

L'examen microscopique et, plus particulièrement l'analyse pollinique supposant des connaissances spécialisées. Il convient de se reporter à l'Atlas photographique d'analyse pollinique des miels, tome III. 1970, des annexes microphotographiques aux méthodes officielles d'analyse (service de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité), 42 bis, rue de Bourgogne, Paris (7e) (**Arrête n°80-367**).

Objet

L'examen microscopique du miel a pour objet d'obtenir des informations sur :

- Son origine botanique.
- Son origine géographique.
- Son mode d'extraction.
- Sa souillure éventuelle par des matières insolubles dans l'eau.
- Son état de conservation.
- Son degré de filtration.
- Par l'identification de ses constituants microscopiques.

Principe

Tous les miels naturels contiennent en suspension avant et après leur extraction des constituants figurés microscopiques dont les plus importants sont les grains de pollen provenant des fleurs que l'abeille a visité pour la récolte du nectar. Outre les grains de pollen, les miels naturels peuvent contenir en très faibles quantités :

Des spores de champignons, des algues microscopiques, des levures, des grains d'amidon, des fragments d'insectes, des poussières atmosphériques, etc.

Par centrifugation d'une solution de miel dans l'eau, on peut concentrer les éléments figurés dans un très faible volume et en confectionner une préparation dont l'examen sous le microscope apporte les informations recherchées.

Réactifs

- Eau distillée.
- Glycérine gélatinée de Kaiser : 7 grammes de gélatine sont coupés en petits morceaux et placés dans 42 ml d'eau distillée pendant deux heures pour permettre le gonflement. Ensuite, en agitant constamment, on ajoute 50 g de glycérine pure et 0,5 g de phénol cristallisé. On chauffe 15 min. On filtre sur laine de verre mouillée.

Appareillage

- Balance analytique.
- Vase cylindrique de 50ml.
- Tubes à centrifugation à fond conique de 50ml.
- Centrifugeuse de laboratoire tournant à 2500-3 000 tours/mn (accélération centrifuge relative : environ 1350).
- Pipettes de Pasteur stériles (à usage unique).
- Lame porte-objet.
- Microscope (objectifs 10x, 40x, 60x, 100x, oculaires 6x ou 8x).
- Bain marie.

Mode opératoire

10 gr. De miel sont pesés exactement à 0,1 gr près dans un vase cylindrique. On ajoute 20 ml d'eau distillée chaude (ne pas dépasser 40° C). La solution obtenue est versée dans un tube à centrifugation. On centrifuge pendant 5 mn à 2500-3 000 tours minute. On jette le liquide surnageant avec précaution. On prélève le culot de centrifugation avec la pipette de Pasteur stérile et on le dépose sur la lame porte-objet. On étale le culot sur une surface d'environ 1 cm². On laisse sécher sur une plaque chauffante. On dépose une goutte de glycérine gélatinée préalablement liquéfiée en le portant à 45 °C environ au bain d'eau. On recouvre avec une lamelle couvre-objet. Après refroidissement et solidification de la glycérine gélatinée, on examine au microscope.

Interprétation des résultats

L'identification des différents constituants figurés visibles au microscope se fait par comparaison avec des préparations de référence et en utilisant l'iconographie contenue dans les publications spécialisées. L'identification des pollens, des spores de champignons, et autres éléments figurés d'origine végétale renseigne sur l'origine botanique et géographique du miel. La mesure ou la simple estimation du volume du culot de centrifugation permet d'obtenir des informations sur le mode d'extraction et le degré de filtration du miel.

L'abondance relative des levures renseigne sur l'état de conservation du miel. L'abondance relative des poussières atmosphériques, des particules minérales, des fragments d'insectes ou des grains d'amidon renseigne sur la pureté du miel.

5. Choix des souches bactériennes

Les souches ont été ramenées gracieusement par Mr Hala .N de la wilaya de Tlemcen (souches de références) dont elles sont présentées dans le tableau8.

Tableau 8 : présentation des souches utilisées

Souches testées		
Bactéries	Bactéries à Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Bacellus subtilis</i>
	Bactéries Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

6. Confirmation de la pureté des souches

La confirmation de la pureté des souches testées, conservées en gélose inclinée, à été réalisée par repiquage sur un milieu solide (ensemencement sur gélose spécifique pour certaines souches, et sur gélose nutritif pour d'autres). Et en suite vérifiée sur le plan de leur critères macro et microscopiques.

6.1. Observation macroscopique

La confirmation de la forme, la couleur et la taille des colonies de chaque bactérie.

6.2. Observation microscopique

Observation sous microscopique optique après une coloration de Gram pour chaque bactérie. (Voir annexe).

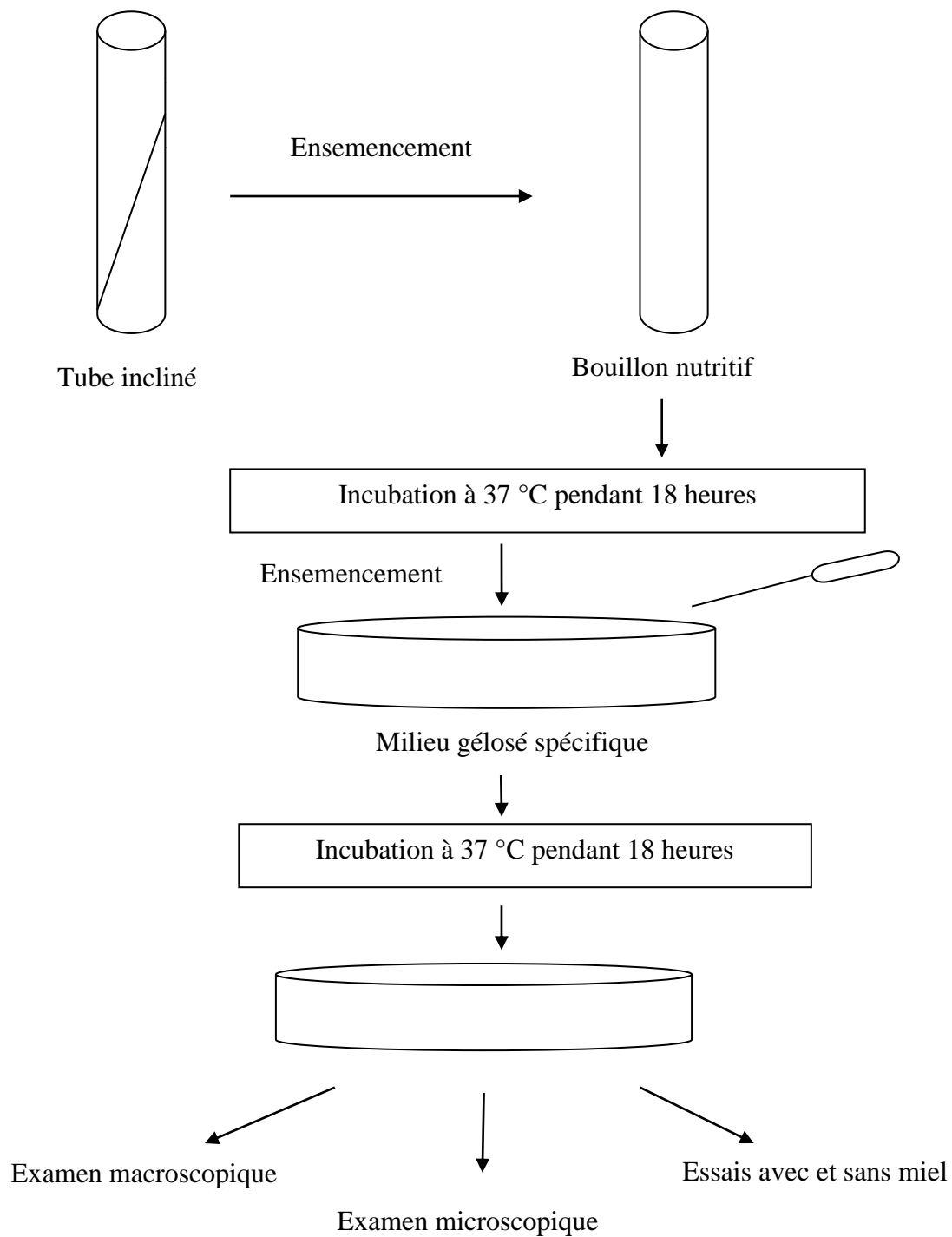


Figure 6 : schéma de révivation et purification des souches utilisées

7. Test de sensibilité aux antibiotiques

Choisir quelques types de disques antibiotiques ramenés par Mr Ahmed laborantin d'université de Moulay Tahar Saida présente dans le tableau 9 et testés sur les souches pathogènes utilisées par la méthode de diffusion en milieu solide.

