

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Ibn Khaldoun Tiaret  
Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires  
Département des Sciences vétérinaires



MEMOIRE

Pour obtenir le diplôme du

Magister

Option : Pathologie infectieuse et hygiène alimentaire

Thème

**Evaluation *in vitro* de l'effet synergique  
de l'amidon sur l'activité antibactérienne du miel,  
en relation avec l'indice de diastase vis-à-vis de deux  
espèces pathogènes :  
*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus***

Présenté par :

Mr : Aissat Saad

Soutenu le : 03 juillet 2007



République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Ibn Khaldoun Tiaret

Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires

Département des Sciences vétérinaires

MEMOIRE

Pour obtenir le diplôme du

Magister

Option : Pathologie infectieuse et hygiène alimentaire

Thème

**Evaluation *in vitro* de l'effet synergique de l'amidon sur  
l'activité antibactérienne du miel, en relation avec  
l'indice de diastase vis-à-vis de deux  
espèces pathogènes :  
*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus***

Sous la direction de Mr: **Benbarek.Hama**  
Soutenu publiquement devant le jury :

**Président:** Mr **Belabid Lakhdar**, Maître de conférence Centre Universitaire Mascara

**Rapporteur:** Mr **Benbarek.Hama**, Maître de conférence Centre Universitaire Mascara

**Co-rapporteur:** Mr **Boukraa Laid**, Maître Assistant charge de cours Université Ibn-Khaldoune de Tiaret

**Examineurs:**

M<sup>me</sup> : **Meddah Aicha**

Maître de conférence Centre Universitaire Mascara

Mr: **Laaredj Hocine**

Maître Assistant charge de cours Université  
Ibn- Khaldoune Tiaret

**-Année Universitaire 2006/ 2007-**

# Remerciements

*Je tiens à remercier particulièrement et sincèrement  
messieurs:*

*\* Aggad Hbib, chef d'option. Sans lequel ce mémoire  
n'aurait jamais vu le jour, ainsi que pour son aide matérielle  
et morale.*

*Benbarek Hama (promoteur), Boukraa Laid (co-  
promoteur), pour leurs conseils avisés et leur patience.*

*Les Drs:*

*- A. Meddah*

*- L. Belabid.*

*- H. Laaredj*

## *Nos examinateurs*

*Ainsi que toutes les personnes qui ont aidé  
de près ou de loin*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste mémoire*

*A mes parents.*

*A ma campagne dans la vie, qui a su faire  
preuve de patience*

*A mes enfants en espérant leur être un  
bon exemple, et un guide éclairé le long  
du dur chemin de la vie.*

*Aux défunts Méxiani Hassan et  
Rabat Mehdaoui  
et enfin*

*à tous mes amis et ennemis.*

# Table des matières

TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ABREVIATIONS	
RESUME (Français)	
RESUME (Anglais)	
RESUME (Arabe)	
TABLE DES ILLUSTRATIONS	
INTRODUCTION	

<b>CHAPITRE I:</b>	<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I.I. Le miel.....		1
Définition .....		1
I.I.2. Elaboration du miel.....		1
I.I.3. Les différents types de miel.....		3
I.I.3.1. L'origine botanique .....		3
I.I.3.1.1. Miels issus de nectar.....		3
I.I.3.1.1.1. Miels mono floraux .....		3
I.I.3.1.1.2. Miels multi floraux .....		4
I.I.3.1.2. Miels issus de miellat.....		4
I.I.4.1. Les hydrates de carbone .....		4
I.I.3.2. l'origine géographique.....		4
I.I.4. Composition du miel.....		4
I.I.4.1. Les hydrates de carbone.....		5
I.I.4.2. L'eau.....		5
I.I.4.3. Acides aminés et protéine.....		6
I.I.4.4. Les enzymes.....		7
I.I.4.4.1. Diastases et invertases.....		7
I.I.4.4.2. Le glucose oxydase .....		9
I.I.4.4.3. La catalase.....		9
I.I.4.5. Les lipides .....		9
I.I.4.6. Les minéraux et les oligoéléments .....		10
I.I.4.7. Les acides.....		10
I.I.4.8. Substances aromatiques.....		11
I.I.4.9. les vitamines.....		11
I.I.4.10. L'hydroxyméthyl- furfural (HMF).....		12
I.I.5. Substances toxiques présentes naturellement dans le miel.....		12
I.I.6. Les micro-organismes.....		14
I.I.7. Activité antimicrobienne du miel.....		14
I.I.7.1. Généralités.....		14
I.I.7.2. Peroxyde d'hydrogène.....		16
I.I.7.3. Pression osmotique.....		17
I.I.7.4. pH et acidité .....		18
I.I.7.5. Autres substances .....		18
I.I.8. Altérations du miel .....		18
I.I.8.1. Effet de la température.....		18

I.I.8.2. Effet de la lumière.....	19
I.I.8.3. Effet de la fermentation .....	19
I.I.9.Cristallisation du miel.....	20
I.I.9.1. Teneur en sucres et en eau.....	20
I.I.9.2. Température.....	20
I.II. Usages thérapeutiques du miel.....	21
I.II.1. Cicatrisation des plaies.....	21
.II.2. Propriétés cicatrisantes du miel et mécanismes d'action.....	22
I.II.3. Ulcère gastrique, gastrite et diarrhée.....	22
I.II.4. Les troubles cardiovasculaires.....	25
I.II.5.Troubles Ophtalmiques.....	25
I.II.6. Le miel dans le traitement des mammites chez les animaux laitiers.....	25
I.II.7. Propriétés prébiotiques.....	26
I.III. Les maladies staphylococciques.....	26
I.III.1 Les staphylococcies cutanées, sous cutanées et muqueuses.....	26
I.III.2. Le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée.....	27
I.III.3. Syndrome du choc toxique.....	27
I.III.4. Les infections digestives à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
I.III.5. Les septicémies à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
I.III.6. Intoxication alimentaire.....	28
I.III.7. Résistance aux antibiotiques.....	28
I.VI. Affections dues à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
I.VI.1. Surinfection des plaies.....	29
I.VI.2. Infections oculaires.....	29
I.VI.3. Atteintes digestives.....	30
I.VI.4. L'otite externe maligne.....	30
I.VI.5. L' <i>ecthyma gangrenosum</i> .....	30
I.VI.6. Résistances aux antibiotiques.....	30
I.V. Activité antibactérienne du miel vis-à-vis de <i>S.aureus</i> et de <i>P.aeruginosa</i> .....	31
I.VI. Conclusion.....	33
I.VII. L'amidon.....	34
I.VII.1. Source de l'amidon.....	34
I.VII.2. Structure de l'amidon.....	34
I.VII.3.Éléments fondamentaux de l'amidon.....	34