L'ensemencement des microorganismes est effectué par l'écouvillonnage de la suspension bactériennes dans des boîtes de Pétri colée par le milieu Muller Hinton gélosé et dépose les disques ATB à l'aide d'un pince stérile. Les boîtes de Pétri sont laissées pendant 4 heures dans le réfrigérateur avant d'être incubées pendant 24 heures à 37°C. Les résultats s'effectuent par mesure du diamètre des zones d'inhibitions en (mm).

Tableau 9 : Les antibiotiques utilisés dans le teste antibiogramme

ATB	Code	ATB	Code
Amikacin	Ak 30	Kanamycin	K 30
Ampicillin	AM 10	Streptomycin	S 10
Clindamycin	DA 2	Tobramycin	TOB 10
Erythromycin	E 15		

8. Activité antimicrobienne des différents miels

8.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode de disque)

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par (Treki *et al*, 2009).

Cinq souches de référence ATCC, sont testées: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listéria monocytogenes* et *Bacillus subtilise*.

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum en les trempant dans des tubes de solution d'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0,5 McFarland. Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière avec la gélose Mueller Hinton à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose. Des disques de papier filtre stériles (6 mm de diamètre)

sont imprégnés de concentrations croissantes d'extraits (miel dilué) à tester (à raison de 10µl/disque) (Celiktas *et al* ; 2007) et appliqués, à l'aide d'une pince, sur la surface du milieu GMH. Les boîtes de Pétri sont laissées pendant 4 heures dans le réfrigérateur avant d'être incubées pendant 24 heures à 37°C.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition.

8.2. Méthode des puits

Principe

Cette méthode permet de déposer le miel, à l'aide de pipette pasteur stérile, dans des puits creusés contenant le milieu Muller-Hinton renfermant préalablement les souches testées (Adèle et Aschi, 2000).

Mode d'opération

Pour chaque suspension bactérienne, l'inoculum (de départ) doit être fixé à une concentration référentielle de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml (Miorin *et al*, 2003). Il consiste à tremper un écouvillon dans la suspension et puis à étaler la surface entière avec la gélose Mueller Hinton à trois reprises (même chose à méthode de disque). On a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose. Ensuite un puits est creusé à l'aide d'une pipette pasteur stérile ou par d'embos stérile et on remplit cette puits par le miel dilué qu'on veut tester. Les boites laissées à la température du laboratoire pendant 30 minutes, et incubées dans une étuve à 37°C pendant 24H, la lecture des résultats s'effectue par mesure du diamètre des zones d'inhibitions en (mm).

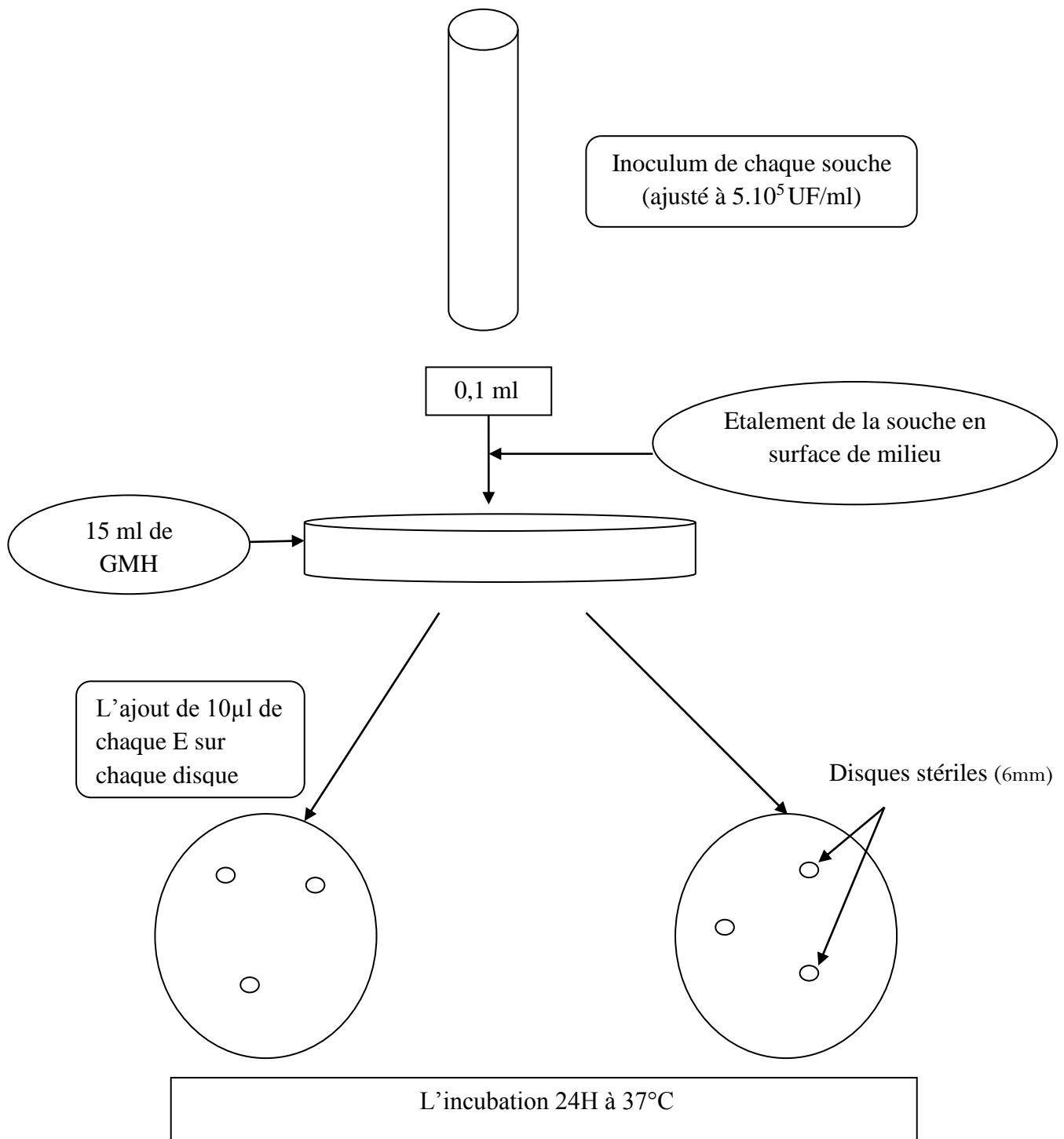


Figure 7: Schéma de la méthode de diffusion sur disque (Ela *et al* ; 1996).

III.1. Objectif

L'objectif principal de notre travail consiste en :

- ❖ Etude physico-chimique des différents miels
- ❖ Détermination des spectres polliniques de chaque échantillon étudié pour déterminer l'origine florale.
- ❖ L'identification et purification des souches testées.
- ❖ La mise en évidence de l'activité antibactérienne du miel et la sensibilité aux antibiotiques sur (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *L. monocytogene*).

3. Résultat de confirmation de l'identification des souches pathogènes

3.1. Examen macroscopique

3.1.1. *Escherichia coli*

L'examen macroscopique révèle que les colonies d'*Escherichia coli* sont légèrement opaques, blanchâtres, et brillantes (figure).

IV.3.1.2. *Staphylococcus aureus*

L'observation à l'œil nu montre la présence des colonies lisses, luisantes, et bombées à contour régulier (figure).

IV.3.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

IV.3.1.4. *Bacillus subtilis*

Les colonies sont de forme irrégulière avec une marge dentelée, translucide de couleur blanche crème ou jaune avec une surface brillante et une consistance gluante (figure).

IV.3.1.5. *Listeria monocytogenes*

Les colonies apparaissent de petite taille, lisse, convexes à bords réguliers et de couleur blanc laiteux en lumière réfractée. Elles présentent en transillumination optique, une coloration bleu vert caractéristique (figure).

3.2. Examen microscopique

E. coli, les bacilles sont courts à Gram négatif, disposées en chaînette et isolés (**figure**)

S.aureus, les cellules apparaissent sous forme coccisphérique avec de coloration de Gram positif. Ils sont isolés ou groupés en diplocoques, en amas irréguliers ou grappe de raisin (figure).

P.aeruginosa, sont des bacilles Gram négatifs fins droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules.