# ÉTUDE EXPERIMENTALE

## Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Lieu d'étude .....	36
II. 2. Matière première.....	36
II.2.1. Le miel.....	36
II.2.2. L'amidon.....	37
II.2.3 Souches bactériennes.....	37
II.3. Analyse physico-chimiques.....	38
II.3.1. Recherche de falsification : méthode de Fiehe.....	38
II.3.2. Détermination de la teneur en eau.....	38
II.3.3. Détermination du pH .....	38
II.3.3.1.Principe.....	38
II.3.3.2. Matériel .....	38
II.3.3.3. Mode opératoire.....	38
II.3.4. Détermination de la teneur en HMF d' après <i>Winkler</i> .....	38
II.3.5. Détermination d'activité de diastase selon Phadebas.....	38
II.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	38
II.4.1.Principe .....	38
II.4.2. Matériels .....	39
II.4.3. Solutions.....	39
II.4.4. Milieu de culture.....	39
II.4.5. Détermination de la CMI .....	39
II.4.5.1. Mode opératoire .....	39
II.4.6. Détermination des concentrations inhibitrice synergiques (CIS) avec une Solution stock d'amidon à 10%.....	40
II.4.6.1. Mode opératoire.....	40
II.4.6.2. Préparation de la solution d'amidon.....	44
II.4.6.3. Préparation d'un milieu à base de miel, d'empois d'amidon et de gélose nutritive.....	40
II.5. Tests confirmatifs.....	41
II.5.1. Test confirmatif à l'eau distillée.....	41
II.5.1.1. Addition d'eau distillée au miel.....	41
II.5.1.2. Addition du mélange (miel et eau distillée) à la gélose nutritive.....	41
II.5.2. Test confirmatif avec l'amidon.....	42
II.5.2.1. Addition de l'empois d'amidon à la gélose nutritive.....	42
II.6. Protocole expérimental.....	43
II.7. Détermination des concentrations inhibitrice synergiques (CIS) avec une solution stock d'amidon à 20%.....	45
II.8. Détermination des concentrations inhibitrice synergiques (CIS) avec une solution stock d'amidon à 30%.....	45
II.9. Rôle des durées d'incubation sur l'effet synergique.....	45
II.10. Traitement statistique.....	46

## Chapitre III

## Résultats

III.1. Test de falsification par rapport aux sucres.....	47
III.2 Teneur en eau.....	47
III.3. pH.....	48
III.4.Teneur en HMF.....	48
III.5 Indice diastasique.....	48
III.6.Valeurs du pH pour les différents mélanges miel gélose correspondant aux valeurs des CMI.....	49
III.7. Valeurs des concentration minimales inhibitrices vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	50
III.7.1. Analyses des corrélations entre les paramètres physico-chimiques des miels et les CMI vis -a -vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
III.7.1.1. Corrélation entre les CMI et pH.....	53
III.7.1.2. Corrélation entre les CMI et HMF.....	53
III.7.1.3. Corrélation entre les CMI et l'indice de diastase.....	53
III.7.1.4. Corrélation entre les CMI et la teneur en eau.....	53
III.8. Valeurs des concentration minimales inhibitrices vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
III.8.1. Analyses des corrélations entre les paramètres physico-chimiques des miels et les CMI vis -a -vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
III.8.1.1. Corrélation entre les CMI et pH.....	57
III.8.1.2. Corrélation entre les CMI et HMF.....	57
III.8.1.3. Corrélation entre les CMI et La teneur en l'eau.....	57
III.8.1.4. Corrélation entre les CMI et L'indice de diastase.....	57
III.9 Valeurs des concentrations minimales inhibitrices synergiques vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
III.9.1.Corrélation entre les CMIS et l'indice de diastase vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	58
III.10. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices synergiques vis-à-vis de de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	68
III.10.1.Corrélation entre les CMIS et l'indice de diastase vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	79
III.11. Test confirmatif à l'eau distillée.....	79
III.12. Test confirmatif à l'amidon.....	79
III.13. Calcul des concentrations inhibitrices synergiques avec une solution d'amidon à ,20%.....	79
III.14. Calcul des concentrations inhibitrices synergiques avec une solution d'amidon à 30%.....	79
III.15. Incubation des mélanges miel amidon pour des temps variables.....	79

<b>Chapitre IV</b>	<b>Discussion</b>	
IV.1. Paramètres physico-chimiques.....		81
IV.1.1. Recherche de falsification.....		81
IV.1.2. Teneur en eau.....		81
IV.1.3. pH.....		81
IV.1.4. HMF.....		82
IV.1.5. L'indice diastasique.....		83
IV.2. Concentrations minimales inhibitrices.....		83
IV.3. Concentrations minimales inhibitrices synergiques.....		86

**CONCLUSION**

**RECOMMANDATIONS**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES**

# Liste des abréviations

**Aw** : Activity of water.

**CIS** : Concentration inhibitrice synergique

**CMI**:Concentration minimale inhibitrice.

**CMIS**: Concentration minimale inhibitrice synergique.

**Ech**: Echantillon.

**FAO**: Food and Agricultural Organization

**HMF**: Hydroxymethyl-furfural

**ID**: Indice diastasique

**IS**: Inhibition synergique

**SAMR**: *Staphylococcus aureus Methicillino-résistant*

## Résumé

Les vertus curatives du miel sont universellement reconnues. Dans bons nombres de pays, il commence à être inclus dans la pharmacopée. Cependant dans le notre c'est un produit rare et, d'un prix prohibitif. L'activité antibactérienne du miel est due pour une grande part à son effet osmotique de par sa teneur hypertonique en sucres. Une éventuelle synergie entre le miel et l'amidon quant à l'effet antibactérien, pourrait en amortir le coût.

Le but de l'étude était d'évaluer l'effet synergique de cinq variétés de miels et d'une variété d'amidon (amidon de maïs)- sur deux bactéries pathogènes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*- et la corrélation avec l'indice de diastase. Les miels contiennent des amylases (diastases), ces amylases en hydrolysant l'amidon entraînent la formation de dextrans et de maltose et pourraient contribuer à l'augmentation de l'osmolarité du mélange. Si une corrélation existe entre le degré de synergie et l'indice de diastases, ce serait un critère d'évaluation des miels à utiliser.

Il a été trouvé un effet synergique antibactérien entre le miel et l'amidon. Cet effet varie selon les types de miels pour une même bactérie, et pour le même miel pour les deux espèces bactériennes. Les gains en miel en ce qui concerne *P.aeruginosa* ont été de 30,7% à 46,6%, et de 10% à 33,3% pour ce qui est de *S.aureus*. Ces gains ont donc été dans l'ensemble assez substantiels.

Aucune Corrélation n'a été établi avec l'indice de diastase. A la lumière des arguments avancés il semblerait que les amidons constitués de petites granules et riches en lipides offrent moins de prise à l'action des amylases, ce qui est le cas de l'amidon de maïs. Alors que les amidons dotés de granules de "grandes taille" et pauvre en lipides sont les mieux hydrolysables, le meilleur exemple en est l'amidon de pomme de terre. Ce sera le sujet de notre prochaine étude.

**Mots clés:** Miel, Amidon, Activité antibactérienne, Synergie, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

## Summary

The virtues of honey are universally recognized. In considerable countries, it starts to be included in the pharmacopoeia. However in our country, it is a rare product and, of a prohibitive price. The antibacterial activity of honey is due for a great part to its osmotic purpose from its hypertonic content of sugars. A possible synergy between honey and the starch as for the antibacterial effect, could amortize its cost.

The aim of the present study was to evaluate the synergic effect of five varieties of honeys and a variety of starch (corn starch) on two pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* and the correlation with the index of diastase.

Honeys contains amylases (diastases), by hydrolyzing the starch, these induce formation of maltose and dextrin and could contribute to the increase of the mixture osmolarity. If a correlation exists between the degree of synergy and the index of diastases, it would be a criterion of evaluation of honey to be used.

It was found an antibacterial synergistic effect between honey and starch. This effect varies according to honey type for the same bacterial species and the same honey for the two bacterial species. Honey profits regarding *P.aeruginosa* were 30,7% to 46,6% and 10% to 33,3% regarding *S.aureus*.

These profits were as a whole rather significant. However no correlation was established with the index of diastases. In the light of the advanced arguments, it seemed that the starches made up of small granules and rich in lipids offer less intake to amylases action, which is the case of corn starch. Whereas, starches having large-sized granules and poor in lipids are best hydrolysable, the best example is potato starch. This will be the subject of our next study.

**Keys words:** Honey, Starch, Antibacterial activity, Synergy, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

## ملخص:

إن الخصائص العلاجية للعسل معروفة على نطاق واسع، حيث أصبح العسل ضمن القائمة الصيدلانية (pharmacopée) في العديد من دول العالم، إلا أن هذه المادة نادرة و باهظة الثمن في بلادنا. إن الخصائص المضادة للبكتيريا في العسل نقود بالدرجة الأولى إلى قدرته الارتشاحية (osmolarité) و ذلك لكونه جد غني بالسكريات .

من جهة أخرى يعتبر التوافق (synergie) الحاصل بين العسل ومادة النشاء كمضادات للبكتيريا عاملا هاما للتقليل من تكلفة مادة العسل.

هدف هذه الدراسة هو التقدير مدى التوافق الموجود بين خمسة أنواع من العسل و نوعية واحدة من النشاء (نشاء الدرّة) تجاه صنفين من البكتيريا الضارة: *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* و قيمة الترابط (corrélation) مع عامل الدياستاز.

تحتوي كافة أنواع العسل على أنزيمات الأميلاز ، تحلل هذه الأخيرة النشاء (حلمة) منتجة بذلك الدكستريانات و المالموز مما يؤدي الارتفاع قدرة تراشح (osmolarité) الخليط إن وجود ترابط بين درجة التوافق (عسل ، نشاء) تجاه قيمة الدياستاز يعتبر عامل تقييم لنوعية العسل المراد استعماله .

لقد تم التأكد من وجود التوافق في الخصائص المضادة للبكتيريا بين العسل ومادة النشاء ، وتختلف نسبة التوافق بحسب نوعية العسل تجاه صنف واحد من البكتيريا . كما لوحظ هذا التباين في التوافق في النوع الواحد من العسل تجاه صنفين مختلفين من البكتيريا .

لقد تم بموجب عملية التوافق هذه توفير ما بين 30.7% إلى 46.6% من كمية العسل المستعمل في ما يخص صنف بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* ، في حين كانت النسب الموفرة 10 إلى 33.3% بالنسبة لصنف بكتيريا *Staphylococcus aureus* وفقا لهذا، نعتبر أن الكميات المقترضة إجمالاً من العسل جد مهمة.

من جهة أخرى ، لم نجد ترابط مع قيمة الدياستاز وعلى ضوء ما تقدم من دلالات ، تبين أن المادة التشوييه المتكونة من حبيبات دقيقة و غنية بالدهنيات كنشاء الدرّي ، لا تساعد كثيراً في عمل إنزيمات الاميلاز .

في حين تبدي النشويات ذات الحبيبات الكبيرة الحجم وقليلة الدهون كنشاء البطاطس أكثر قابلية للحلمة (mieux hydrolysables)

كلمات مفاتيح : عسل ، نشاء ، خصائص مضادة للبكتيريا ، توافق *Pseudomonas aeruginosa*,

*Staphylococcus aureus*,

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure n°1:</b> Les phases d'élaboration du miel.....	2
<b>Figure n° 2:</b> Détermination des CMI.....	38
<b>Figure n°3:</b> Détermination des CMIS.....	38
<b>Figure n° 4 :</b> tests confirmatifs à l'eau distillée.....	39
<b>Figure n°5:</b> test confirmatif à l'amidon.....	39
<b>Figure n°6:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
<b>Figure n°7:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
<b>Figure n°8:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	63
<b>Figure n°9:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	65
<b>Figure n°10:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	67
<b>Figure n°11:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	70
<b>Figure n°12:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
<b>Figure n°13:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	74
<b>Figure n°14:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	76
<b>Figure n°15:</b> Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	78

## LISTES DES PHOTOS

<b>Photo n° 1:</b> Résultat du test de falsification par rapport aux sucres.....	47
<b>Photo n° 2:</b> CMI du Miel de bouguirat vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
<b>Photo n°3:</b> CMI du Miel de Sidi Lazreg vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
<b>Photo n°4:</b> CMI du Miel de Oued Djemaa vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
<b>Photo n°5:</b> CMI du Miel de Laghouat vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
<b>Photo n°6:</b> CMI du Miel de Ain Oussera vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
<b>Photo n°7:</b> CMI du Miel de Bouguirat vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Photo n°8:</b> CMI du Miel de Sidi Lazreg vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Photo n°9:</b> CMI du Miel de Oued Djemaa vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Photo n°10:</b> CMI du Miel de Laghouat vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
<b>Photo n°11:</b> CMI du Ain oussera vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
<b>Photo n°12:</b> CMIS du Miel de bouguirat vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
<b>Photo n°13:</b> CMIS du Miel de Sidi Lazreg vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
<b>Photo n°14:</b> CMIS du Miel de Oued djemaa vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	63
<b>Photo n°15:</b> CMIS du Miel de Laghouat vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	65
<b>Photo n°16:</b> CMIS du Miel de Ain oussera vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	67
<b>Photo n°17:</b> CMIS du Miel de Bouguirat vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	70
<b>Photo n°18:</b> CMIS du Miel de Sidi Lazreg vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	72
<b>Photo n°19:</b> CMIS du Miel de Oued Djemaa vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	74
<b>Photo n°20:</b> CMIS du Miel de Laghouat vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	76
<b>Photo n°21:</b> CMIS du Miel de Ain oussera vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	78

## Chapitre I

### I.I. Le miel

#### I.I.1. Définition

-«Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur elles par des insectes suceurs qu'elles butinent, transforment en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche.

A l'exception du miel filtré, aucun pollen ou constituant propre au miel ne doit être retiré, sauf si cela est inévitable lors de l'élimination de matières organiques et inorganiques étrangères (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

#### I.I.2. Elaboration du miel

L'élaboration du miel commence dans le jabot des abeilles butineuses. Sitôt prélevée, la matière première est mélangée aux sécrétions des glandes salivaires de l'insecte, qui la modifie. Ce miel brut est ensuite travaillé et stocké par de jeunes ouvrières. L'élaboration du miel comporte les phases suivantes: l'abeille dégorge tout d'abord rapidement, par saccades, le contenu de son jabot et l'étale en une goutte à l'aide de sa trompe puis le réabsorbe. La goutte de miel sera alors mélangée à de nouvelles sécrétions, provenant principalement des glandes du pharynx. Ce processus durera de 15 à 20 minutes.