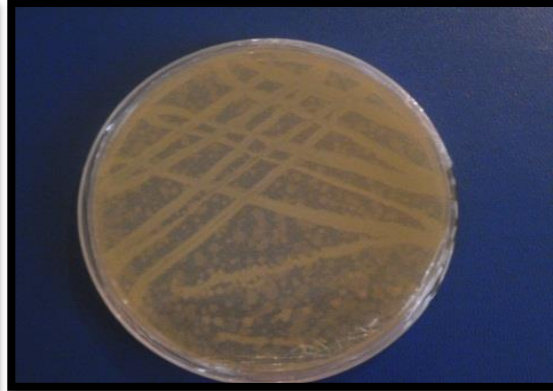
B.subtilis, présentent sous forme des bacilles assez gros, parfois à bouts carrés les cellules montrent à Gram + (figure).

L.monocytogene, est un bacille non capsulé, non sporulé, elle reste immobile à 37°C avec Gram + (figure).

3.1. L'aspect macroscopique



E. coli



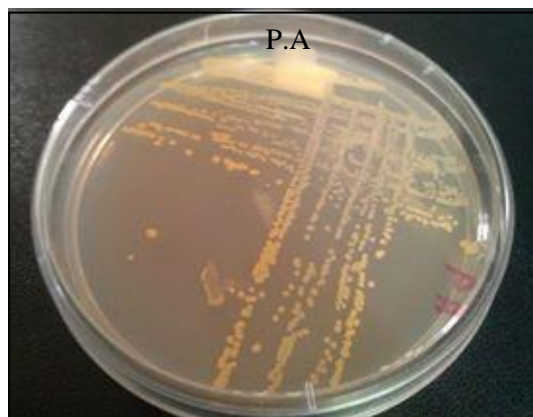
S. aureus



B. subtilis



L. monocytogenes

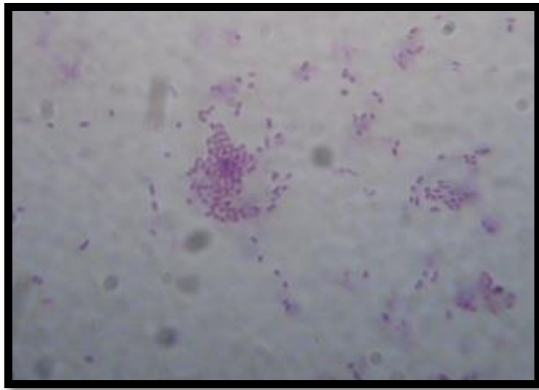


P. aeruginosa

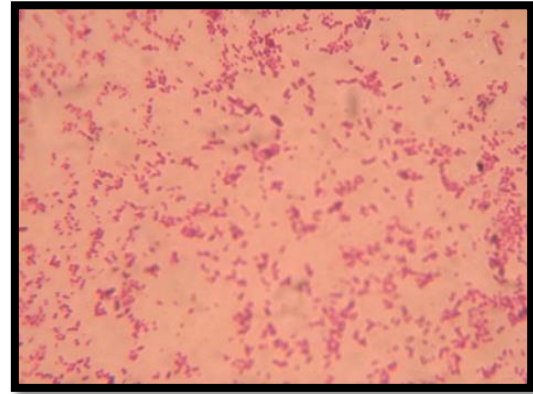
Figure 13 : l'examen macroscopique de bactéries testées.

3.2. Coloration de Gram

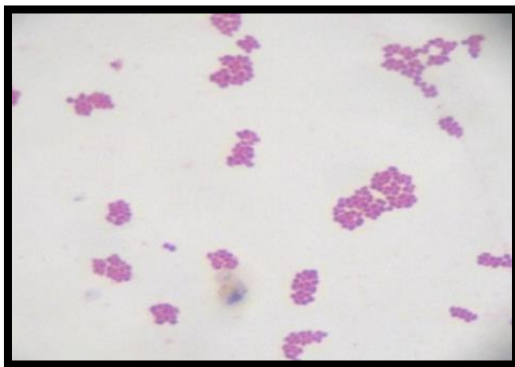
Les résultats sont résumés dans les photos ci-dessous.



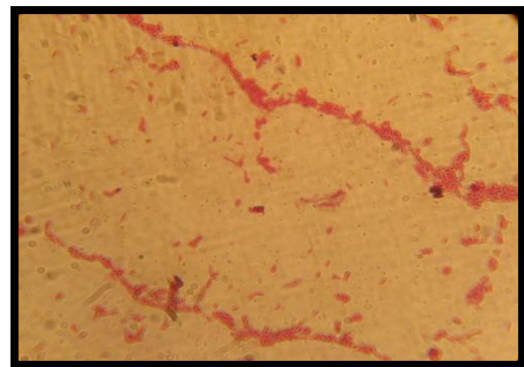
B. subtilis (Gram +)



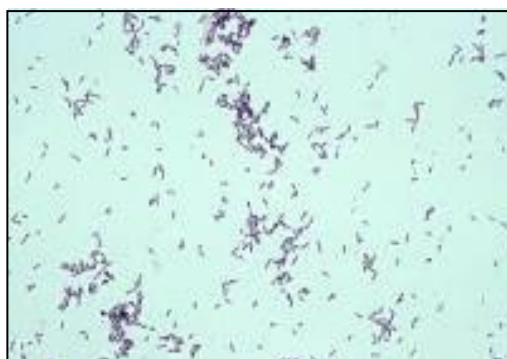
E. coli (Gram-)



S. aureus (Gram+)



P. aeruginosa (Gram -)



L. monocytogene

Figure 14 : coloration de Gram de bactéries testées (Gx100).

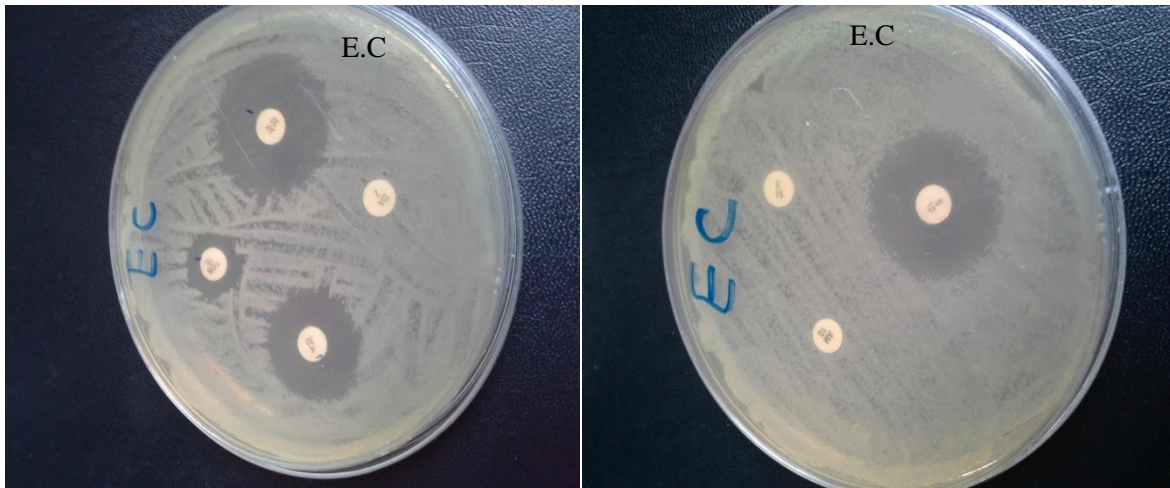
4. Test de la sensibilité aux antibiotiques

Les résultats de sensibilité aux antibiotiques a été résumé dans le Tableau15.