Parallèlement, une partie de l'eau s'évapore, de sorte que le miel brut, qui contenait 25 à 40 g de matière sèche, deviendra du miel à demi mûri contenant 60 % de matière sèche. A ce stade, il est à nouveau déposé dans les alvéoles où se déroulera la deuxième phase de l'élaboration: sous l'influence de l'air sec passant au travers des rayons de la ruche, le miel s'épaissira jusqu'à ce que sa teneur en eau ne soit plus que de 17 à 20%. Lorsqu'il est ainsi parvenu à maturité, les abeilles ferment les alvéoles au moyen de la cire. Quand le miel est extrait des rayons, il contient en général plus de 20 g d'eau/100 g de miel et ne peut être conservé que dans certaines conditions (miel non mûr). Lors de la préparation du miel, les teneurs en protéines (enzymes), en acides organiques et en sels minéraux augmentent. Pendant le processus de maturation de même que plus tard dans les alvéoles operculées, le miel subit des transformations

chimiques importantes, en particulier une augmentation des hexoses (fructose et glucose) suite à l'hydrolyse du saccharose en même temps que la formation de nouveaux types de sucre (oligosaccharides), à haut poids moléculaire (BOGDANOV, 1995).

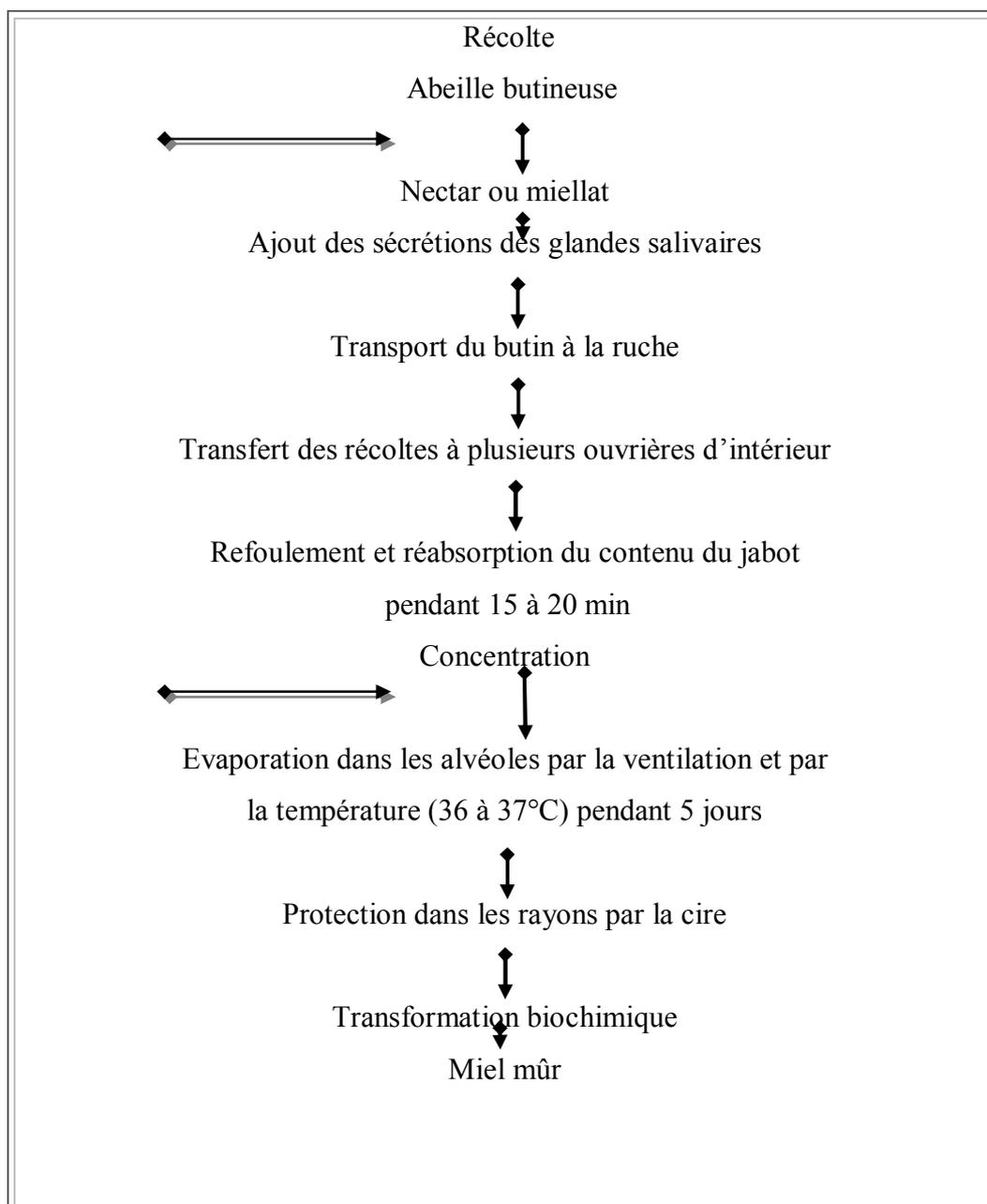


Figure n°1: Les phases d'élaboration du miel (GONNET, 1982)

### **I.I.3. Les différents types de miel**

Les différents types de miels sont définis par leurs caractéristiques sensorielles: la couleur, l'arôme, la saveur, la viscosité et la tendance plus ou moins marquée à cristalliser au cours du processus de conditionnement et de l'entreposage. Les miels diffèrent également entre eux du point de vue de leur composition chimique: acidité, contenu d'hydrates de carbone, rapport quantitatif entre les différents sucres, teneur en acides organiques, en minéraux et en composés azotés (RAMIREZ CERVANTES, 2000). En général on classe les miels selon:

#### **I.I.3.1. L'origine botanique**

Selon leur origine botanique les miels sont séparés en deux catégories distinctes :

##### **I.I.3.1.1 Miels issus de nectar :**

Le nectar est un liquide sucré produit par les nectaires des fleurs (MARCHENAY, 1984). Sa teneur en sucres varie entre 5% et 80%, les abeilles ne récoltent pas celui qui contient moins de 14% de sucres (PHILIPPE? 1999).

##### **I.I.3.1.1.1 Miels monofloraux :** Appelés également miels crus.

Du point de vue théorique, un miel unifloral est un miel naturel produit par les abeilles, provenant principalement d'une seule espèce florale déterminée, tel que le miel de Callune, le miel d'Acacia, le miel d'Eucalyptus et le miel d'Oranger. Ces miels contiennent certains principes de la plante ayant fourni le nectar, qui selon leur origine botanique possède des propriétés thérapeutiques naturelles diverses (GOUT, 1998). Dans la nature, de tels miels peuvent être considérés comme exceptionnels, puisqu'il est impossible d'obtenir un miel monofloral à 100%, car l'abeille garde toujours sa liberté de butiner où bon lui semble (GOUT, 1998). Il faut savoir que pour fabriquer 1kg de miel, les abeilles doivent butiner des millions de fleurs afin de recueillir suffisamment de nectar, ce qui est toutefois impossible pour les miels monofloraux (BIRI, 1986).

Certains pays européens ont établi des limites pour les miels unifloraux, mais ces limites peuvent varier d'un pays à un autre (BOGDANOV et al. 2004). La quantité relative des deux monosaccharides fructose et glucose est utile pour la classification des miels monofloraux, en plus des ratios fructose-glucose et glucose-eau [(TALPAY, 1985), (SABATINI et al. 1989)].

#### **I.I.3.1.1.2. Miels multif floraux**

Appelés parfois miels toutes fleurs, ce sont des miels récoltés à partir de plusieurs espèces florales, qui proviennent de mélange sans prédominance et donc sans origine florale précise (CHAUVIN, 1968).

#### **I.I.3.1.2. Miels issus de miellat**

Le miellat provient d'une substance rejetée par les insectes piqueurs et suceurs tels les pucerons, qui sucent la sève des plantes (MARCHENAY, 1984). Il est aussi émis à travers les orifices stomatiques des feuilles lorsque l'été est très sec (BIRI, 1986).

Le miellat tire son nom de la présence de mélézitose. Le mélézitose est un polyglucose contenu dans le miellat. Il sert à mesurer la présence de miellat dans le miel, si sa teneur est supérieure à 0,5g/100g, on peut admettre que le miel contient du miellat (BOGDANOV, 2005). Les miels de miellat sont des miels d'origine forestière, récoltés en été. Leur couleur va du bleu clair ou brun verdâtre à une teinte presque noire (CAILLAS, 1974).

#### **I.I.3.2. l'origine géographique :**

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

#### **I.I.4. Composition du miel**

C'est un produit qui n'est pas stable et ne peut donner lieu à aucune constante parfaitement précise. Il évolue d'une façon continue au cours du temps [(GOUT, 1998) (HUCHET et al. 1996)]. Cette composition varie d'une variété à l'autre, elle est influencée par de nombreux facteurs : La nature du sol et du végétal, les conditions pratiques, le moment et le mode de la récolte, le mode d'extraction et de conservation, la race d'abeille, l'état physiologique de la colonie et surtout le type de nourrissage,

mais les principaux composants sont les mêmes dans tous les miels (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996).

#### **I.I.4.1. Les hydrates de carbone**

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel, mais c'est aussi la plus difficile à analyser (HUCHET et al. 1996). La plupart de ces sucres ne sont pas trouvés dans le nectar mais ils sont formés durant la maturation et le stockage du miel par l'abeille (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996). D'après LOUVEAUX (1985), les deux sucres les plus abondants du miel sont le glucose (ou dextrose) et le fructose (ou lévulose), la teneur moyenne en fructose des miels est de 38% environ, elle est de 31% pour le glucose. Les chiffres des rapports fructose/glucose et glucose/eau sont spécifiques à chaque variété de miel et une teneur basse, si possible inférieure à 18% ou même à 17%, garantit la bonne conservation du miel (BOGDANOV et al. 2005). Si l'on se base sur les chiffres publiés (BOGDANOV et al. 1999), on peut proposer une valeur pour la somme des teneurs en fructose et glucose d'au moins 60 g/100 g pour tous les miels de nectar et de 45 g/100 g pour tous les miels de miellat. Pour ce qui est du saccharose, la situation est plus compliquée. Dans ce cas, la norme générale de 5 g/100 g serait remplie par plus de 99% des miels analysés à l'exception de quelques miels monofloraux (COMMISSION INTERNATIONALE DU MIEL, 2001).

Les conditions de stockage peuvent influencer la composition finale, avec augmentation du pourcentage des disaccharides au cours du temps (WHITE et al. 1960).

#### **I.I.4.2.L'eau:**

La teneur en eau est l'une des caractéristiques les plus importantes des miels. Elle conditionne la conservation du produit, son poids spécifique et, dans une certaine mesure sa cristallisation, sa saveur; en un mot sa qualité (LOUVEAUX, 1968). Mais La teneur en eau ne constitue pas une caractéristique typique de la variété de miel. Elle dépend d'autres facteurs, tel que le type de ruche et l'humidité de l'air. Cette teneur se situe la plupart du temps entre 15-20g/100g de miel (BOGDANOV, 1995). Seuls les miels dont la teneur en eau est inférieure à 18% sont de bonne conservation (GONNET, 1982). Les miels avec une teneur en eau de 15 à 18% ont une bonne cristallisation, ceux dont la teneur est inférieure ou supérieure se cristallisent plus

lentement. Les valeurs  $a_w$  du miel varient entre 0,55 et 0,75. Les miels dont l' $a_w$  est < 0,60 peuvent être, du point de vue microbiologique, qualifiés de stables. Bien que l'activité de l'eau soit un facteur de qualité important, on ne la détermine que rarement (BOGDANOV et al. 1987). Certains aspects de l'eau contenue dans le miel restent un mystère puisque Helvey cité par HUCHET (1996) a montré que la proportion en deutérium de l'eau du miel est sensiblement plus élevée que celle de l'eau ordinaire. On ne sait pas d'où provient cet enrichissement en deutérium. Selon ZURCHER et al. Cités par BOGDANOV (1995), la méthode du réfractomètre s'est imposée pour déterminer la teneur en eau. Toutefois c'est la méthode selon Karl Fischer qui livre les valeurs de teneur en eau les plus exactes. On obtient des valeurs plus basse avec le réfractomètre.

#### **I.I.4.3. Acides aminés et protéines :**

Les substances azotées ne représentent qu'une infime partie du miel il s'agit d'acides aminés libres et de protéines qui peuvent être présentes dans le nectar, provenir des sécrétions de l'abeille et enfin appartenir aux grains de pollen; qui sont des constituants normaux du miel (LOUVEAUX, 1985). Les protides du miel sont des colloïdes, des protéines et des acides aminés libres, d'origine animale et végétale (GONNET, 1982). les colloïdes sont constitués pour plus de moitié par des protéines et ils contiennent également des résines (CHAUVIN, 1968).

Les protides sont présents en faible quantité (1,7g/kg de miel), soit une teneur de 0,26%, la teneur en azote étant négligeable, de l'ordre de 0,041% (HUCHET et al. 1996).

Le miel contient de nombreux acides aminés avec des concentrations de plus de 200 ppm (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996). Une partie de ces acides aminés provient des abeilles et l'autre du nectar. Parmi ces acides aminés la proline est considérée comme le principal acide aminé (BOGDANOV et al. 2004). Selon VON DER OHE et al (1991), la proline est un critère d'appréciation de la maturation du miel .Un miel pur, non falsifié, enregistre une valeur minimale de proline de 180 mg/kg. Des valeurs plus basses indiquent une falsification au moyen d'un nourrissage au sucre ou un ajout de sucre dans le miel. Les valeurs les plus hautes pour la proline sont typiques pour les miels de miellat (MEDA et al. 2005). De telles matières se trouvent dans les miels de fleurs à environ 0,3g/100g de miel et dans les miels de miellat 1g/100g et plus. Jusqu'à aujourd'hui elles ne sont d'aucune utilité

pour l'appréciation des miels, à l'exception des activités enzymatiques (BOGDANOV et al.1981).