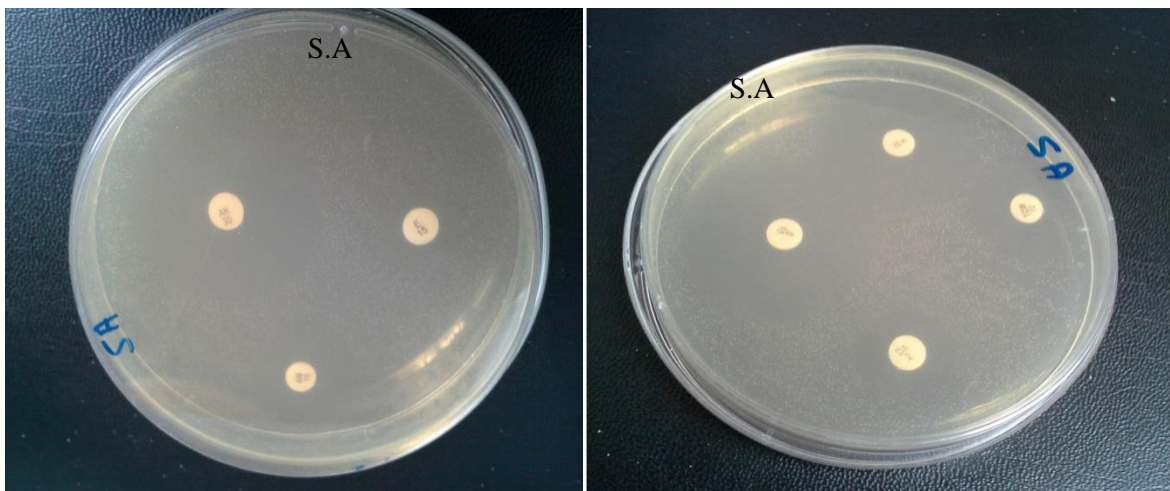
Tableau 15 : Résultats de sensibilité aux antibiotiques contre les microorganismes cibles

Code ATB	Les souches bactéries				
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
E15	/	11	14	11	/
Am10	/	19	12	11	/
S10	23	35	15	29	25
Tob10	14	24	11	15	13
DA2	/	17	25	10	11
AK30	25	35	19	27	26
K30	21	33	17	22	20

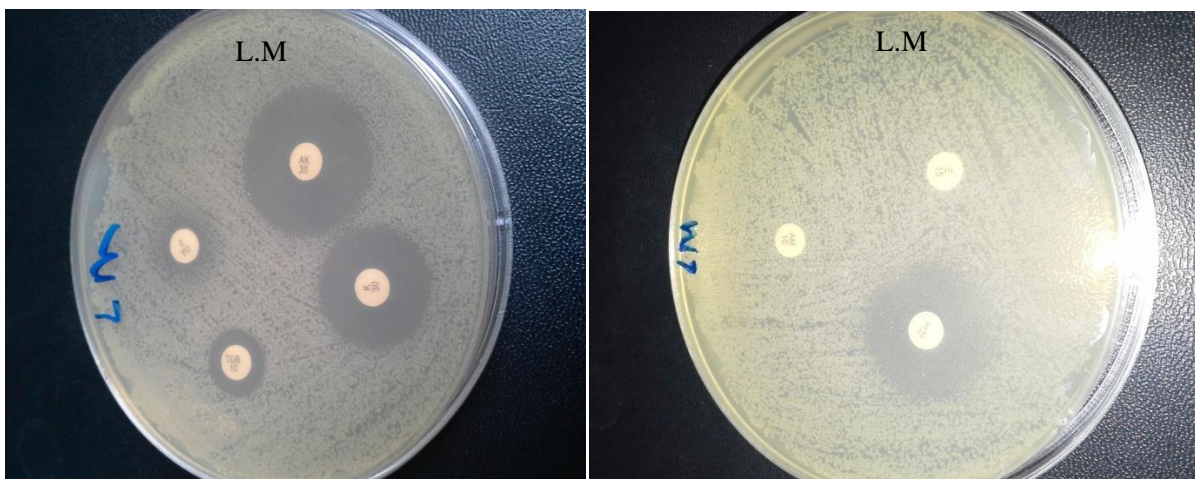
Nos résultats indiquent que les souches *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis* montrent une sensibilité à tout les antibiotiques testées par des zone d'inhibition variété entre 11mm et 35mm. Les souches *E. Coli* résistance à ATB (E15, Am10, DA30) et sensible à l'autre. *L. monocytogene* résistances à ATB (E15, Am10), sensible à l'autre. La souche *S. aureus* le plus sensible avec une zone d'inhibition élevée 35mm.



E. coli



S. aureus



L. monocytogenes



B. Subtilis



P. Aeruginosa

Figure 09 : Test de sensibilité aux antibiotiques

5. Effet antibactérien des miels

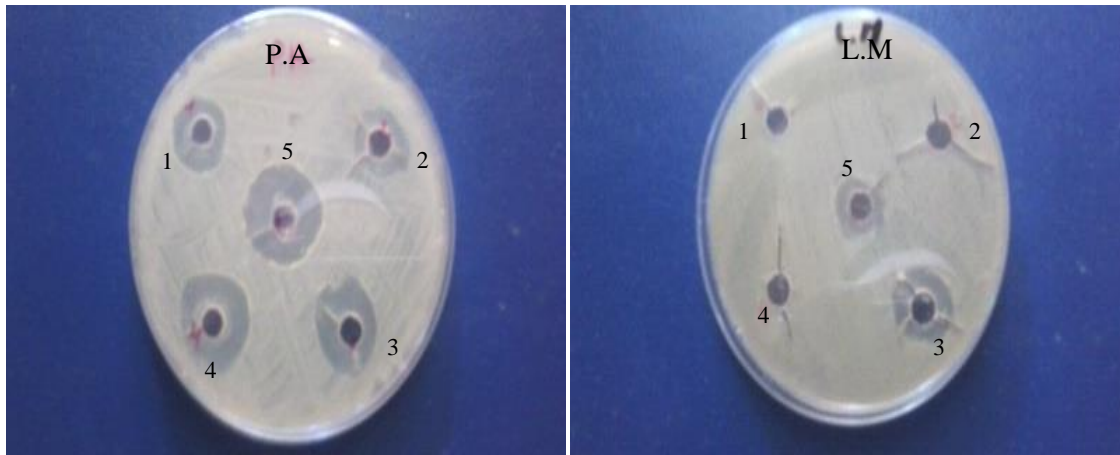
5.1. Résultats de méthode de puits

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du miel est basée sur les mesures des diamètres en (mm) des halos d'inhibition des différents échantillons de miel. Ces mesures permettent de déterminer l'activité antimicrobienne du miel in vitro (**figure 16**). Les résultats des antibiogrammes sont résumés dans le **tableau 16**.

Tableau16 : Résultats de l'activité antibactérienne de miel dilué des échantillons étudiés avec les 5 bactéries (méthode de puits)

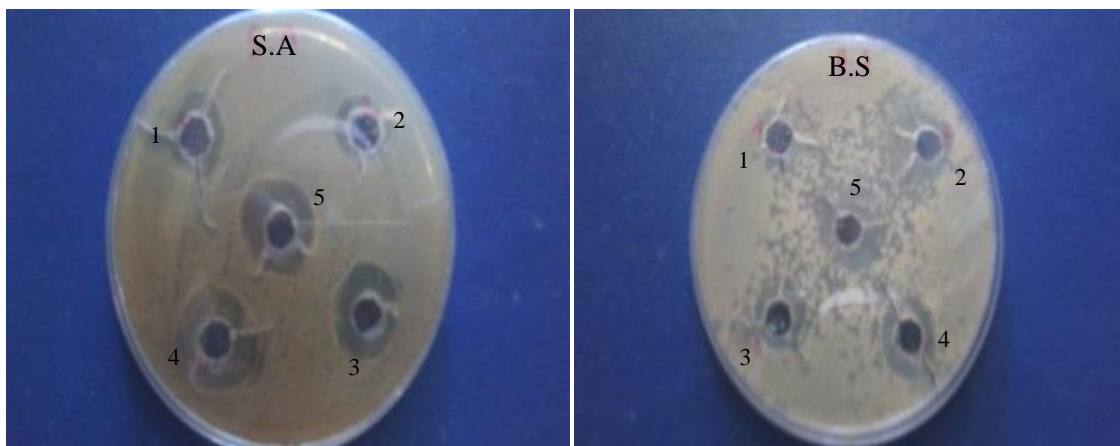
Echantillon S	E. Coli	P. aeruginosa	S. auruse	B. subtilus	L. monocytogene
E1	15	15	15	15	09
E2	20	18	17	11	10
E3	18	10	13	08	/
E4	25	16	20	12	09
E5	40	19	18	20	11

D'après les résultats obtenues on a constaté que la souche *E. coli* a une grande sensibilité vis-à-vis dans tout l'échantillon de miel, vient par la suite la souche de *P.aeruginosa* qui présente une sensibilité à l'échantillon (E1, E2, E4, E5) et modérément sensible à l'échantillon (E3) par zone d'inhibition 11mm. Même la souche *S.aureus* sensible à tous les types d'échantillons du miel. *B.subtilis* présente une sensibilité à l'échantillon (E1, E4, E5) et modérément sensible à E2, E3. *L.monocytogene* modérément sensible à tous l'échantillon sauf E3.



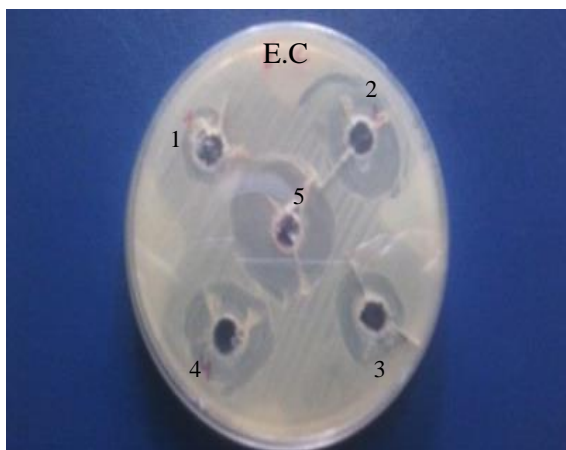
P. Aeruginosa

L. Monocytogenes



S. aureus

B. Subtilis



E. C

Figure 16 : Les zones d'inhibition d'effet du miel étudié avec méthode de puits pour les souches testées

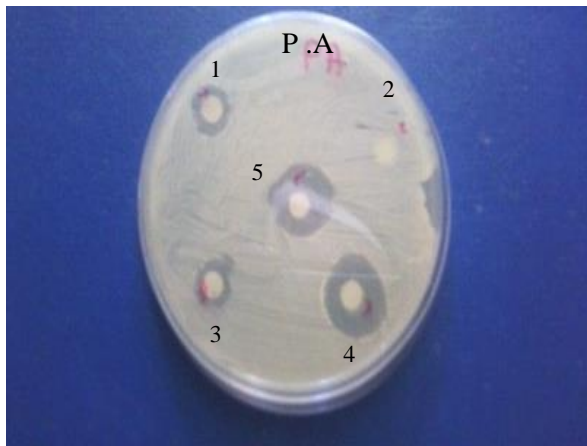
5.2. Résultats de méthode de diffusion sur disques

Les résultats obtenus présentés dans le tableau 17.

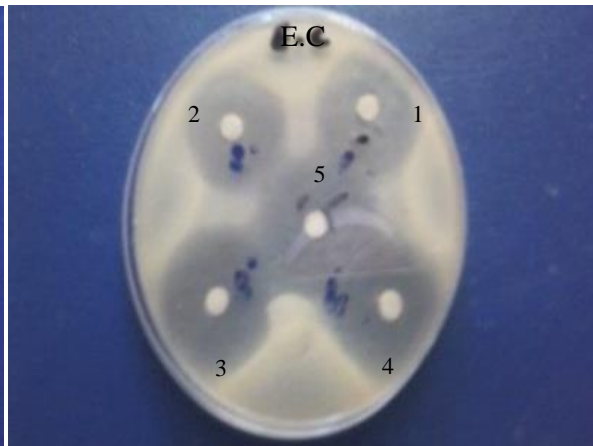
Tableau 17 : Résultats de l'activité antibactérienne de miel dilué des échantillons étudiés avec les 5 bactéries (Méthode de disques)

Echantillon S	E. Coli	P. aeruginosa	S. aureus	B. subtilis	L. monocytogene
E1	28	11	15	15	/
E2	30	17	18	11	/
E3	25	/	12	08	/
E4	29	10	16	12	16
E5	31	19	11	20	14

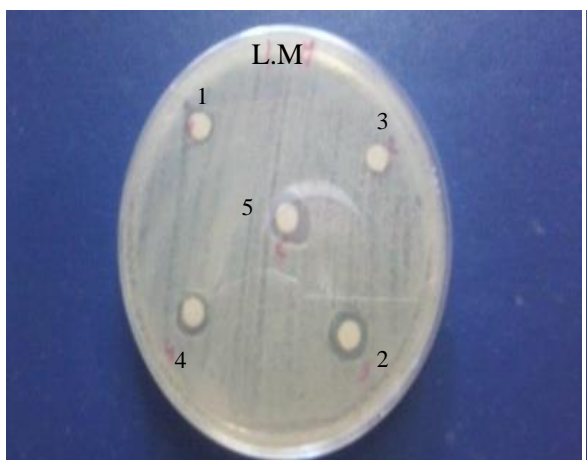
D'après les résultats illustrés sur le **tableau** on peut constater que la souche *E. coli* très sensible aux cinq types de miel étudiés (E1, E2, E3, E4, E5) avec des différences d'un type à un autre. La souche *P. aeruginosa* présente une sensibilité à l'échantillon (E2, E5) et faiblement sensible à E1, E4. Pour la souche *S.aureus* est sensible à l'échantillon (E1, E2, E3, E4) et modérément sensible à E5 par zone d'inhibition de 11mm. Concernant *B.subtilis* contient une sensibilité à l'échantillon (E1, E4, E5) et modérément sensible à E2, E3. Par la suite la souche *L.monocytogene* qui présente une sensibilité à E4, E5, et aucun effet à l'autre échantillon. Il y a une efficacité remarquable de miel E4 et E5 que ceux de l'échantillon importé E2.



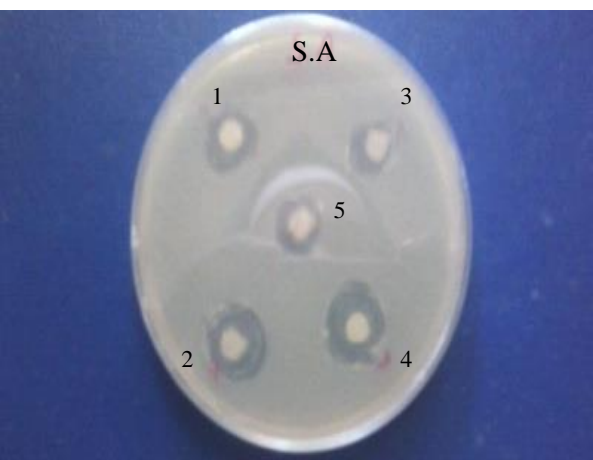
P. Aeruginosa



E. Coli



L. Monocytogenes



S. aureus



B. Subtilis

Figure 17: Les zones d'inhibition de l'effet du miel étudié avec méthode de disques pour les souches testée.

Résumé :

Le miel est un composé biologique très complexe, d'une très grande diversité, lui conférant une multitude de propriétés, aussi bien sur le plan nutritionnel que sur le plan thérapeutique. Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude d'effet de miel. L'objectif de notre travail vise à faire une étude physico-chimique et phytochimique, et l'activité antibactérienne de quelques types du miel récoltés dans différentes régions de Saida (Eucalyptus, Orange, Sudre, Forêt) et Sidi-Bel-Abbès (Forêt). Les résultats physico-chimiques ont prouvés qu'il y avait des différences d'un échantillon de miel à l'autre et ils répondent aux normes internationales. La détermination de l'activité antibactérienne de différents miels par les deux méthodes de disques et puits présente une bonne activité antibactérienne vis-à-vis *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, et faible effet de type du miel contre *Bacillus subtilis*, *Listéria monocytogene*.

Mots clés : Miel, analyses physico-chimiques, phytochimique, activité antibactériennes.

المخلص

إن العسل مركب بيولوجي جد معقد ذات عالي مما يعطيه خواص متعددة من الجانب الغذائي كما من الجانب الطبي. يتركز تنوع الاهتمام الأكبر للبحوث الحالية حول دراسة الجزيئات الطبيعية المضادة للأكسدة. يهدف عملنا هذا إلى الدراسة الفيزيوكيميائية و الفيزيونيوتية لعينات من العسل مأخوذة من مناطق مختلفة سعيدة (سدر و مختلف الزهور، كالتبوس، البرتقال، الغابة) و سيدي بلعباس (الغابة) أثبتت النتائج الفيزيوكيميائية وجود اختلافات بين عينة و أخرى و التي كانت ضمن المواصفات العالمية. الكشف عن نشاطه المضاد للبكتيريا اظهر فعالية قوية ضد

Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus

وننتائج ضعيفة لبعض أنواع العسل ضد

Bacillus subtilis, Listéria monocytogene

الكلمات المفتاحية: العسل، التحاليل الفيزيوكيميائية، نشاطه ضد البكتيريا.