#### **I.I.4.4 .Les enzymes :**

Les miels contiennent des enzymes. Celles de l'abeille naturellement. Elles ont permis la transformation des nectars en miels. Les miels de miellats contiennent également les enzymes des aphidiens qui ont rejetés ces miellats (PAUL SCHWEITZER, 2004). Ces enzymes sont les constituants les plus importants du miel. Elles sont responsables de la conversion du nectar et du miellat en miel, par conséquent l'activité des enzymes participe dans la valeur biologique du miel (VORLOVA et ELECHOVSKA, 2002).

Elles sont sensibles à un apport d'énergie (une températures trop élevées ou l'influence de la lumière), elles se décomposent au fur et à mesure que se forme l'Hydroxyméthylfurfural (HMF). Dans bon nombre de pays, la spécification des enzymes est actuellement un indicateur légal obligatoire pour déterminer les détériorations dues au stockage et à la chaleur ((BOGDANOV et al. 1987).

La majorité des enzymes trouvées dans le miel proviennent de la sécrétion des glandes hypopharyngiennes de l'ouvrière tels que: Invertase, Glucose-oxydase et Amylases. Les enzymes d'origine florale sont les catalases, les phosphatases et les amylases en faible proportion (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996).

##### **I.I.4.4.1. Diastases et invertases:**

Les activités de l'invertase et de l'amylase varient fortement d'un miel à l'autre et ne sont fiables que dans une mesure limitée pour déterminer les détériorations dues au stockage et à la chaleur. La saccharase est nettement plus sensible au stockage et à la chaleur que l'amylase (WHITE et al. 1964). Le miel de miellat contient une haute activité de diastase et d'invertase que le miel de fleurs (VORLOVA et ELECHOVSKA, 2002).

-Diastases: Les miels contiennent une haute quantité de diastases entre 17,1 et 27,9 mg/kg (MEDA et al. 2005) .Lors de l'interprétation des résultats de l'activité diastasique, il faut tenir compte du fait que certains miels monofloraux ont une activité diastasique naturellement basse (JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES, 2002).

YILMAZ et KUFREVIOGLU (2001) trouvent que le stockage a une influence marquante sur l'augmentation de la teneur en HMF et la diminution de l'indice

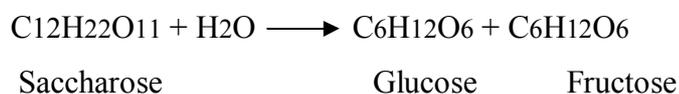
diastasique (ID) sur les miels collectés. Mais RAMIREZ et al (2000) après études des effets de la température sur deux types de miels, constatent que la durée du chauffage n'a eu, chez aucun des deux types de miel, d'effet significatif sur la dynamique de la baisse de l'activité enzymatique au cours de l'entreposage et, concluent que le type de miel influence fortement la baisse de l'ID au cours de l'entreposage, ce qui peut être interprété comme étant la conséquence des différences de composition chimique qui existent entre les deux miels.

VORLOVA et ELECHOVSKA (2002) après une étude réalisée sur trente variétés de miels trouvent une certaine corrélation significative entre la valeur de l'indice diastasique et la teneur en cuivre, et de même entre la valeur de l'activité de l'invertase et le contenu en cuivre. Cependant elles ne trouvent aucune corrélation significative entre l'activité des deux enzymes et la teneur en HMF.

Les amylases sont responsables du dédoublement de l'amidon en dextrine et en maltose (AUDIGIE, 1980).

Les miels naturellement pauvres en enzymes peuvent avoir une activité diastasique aussi basse que 3 mais à la stricte condition que leur HMF ne dépasse pas 15 mg / Kg. On cite le plus souvent les citrus, parfois les robiniers et les faux acacia. Ce sont souvent les plus beaux miels. Ils sont le résultat d'une très forte miellée avec production de nectars très concentrés. Les abeilles les " travaillent " donc peu, d'où peu d'enzymes, d'où une faible activité diastasique (PAUL SCHWEITZER, 2004).

-Invertases: Les invertases (gluco-invertases et fructo-invertases) convertissent le sucrose (saccharose) en fructose et en glucose (MIRAGLIO et al. 2003). Le saccharose devient un mélange de glucose et de fructose sous l'action de l'invertase, incorporée au nectar par la salive des abeilles. Ceux ci représente 90% des sucres totaux du miel. La transformation ou inversion s'exprime par l'équation suivante :



La valeur de départ de l'invertase dépend de l'origine du miel et peut varier dans de très larges limites. La dégradation de l'invertase est très rapide et démarre déjà à 35°C, température qui est atteinte couramment pendant l'été dans bon nombre de pays l'invertase permet d'identifier l'exposition à des températures modérées (KARABOURNIOTI et ZERVALAKI, 2001). Au cours de cette même étude et, après comparaison de l'effet du chauffage sur cinq types de miels (pin, oranger, cotonnier, thym, tournesol) ils constatent que le miel d'oranger bien qu'ayant eu la valeur de

départ la plus faible en invertase, il s'est avéré par ailleurs le plus résistant à la dégradation thermique de l'enzyme, comparé aux autres miels à invertase initiale plus élevée.

De plus, il est très difficile d'établir des limites générales pour le niveau de l'enzyme (invertase) car "toute limite peut s'avérer trop stricte pour certains miels et tout à la fois beaucoup trop permissive pour d'autres" (ODDO et al. 1999),

BOGDANOV (1997) trouve une corrélation fortement significative entre les diastases, l'activité des invertases et l'inhibition bactérienne.

#### **I.I.4.4.2. La glucose oxydase:**

Une partie de l'action des inhibines est à mettre sur le compte du peroxyde d'hydrogène (WHITE et al. 1963), qui se forme à partir de la glucose oxydase. Cette inhibine est à la fois photo et thermosensible (MOLAN, 1992). La glucose oxydase est d'un intérêt considérable, car son activité entraîne la production du peroxyde d'hydrogène qui non seulement stabilise le nectar en maturation mais possède également une action microbicide (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996). La glucose oxydase agit plus efficacement quand le miel est dilué. Quand le miel est non dilué, l'acide gluconique produit abaisse le pH en un point où il inhibe plus l'activité enzymatique, d'où moins de production de peroxyde. Une chaleur excessive (>50°C) peut également réduire l'activité de la glucose oxydase (WHITE et SUBERS, 1964).

#### **I.I.4.4.3 La catalase:**

La catalase représente l'antagoniste de la glucose oxydase. Cette enzyme présente également dans de nombreux miels réduit l'eau oxygénée (BOGDANOV et BLUMER, 2001). La quantité de catalase nécessaire pour détruire l'activité antibactérienne a été trouvée étonnamment élevée (WHITE et al. 1963)

#### **I.I.4.5. Les lipides :**

Ils sont pratiquement inexistant dans le miel, on a identifié cependant des glycérides et des acides gras tel que l'acide palmitique, oléique et linoléique (GONNET, 1982).