Abstract:

The Honey is a very complex biological compound with very wide diversity, giving it a multitude of properties, both nutritionally as therapeutically. Much of the current research interest focuses on the study of honey effect. The objective of our work is to make a physicochemical and phytochemical, and antibacterial activity study of some types of honey which were harvested in different regions of Saida (Eucalyptus, Seder, Orange, and Forest) Sidi-Bel-Abbes (Forest). The physicochemical results have proven that there were differences from one sample of honey to another and are within international standards. The determination of the antibacterial activity of the different honey the tow method of the disque and of the wells has a good antibacterial activity vis-à-vis *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and foible effect of the type of honey utilizing against *Bacillus subtilus*, *Listéria monocytogene*.

Keywords: Honey, physicochemical analyses, antibacterial activity.

- ❖ **Acqarone C., Buera P. and Elizalde B. (2007).** Pattern of PH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chem*; 101: 695-703.
- ❖ **Adèle et Aschi. (2000).** Coparative studies of the antimicrobial (Growth effects of some local and imported bees honey. Thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science. Department of biological. Faculty of science. Arabic Saudi
- ❖ **Agroalimentaire. (2005).** Comité canadien sur la résistance aux antibiotiques.
- ❖ **Ahmad M, Urban C, Mariano N, Bradford PA, Calgani E, Projan JS et coll(1999).** Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis*; 29:352-5.
- ❖ **AI D., Daniel D., Moise O., Bobis L. et Bogdanov L. (2009).** Propriétés physico-chimiques et propriétés bioactives des différents miels d'origine florale de la Roumanie. *Food Chem*; 112:863-867.
- ❖ **Alnaqdy A, Al-Jabri A, et al (2005).** Inhibition effect of honey on the adherence of Salmonella to intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol* 2005 September 15;103(3):347-51.
- ❖ **Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi AA. (2011).** Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *ScientificWorldJournal*. 11:766-87.
- ❖ **Al-Waili NS, Salom K, Butler G, Al Ghamdi AA (2011).** Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *J Med Food*. 14:1079-96.
- ❖ **Amrouche L. et Kessi L. (2003).** Etude de la qualité physico-chimique de quelques miels. Mémoire. Ingénieur. U.S.T.H.B. Alger. 49p.
- ❖ **Andria manalina F, 2003.** Apiculture récolte traitement du miel Agridoc p6.
- ❖ **Anonyme 1 a (2007).** Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, page 1-3.
- ❖ **Anonyme 2 a (2005).** Antibiothérapie 1 & 2, page 2-39.
- ❖ **Anonyme 3 a (2006).** Antibiotiques. Cours de Bactériologie Générale. Faculté de Médecine COCHINPORT-ROYAL, Université PARIS.
- ❖ **Anonyme 3 d (2006).** Cours Pharmacologie DCEM1, page 307-320. Université Paris-VI. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.
- ❖ **Anonyme 4 (2003).** Antibiotiques. Les antibiotiques sont de précieux alliés à préserver, 24-32.
- ❖ **Anonyme 7 d (2008).** Pharmacologie des Antibiotiques, p2-60. Cours de Pharmacologie DCEM3. Centre d'Investigations Cliniques.
- ❖ **Anonyme 8 (2000).** Spectrométrie de masse organique et bio-organique, page 2-8.

- ❖ **AOAC 31-168.** Guide d'analyse physico-chimique. Centre Algérien de Contrôle Qualité et d'Emballage (CACQE).
- ❖ **Apimondia. (2001).** standing commission of apitherapy (2001) Traité d'apithérapie, La médecine par les abeilles [cédérom] v.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R' Brussels. ISBN : 2-9600270-0-0
- ❖ **Archer HG, Barnett S, Irving S et al. (1990).** A controlled model of moist wound healing: comparison between semipermeable film, antiseptics and sugar paste. *J Exp Pathol. (Oxford)* 71:155-70.
- ❖ **Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre (1980).** réglementant la commercialisation du miel en Nouvelle Calédonie p1042. *Jonc* du 08 septembre 1980.
- ❖ **Arvanitoyannis IS, Chalhoub C, et al (2005).** Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 45(3):193-203.
- ❖ **Avorn JL, Barrett JF, Davey PG, McEwen SA, O'Brien TF, Levy SB (2001).** Organisation mondiale de la sante (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics.
- ❖ **Avorn JL, Solomon DH (2000).** Cultural and economic factors that (mis) shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. *Ann Intern Med*; 133:128-35.
- ❖ **Azeredo L. D. C., Azeredo M. A. A., De Souza S. R. and Dutra V. M. L., 2003.** Protein content and physicochemical properties in honey samples of *Apis Mellifera* of different floral origins. *Food Chem* ; 80: 249–254.
- ❖ **Bergman A, Yanai J, Weiss J et al. (1983).** Acceleration of wound healing by topical application of honey. An animal model. *Am J Surg.* 145:374-6.
- ❖ **Biglari B, VD Linden PH, Simon a et al (2012).** Use of Medihoney as a non-surgical therapy for chronic pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Spinal Cord*; 50:165-9.
- ❖ **BIRI. M(1999).** Le grand livre des abeilles, L'apiculture moderne, Paris Edition DEVECCHI., p 75.
- ❖ **Bittmann S, Luchter E, Thiel M et al (2010).** Does honey have a role in paediatric wound management? *Br J Nurs.*;19:S19-20, S22, S24.
- ❖ **Bogdanov S, Rieder K, Rüegg M (1987)** Neue Qualitätskriterian bei Honiguntersuchungen. *Apidologie* 18, 267-278.
- ❖ **Bogdanov S., 1999.** Stockage-cristallisation et liquéfaction du miel. Centre suisse de recherche apicole ; 05p.

- ❖ **Bogdanov S., Ruoff K. and Persano.L. (2004).** Physico-chemical methods for characterization of unifloralhoney : a review. *Apidologie*; 35:4-17.
- ❖ **Bogdanov,S.(1999).** International Honey Commission. Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey commission. *Bee-World.* . 80(2):61-69.
- ❖ **Bogdanov,S.(2003).** miel. *Apidologie*.23 (A) :1-31
- ❖ **Bogdanov,S., Bieri,K., Figar,M., Figueiredo,Kanzig.A.(1995).** Miel: définition et directives pour l'analyse et l'appréciation.*Apic*.17:1-17
- ❖ **Bogdanov. S, Bieri. K, Gremaud. G, 2004.** Produits apicole, pollen, Agro scope Liefelfeld-Posieux, Station fédérale de recherche en production animal et laitière (ALP), centre de recherche apicoles, Liefelfed-Berne, 6p, 37p.
- ❖ **Brudzynski K, Lannigan R. (2012).** Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Front Microbiol.* 3:36.
- ❖ **Brudzynski K. (2006).** Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys.*Can J Microbiol.* 52:1228-37.
- ❖ **CAILLAS A(1974).** Le rucher de rapport, Les produits de la ruche, *Traité pratique d'apiculture moderne*, Edition .syndicat national d'apiculture, Paris, p.497.
- ❖ **Cano, C.B. (2003)** .Characterization of eucalyptus and citrus monofloral honey in São Paulo State by pollen and physical –chemical analysis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 63.
- ❖ **Celikats, O.Y. Hames Kocabas, E.E. Bedir,E. Vardar Sukan, F ; Ozek, T ; Baser, K.H.C. (2007).** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variation. *Food Chem*; 100: 553-559.(méthode de disque)
- ❖ **Chambers J (2006).**Topical manuka honey for MRSAcontaminated skin ulcers. *Palliat Med.* 20:557.
- ❖ **CHAUVIN R(1986).** ; L'abeille et la fleur in *traite de biologie de l'abeille (T3)*, Edition Masson et Cie, Paris, p.95, 286-7, 293-4-9, 304-6-7.
- ❖ **Classen DC, Evans RS, Pestonik SL, Horn SD, Menlove RL, Burke JP. N Engl J Med 1992.** The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgicalwound infections; 326:281-6.
- ❖ **Codex alimentarius. (2001).** Commission du Codex Alimentarius, 2001. Edition FOA. O.M.S
- ❖ **Codex Alimentarius. (2001).** Codex stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev.2.
- ❖ **Conly J (2002).** Antimicrobial resistance in Canada. *CMAJ*; 167:885-91.

- ❖ **Cooper R, Jenkins R. (2012).** Are there feasible prospects for manuka honey as an alternative to conventional antimicrobials? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 10:623-5.
- ❖ **Davies J (1996).** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia;* 12:9-16.
- ❖ **Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr., Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP et coll (2007).** Infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis;* 44:159-77.
- ❖ **Descottes B. (2009).** Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 années. *Phytothérapie.* 7:112-6.
- ❖ **Dold H, Du OH, Dziao ST (1937)** Nachweis antibakterieller, itze und lichtempfindlicher Hemmungsstoffe (Inhibine) im Naturhonig (Blütenhonig). *Z Hyg Infektionskr* 120, 155-167.
- ❖ **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. Paris. 5eme édition, p75
- ❖ **DONADIEU Y(2006).** Les thérapeutiques naturelles, produits de la ruche, miel, p.6.
- ❖ **Donadieu.Y. 2003.** qu'est que le miel. Chapitre E. Faculté de médecine de paris. 07p.
- ❖ **Ela C ; Eiden C; Jalabert A; Margueritte G et Ernard F. (1996).** Etude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle, phytothérapie, p 24-30.(schéma de méthode de D)
- ❖ **Estupinan,S., Sanjuan,E., Millan,R., Gonzalez-Cortes,M.A .(1993)** Quality parameters for honey "Microbiological, physico-chemical and ageing characteristics". *Alimentaria.* 296: 89-94.
- ❖ **Estupinan,S., Sanjuan,E., Millan,R., Gonzalez-Cortes,M.A .(1998).** Quality parameters of honey: 1. Microbiology, physicochemical characteristics and oldness .*Alimentaria..* 296: 89-94.
- ❖ **Finola M .S., Lassagno M.C. and Marioli J.M. (2007).** Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chem ;* 100 :1649-1653.
- ❖ **French VM, Cooper RA, Molan PC. (2005).** The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 56:228-31.
- ❖ **Gonnet M., 1982.** Le miel : composition, propriétés,conservation. Ed. Echauffour. Argentan. Ornes. 9-12 pp.
- ❖ **Graham DR, Correa-Villasenor A, Anderson RL, Vollman JH, Baine WB. (1980).** Epidemic neonatal gentamicin-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection associated with nonspecific topical use of gentamicin. *J Pediatr;* 97:972-8.
- ❖ **Gupta SS, Singh O, Bhagel PS et al. (2011).** Honey dressing versus silver sulfadiazene dressing for wound healing in burn patients: a retrospective study. *J Cutan Aesthet Surg.* 4:183-7.

- ❖ **Hadorn, H., Zürcher, K., und Doevelaar, F., Über Wärme- und Lagerschädigungen , von. (1962).** Bienenhonig, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 53:191-229
- ❖ **Horn, H., und Lüllmann, C. (1992).** Das grosse Honigbuch. Verlag Ehrenwirth. München
- ❖ **Iftikhar F, Arshad M, Rasheed F et al. (2010).** Effects of acacia honey on wound healing in various rat models. *Phytother Res.* 24:583-6.
- ❖ **Imán Morales, C. (1990).** "Evaluación de las principales características del envase ideal para le miel y la influencia del material de éste sobre sus propiedades durante su conservación". Tesis. UADY.
- ❖ **Jones RN (2001).** Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest*; 119(supple 2):397-404
- ❖ **JP et coll (2007).** Infectious diseases society of America and the society for healthcare epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*; 44:159-77.
- ❖ **KERKVLiet JD. (1996).** Screening method for the determination of peroxide accumulation in honey and relation with HMF content. *J. Apicult Res*, 35, 110-117.
- ❖ **Knothe GP, Shah P, Kremery V, Antai M, Mitsuhashi S (1983).** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*; 11:315-7.
- ❖ **Kohlich, A., Krenn, H. (1985).** Effect of pH and concentration of sodium dodecyl sulphate. *Mitteilungen-Klosterneuburg-Rebe-und-Wein,-Obstbau-und-Fruchteverwertung.* 35(5):210-217.
- ❖ **Kwakman PH, Müller MC, Binnekade JM et al. (2012).** Medical-grade honey does not reduce skin colonization at central venous catheter-insertion sites of critically ill patients: a randomized controlled trial. *Crit Care.* 16:R214.
- ❖ **Kwakman PH, te Velde AA, de Boer L, Speijer D et al. (2010).** How honey kills bacteria. *FASEB J.* 24:2576-82.
- ❖ **Kwakman PH, Van den Akker JP, Güçlü A et al. (2008).** Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis.* 46:1677-82.
- ❖ **Kwakman PH, Zaat SA. (2012).** Antibacterial components of honey. *IUBMB Life.* 64:48-55.
- ❖ **Ialomiteanu, M, Daghe V (1973)** Investigations of the antibiotic qualities of honey. XXIV Int Congr Apic Proc Buenos Aires 438-440.
- ❖ **Lee DS, Sinno S, Khachemoune A (2011).** Honey and wound healing: an overview. *Am J Clin Dermatol.* 12:181-90.

- ❖ **Lewis R. (2009)** US Food and Drug Administration (FDA). The rise of antibiotic-resistant infections.
- ❖ **Livermore DM. (1995)**. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev; 8:557-84.
- ❖ **Louveaux J., 1968**. Composition, propriétés et technologie du miel. « In Chauvin».R. Traité de biologie de l'abeille. Ed Masson et Cie. Paris. Tome 3. 277-324pp.
- ❖ **Louveaux. (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
 - ❖ **LOUVEAUX. J, MAURIZIO. A et VORWOHL. G, (1970), Les méthodes de la mélisso-palynologie, commission internationale de botanique apicole de l'U.I.S.B. 17p.**
- ❖ **Malik KI, Malik MA, Aslam A (2010)**. Honey compared with silver sulphadiazine in the treatment of superficial partial thickness burn. Int Wound J.p 7:413-7.
- ❖ **Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell**. Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA. Edition en ligne. (site visité le 1er avril 2009).
- ❖ **McCarthy BJ, Hinshelwood CFRS (1959)** Variations in catalase activity during a bacterial growth cycle. Proc R Soc B 150, 13-23.
- ❖ **McEwen S (2002)**. Santé Canada, Rapport du Comité consultatif sur l'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux et les conséquences pour la résistance et la santé humaine. Direction des médicaments vétérinaires.
- ❖ **Mendes,E, Proenca,EB, Ferreira,IMPLVO, Ferreira,MA, Bento,LSM.(1997)**.Quality evaluation of Portuguese honey. Special issue. Gluportwo - Second International Meeting of the Portuguese Carbohydrate Chemistry Group. Porto. Portugal.21-25.
- ❖ **Mesquine et M Djebari Z**. Contribution à l'étude physico-chimique, pollinique et de l'activité antimicrobienne des différents miels Algérien ; P37-38.Mémoire de l'ingénieur Université Moulay Tahar de Saida, 2014.
- ❖ **Moghazy AM, Shams ME, Adly OA et al (2010)**. The clinical and cost effectiveness of bee honey dressing in the treatment of diabetic foot ulcer. Diabetes Res Clin Pract; 89:76-81.
- ❖ **Molan PC, Russell KM (1988)**. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. J Apic Res 27, 62-67.
- ❖ **Morley PS, Apley MD, Besser TE, Burney DP, Fedorka-Cray PJ, Papich MG et coll (2005)**. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. J Vet Intern Med; 19:617-29.

- ❖ **Murthy R (2001)**. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest*; 119(suppl 2):405-11.
- ❖ **Nancy (2005)**. «*Le miel, de la source à la thérapeutique*», thèse soutenue par Clémence Hoyet pour l'obtention du diplôme d'état de pharmacien, Université Henri Poincaré.
- ❖ **Nandaa V., Sarkara B.C., Sharma H.K. And Bawa A.S.J. (2003)**. Determination of Some major and minor elements in the east of morocco honeys through inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Comp. Anal*; 16(5): 613-619.
- ❖ **Nasir NA, Halim AS, Singh KK et al. (2010)**. Antibacterial properties of tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study. *BMC Complement Altern Med*. 10:31.
- ❖ **Olaitan P.B, Adeleke O.E, Ola I.O. (2007)**. Honey: a reservoir for microorganisms and inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*. 7:159-65.
- ❖ **Osugwu FC, Oladejo OW, Imosemi IO et al. (2004)**. Enhanced wound contraction in fresh wounds dressed with honey in Wistar rats (*Rattus Novergicus*). *West Afr J Med*. 23:114-8.
- ❖ **Ouchemoukh S, Louaileche H. and Schweizer P. (2007)**. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Chem*; 18: 52-58.
- ❖ **Ozcan M.D. and Arslam D.A. (2006)**. Phenolic profiles and antioxidant capacities of chineseunifloral honeys from different botanical and geographical sources. *Food Chem*; 99:24-27.
- ❖ **Pérez-Arquillue C., Conchello P., Ariño A., Juan T. and Herrera A. 1995**. Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chem* ; 54:167–172.
- ❖ **Pestotnik SL (2005)**. Expert clinical decision support systems to enhance antimicrobial stewardship programs: insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*; 25:1116-25.
- ❖ **Pitout JD, Hanson ND, Church DL, Laupland KB (2004)**. Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β s-lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M Genes. *Clin Infect Dis*;38:1736-41
- ❖ **Popeskovi&jadnr; D, Daki&jadnr; M (1979)** Antibacterial effect of three honey types after heat treatment. XXVII Int Congr Apic, Athens, 491-495.
- ❖ **Prica M (1938)** Über die baktericide Wirkung des Naturhonigs. *Z Hyg Infektionskr* 120, 437-44 3.
- ❖ **PROST P(1979)**. Apiculture, Paris, Edition J-B.Baillière, P.140-1, 270-2-3,303-15.