La fraction lipidique du miel est très faible et, n'a guère fait l'objet de recherches. Il est probable que l'extrait éthéré contient surtout de la cire provenant de l'extraction (LOUVEAUX, 1985).

#### **I.I.4.6. Les minéraux et les oligoéléments :**

Les matières minérales ou cendres ont une teneur inférieure à 1% (elle est en général de l'ordre de 0,1%). On y trouve, dans l'ordre d'importance, du potassium, du calcium, du sodium, du magnésium, du cuivre, du manganèse, du chlore, du phosphore, du soufre et du silicium ainsi que plus de trente oligo-éléments.

Leur teneur dépend des plantes visitées par les abeilles ainsi que du type de sol sur lequel elles poussent (HUCHET et al 1996). Le miel de colza arrive en tête pour le calcium, le miel de sapin pour le phosphore, le miel de forêt pour le magnésium et le miel de callune pour le soufre et le fer (GOUT, 1998).

Les miels de fleurs contiennent 0,1g à 0,35g de sels minéraux et d'oligo-éléments pour 100g de miel tandis que les miels de miellat contiennent jusqu'à 1g ou plus pour 100g de miel (BOGDANOV et al. 2004).

Il existe une corrélation très considérable entre le pH et le contenu cendré (MEDA et al. 2005). Certains oligo-éléments comme le plomb, le cadmium, le mercure, le fer, le zinc, l'aluminium, etc.. peuvent parvenir dans le miel à partir de matériaux d'emballage inappropriés, d'outils apicoles de même que directement de l'environnement. Les teneurs élevées en fer et en zinc, responsables du goût de métal du miel, proviennent principalement de récipients à miel inappropriés (BOGDANOV, 1995).

#### **I.I.4.7 Les acides**

Le miel contient un grand nombre d'acides organiques. La plupart d'entre eux sont ajoutés par les abeilles (ECHIGO et al. 1974)).

Qualitativement, on a décelé dans le miel d'autres acides fixes qui sont sans doute d'origine végétale tels que : l'acide succinique, l'acide citrique, l'acide malique et l'acide oxalique. Cependant, le miel contient peu d'acides volatiles. L'acide formique est longtemps considéré dominant, il représente 10% des acides totaux (GONNET, 1982)

L'acide principal est l'acide gluconique résultant de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase dans les miels dilués, selon la réaction suivante:



L'origine de l'acide gluconique serait également due à une bactérie appelée gluconobacter, qui, lors de la maturation du miel, transformerait le glucose en acide gluconique (HUCHET et al. 1996).

Bien que le miel en contienne moins de 1% (miel de forêt < 2%), les acides jouent néanmoins un rôle déterminant dans la formation de son goût. Les miels de fleurs ont certes moins d'acides que les miels de forêt, leur pH est toutefois plus bas, le miel de forêt étant, semble-t-il, mieux tamponné (BOGDANOV et al. 2006)

Cependant, le miel contient peu d'acides volatiles. L'acide formique est longtemps considéré dominant, il représente 10% des acides totaux (GONNET, 1982).

La quantité limitée admise pour les acides s'élève à 40 meq/Kg de miel, elle varie selon l'origine du miel (BOGDANOV et al. 1995).

#### **II.4.8. Substances aromatiques:**

On a caractérisé environ 500 substances aromatiques différentes dans le miel. Bien que ces dernières ne soient présentes qu'à l'état de traces, elles n'en jouent pas moins un rôle prépondérant dans la formation du goût du miel (BOGDANOV et al. 2006). Elles jouent un rôle important dans l'appréciation sensorielle du miel. Les substances aromatiques se conservent le mieux si le miel est stocké au froid dans des récipients fermés. Si l'on chauffe le miel, une part de ces substances est anéantie (BOUSSETA et al. 1992).

#### **II.4.9. les vitamines:**

Le miel est un aliment pauvre en vitamines, puisqu'il présente des teneurs qui sont loin de couvrir les besoins de l'homme (DONADIEU, 1978).. Il s'agit essentiellement de vitamines B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9) qui seraient apportées par le pollen (HUCHET et al. 1996). Sa teneur en vitamine dépend de sa teneur en pollen (LOIRICHE, 1979).

**Tableau n° 1 :** Quantité de vitamines dans le miel (LOIRICHE, 1979)

<b>Vitamines</b>	<b>Quantité mg</b>
<b>B2 (riboflavine)</b>	<b>1,5</b>
<b>B1 (aneurine)</b>	<b>0,1</b>
<b>B3 (acide pantothénique)</b>	<b>2</b>
<b>B5 (acide nicotinique)</b>	<b>1</b>
<b>B6 (pyridoxine)</b>	<b>5</b>
<b>C (acide ascorbique)</b>	<b>30 à 54</b>

**II.4.10 L'hydroxyméthyl- furfural (HMF):**

Cet important facteur relatif à la qualité du miel est un indicateur pour la fraîcheur et le surchauffage. Le miel brut ne contient pratiquement pas d'HMF ; cependant sa teneur augmente au cours du stockage en fonction du pH du miel et de la température de stockage (BOGDANOV, 1995). Il provient d'une dégradation lente du fructose, lequel en milieu acide se décompose et perd trois molécules d'eau (GONNET, 1982); et que c'est probablement un processus auto catalytique (GHOHDASTIDAR et CHAKRABARTI, 1992).

Le taux de HMF peut " fournir toutes les informations nécessaires concernant l'exposition à la chaleur de n'importe quel miel" (WHITE, 1994) ,mais DUSTMANN (1993) a affirmé que "le HMF ne convient nullement à la mise en évidence des dommages dus à la chaleur, s'il est pris comme critère unique d'évaluation". RAMIREZ et al (2000) après une étude sur deux types de miels ont montré que du point de vue quantitatif, la hausse du taux de HMF durant l'entreposage à été considérablement plus importante sur l'un que sur l'autre et concluent que la dynamique de la croissance de ce taux durant l'entreposage devrait être déterminée pour chaque type de miel séparément.

Dans certains miels la hausse du taux de HMF est lente, ce qui rend difficile le dépistage d'un éventuel surchauffage, l'exposition à des températures pas très élevées entre 40 et 50°C par exemple est plutôt difficile à détecter (KARABOURNIORTI et ZERVALAKI, 2001). Les mêmes auteurs arrivèrent à la conclusion que la meilleure solution semble être l'association des deux critères analytiques que sont le HMF et l'invertase compte tenu du fait que l'invertase permet d'identifier l'exposition à des températures modérées et que le HMF fournit des informations sur l'éventuel surchauffage du produit.

**II.5. Substances toxiques présentes naturellement dans le miel:**

Le nectar de certaines plantes comme les *Ericaceae* (telles que certaines espèces de rhododendrons dans le Caucase et en Turquie) et plus rarement d'autres espèces de plantes comme les *Solanaceae*, *Compositae*, *Lagonaceae*, *Ranunculaceae* contient des substances qui sont toxiques pour l'homme. La consommation de miels de ces miellées peut donc porter préjudice à la santé (BOGDANOV, 2006).