- ❖ **Ramírez cervantes, M.a., s.a, González novelo., Sauri duch. (2000).** Les effets du traitement thermique sur la qualité du miel pendant l'entreposage Apiacta. 35 (4):162 – 170.
- ❖ **Ricciardelli-d'-Albore,G.(1994).** Characterization of honeys from the Veneto region [Italy] by quality and geographical origin. Annali-della-Facolta-di-Agraria,-Universita-degli-Studi-di-Perugia. 48: 457-492.
- ❖ **Rossant A. (2010).**Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse Pharm : Université de Limoges.
- ❖ **Russo-Almeida, P. A. (1997).** Some chemical parameters of honey from transmontane Terra Quente .Apicultor. 5(16): 29-35.
- ❖ **Rybak MJ (2004).** Resistance to antimicrobial agents: an update. Pharmacotherapy; 24 (suppl12):203-15.
- ❖ **Saber A (2010).** Effect of honey versus intergel in intraperitoneal adhesion prevention and colonic anastomotic healing: a randomized controlled study in rats. Int J Surg. 8:121-7.
- ❖ **Sancho MT; Munatezui S; Huidobro JF ; Simal J. (1992).** Agiong of honey.j. Agric. Food Chem.(Tech absorbance)
- ❖ **Sancho, M.T., Muniategui, S., Sanchez, M.P., Huidobro, J.F. and Simal, J. (1991).** Relationship between electrical conductivity and total and sulphated ash contents in Basque honeys. Apidologie.22.487-494
- ❖ **Sanders CC, Sanders WE Jr (1992).** s-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis; 15:824-39.
- ❖ **Saxena S., Gautam S. and Sharma A., 2010.** Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. Food Chem; 1(3): 202-203.
- ❖ **Schweitzer P. 2005a.** Encore des miels hors normes. Revue l'abeille de France N°917. Laboratoire d'analyse et d'écologie apicole. 03p.
- ❖ **Schweitzer P., 2004.** Le monde des miellats. Revue l'abeille de France N°908 .Laboratoire d'analyse et d'Ecologie Apicole. 02p.
- ❖ **Shukrimi A, Sulaiman AR, Halim AY, Azril A (2008).** A comparative study between honey and povidine iodine as dressing solution for Wagner type II diabetic foot ulcer. Med J Malaysia; 63:44-6.
- ❖ **Simonsen GS, Tapsall JW, Allegranzi B, Talbot EA, Lazzari S (2004).** The antimicrobial resistance containment and surveillance approach – a public health tool. Bulletin of World Health Organization; 82:928-34
- ❖ **Singh,N., Bath,PK .(1997).**Quality evaluation of different types of Indian honey. Food-Chemistry. 58 (2): 129-133.

- ❖ **Singh,N., Bath,PK .(1997).**Quality evaluation of different types of Indian honey. Food-Chemistry. 58 (2): 129-133.
- ❖ **Sorensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Moller N, Poulsen RL, Espersen F (2001).** Transient intestinal carriage after ingestion of antibioticresistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. N Engl J Med; 345:1161-6.
- ❖ **Stephen, W. (1945).**The relationship of moisture content and yeast count in honey fermentation.Scientific agriculture .26:258-264.
- ❖ **Suguna L, Chandrakasan G, Thomas Joseph K. (1992).** Infl uence of honey on collagen metabolism during wound healing in rats. J Clin Biochem Nutr. 13:7-12.
- ❖ **Taormina PJ, Niemira BA, Beuchat LR. (2001).** Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as infl uenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. Int J Food Microbiol. 69:217-25.
- ❖ **The Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Campaign to prevent antimicrobial resistance in healthcare settings.
- ❖ **Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP et al. (2003).** Honey stimulates infl ammatory cytokine production from monocytes. Cytokine. 21:242-7.
- ❖ **Treki, A.S., Merghem, R. et Dehimat, L. (2009).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: Thymus hirtus. Sciences & Technologie, 29: 25-29. (activité antibactérienne)
- ❖ **Tur E, Bolton L, Constantine BE. (1995).** Topical hydrogen peroxide treatment of ischemic ulcers in the guinea pig: blood recruitment in multiple skin sites. J Am Acad Dermatol. 33:217-21.
- ❖ **VERDAN J(2002).** ; Projet de charte qualité miel du parc naturel régional de verdan, p.4.
- ❖ **Vorwohl,G. (1964).** Messung der elektrischen Leitfähigkeit des Honigs und der Verwendung der Messwerte zur Sortendiagnose und zum Nachweis von Verfälschungen mit Zuckerfütterungshonig. Zeitschr. Bienenforsch. 7 :37-47
- ❖ **Vorwohl,G.(1964).**Die Bezeihungen zwischen der elektrischen leitahigkeit der honige und ihrer trachmassigen Herkunft.Ann Abeille 7(4) :301-309.
- ❖ **Wen,HweiMei, Chern, JiingChuan, Chen,SuHwa, Wen, HM, Chern, JC, Chen, SH.(1995).**Quality survey of commercial honey products. Journal-of-Food-and-Drug-Analysis. 3 (4): 295-305.
- ❖ **White JW Jr, Subers MH (1963)** Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. J Apic Res 2, 93-100.

- ❖ **White JW Jr, Subers MH, Shepartz AI (1962).** The identification of inhibine. *Am Bee J* 102,430-431.
- ❖ **Wootton M, Edwards RA, Faraji-Haremi R, Johnson AT (1976).** Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. 1. Colour, acidity and total nitrogen content. *J Apic Res* 15, 23-28.
- ❖ **Yamashita SK, Louie M, Simor AE, Rachlis A (2000).** Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *Can J Infect Dis*; 11:107-11.
- ❖ **Yapucu Gunes U, Eser I (2007).** Effectiveness of a honey dressing for Healing pressures ulcers. *J Wound Ostomy Continece Nurs*; 34:184-90
- ❖ **Yatsunami K, Echigo T (1984)** Antibacterial action of honey and royal jelly. *Honeybee Sci* 5, 125-130 (in Japanese).
- ❖ **Younes T, Diouri A (2004).** Antibioresistance et consommation de viande. *Reviews in Biology and Biothechnology*; 3:2-15.
- ❖ **Yuzbasioglu MF, Kurutas EB, Bulbuloglu E et al (2009).** Administration of honey to prevent peritoneal adhesions in a rat peritonitis model. *Int J Surg.* 7:54-7.

Méthode de coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentiane ; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par la solution de Lugol et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec un solvant comme l'éthanol (95%), la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 1 à 3 sec, et rincé immédiatement à l'eau courante. A ce stade, les cellules Gram (-) seront incolores, les cellules Gram (+) violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 sec à la fuchsine, les cellules Gram (-) présentes une couleur de fuchsine. Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif à huile immersion (grossissement x 100).

Milieu Bouillon nutritif(BN)

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Eau distillée	1000ml

PH= 7,2

Gélose nutritive (GN)

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
Agar	15-20g
Eau distillée	1000ml

PH = 7,2

Eau physiologique

Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml

Milieu Muller-Hinton

Infusion de viande	2g
Hydrolyse de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml

PH = 7,4

Milieu de Chapman

Peptone	11g
Extrait de viande	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10g
Agar	15g
Rouge de phénol	0,025g
Eau distillé	1000ml

PH = 7,4

Les colorants

Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillé	300ml

Violet de gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90	10g
Phénol	2g
Eau distillé	1000ml

Fuchsine

Fuchsine basique	2g
Acide phénique	10g
Alcool absolu	20ml



Dilution du miel



Réfractomètre de type abbé



L'analyse pollinique



Mesure de l'absorbance



Mesure l'acidité