Les empoisonnements dus à des miels toxiques sont en particulier provoqués par la consommation de miels qui contiennent des substances du groupe des andromédotoxines, des tutines et des hyénanchines (WHITE, 1981).

**Tableau n° 2 :** Principaux composants du miel en pourcentage (%)  
(WHITE et al. 1962).

<b>Composants</b>		<b>Moyenne (%)</b>
<b>Eau:</b>		<b>17,2</b>
<b>Sucres:</b>	Lévilose (d-fructose): 38,19	
	Dextrose (d-glucose): 31,28	
	Sucre (saccharose): 1,31	
	Maltose et autres disaccharides réducteurs: 7,31	
	Sucres supérieurs: 1,50	<b>79,59</b>
	Sucres totaux: 79,59	
<b>Acides:</b>	(Gluconique, citrique, malique, succinique, formique, etc.), acides totaux calculés en acide glutamique:	<b>0,57</b>
<b>Protéines:</b>	(Acides aminés: alanine, arginine, glycine, leucine, isoleucine, acide aspartique, valine, histidine et lysine):	<b>0,26</b>
<b>Cendres:</b>	(Minéraux: potassium, sodium, magnésium, calcium, phosphore, fer, manganèse, cuivre, etc.):	<b>0,17</b>
<b>Composants mineurs:</b>	Comprenant principalement des pigments, des substances aromatiques, des alcools de sucre, des tanins, des enzymes et diastases dont l'amylase, la glucose oxydase, la peroxydase, la succindeshydrogénase, la phosphatase et les invertases. Des vitamines dont la thiamine, la riboflavine, l'acide nicotinique, la vitamine K, l'acide folique, la biotine, la pyridoxine et l'acide pantothénique:	<b>2,21</b>

### **I.I.6. Les micro-organismes:**

On trouve dans le miel beaucoup moins de bactéries que dans d'autres produits crus de provenance animale (TYSSET et al. 1981). On note dans quelques publications la présence de *Clostridium botulinum* dans le miel (AMON et al. 1979). Les études menées en Europe ne confirment pas ces résultats (HARTGEN, 1980) cité par BOGDANOV (1995), à l'exception d'un miel italien (CRISEO et al.1993)) cités par le même auteur. Certes, les toxines ne peuvent pas se former, étant donné que la forte activité de l'eau empêche la germination et la croissance; les spores par contre peuvent survivre. (WELFORD et al. 1978)).

Le miel contient différentes levures osmotolérantes, responsables de la fermentation (TYSSET et al. 1981).

### **I.I.7. Activité antimicrobienne du miel**

#### **I.I.7.1. Généralités**

Depuis Van Ketel qui pour la première fois en 1892 avait fait état de l'activité antibactérienne du miel ; les différents aspects des propriétés antibactériennes du miel ont été abondamment étudiés. Mais les raisons de l'activité antibactérienne du miel sont controversées (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996).

ALLEN (cité par NZEAKO et HAMDI, 2000) a montré qu'il existe différents types de miels avec ou sans activité antibactérienne, et a émis l'hypothèse que l'activité antibactérienne du miel dépend du type de fleur, source de nectar. Ainsi donc les fleurs à partir desquelles les abeilles butinent le nectar contribuent à la différence de l'activité antibactérienne des miel (BOGDANOV, 1984). Cependant selon (BADAWY et al. 2004), Il est évident que l'activité antibactérienne du miel décroît avec le temps et que, les différentes espèces de bactéries diffèrent dans leur sensibilité au miel. On ne connaît pas encore tous les composants antibactériens du miel et ses vertus curatives continuent de constituer une énigme pour les chercheurs (BOGDANOV et BLUMER 2001).

Beaucoup ont attribués l'action thérapeutique du miel juste à l'effet osmotique du à sa teneur en sucres [(SEYMOUR et WEST, 1951), (KEAST-BUTLER ,1980), (SOMERFIELD, 1991), (TOVEY, 1991), (CONDON, 1993)].

Selon BOGDANOV (1997) il existe deux sortes d'agents antibactériens appelés «inhibines». A noter que le concept « inhibines » a été introduit pour la première fois

en 1937 par DODD et ses collaborateurs pour qualifier les agents antimicrobiens (THEUNISSEN et al. 2001).

L'une d'elles est sensible à la lumière et à la chaleur, et trouve son origine dans le peroxyde d'hydrogène, produit par la glucose oxydase du miel (WHITE et al. 1963), (WHITE et SUBERS, 1964), (DUSTMANN, 1972). L'activité antibactérienne non peroxyde est insensible à la lumière et à la chaleur et reste intacte après stockage du miel pour de longues périodes [(GONNET et LAVIE 1960), BOGDANOV, 1984), (ROTH et al. 1986)].

Certains chercheurs croient que le peroxyde d'hydrogène est le principal agent antibactérien [(WHITE et al. 1963), (DUSTMANN, 1972), (MORSE, 1986)].

D'autres trouvent que l'activité autre que celle du peroxyde d'hydrogène est la plus importante (BOGDANOV, 1984), (ROTH et al. 1986).

Les arguments de ces derniers tiennent au fait que dans le miel mur la glucose oxydase est inactive et qu'il ne contient qu'une faible quantité de peroxyde d'hydrogène, non suffisante pour inhiber la croissance bactérienne. Il ajoute, cependant, que lorsque le miel est mangé ou dilué, le peroxyde peut être produit suffisamment pour une action antibactérienne(BOGDANOV, 1997).

Mais toujours est-il qu'aujourd'hui, ce qui est sur c'est que le miel freine la croissance de nombreux champignons et bactéries (BOGDANOV et BLUMER, 2001).

Déjà en 1992, MOLAN précisait que l'action antimicrobienne du miel avait été testée sur 64 espèces bactériennes et 13 fongiques. Les microorganismes qui survivent bien dans le miel sont les levures tolérantes aux sucres (osmophiles), appartenant principalement aux genres *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* (WHITE, 1975).

Des tests in vitro ont montré que *Mycobacterium ulcerans* est résistant au miel. Cela pourrait être du à la teneur élevée en lipides de sa membrane cellulaire, qui prévient aussi bien la déshydratation de la bactérie que, sa pénétration par les inhibines (WHITE et al. 1962). SKRYPNIK ET KHOROL'SKIL cités par MOLAN (1992) trouvaient que le miel avaient une action bactéricide sur *Mycobacterium tuberculosis*. WELFORD (cité par NZEACO et HAMDI, 2000) a trouvé que certaines espèces d'*Aspergillus* ne produisent pas d'aflatoxine à des dilutions variables de miel.

Ses composants antioxydants aident à éponger l'oxygène (FRANKEL et al. 1998)

Le miel peut être stérilisé par les rayons gamma sans perdre son activité antibactérienne (MOLAN et ALLEN, 1996)

La prolifération des lymphocytes B et des lymphocytes T dans une culture cellulaire est stimulée par le miel à des concentrations aussi basse que 0,1% ; et les phagocytes sont activés par le miel au mêmes concentrations (ABUHARFEIL ET AL, 1999).

-A des concentrations de 1% il stimule également les monocytes dans les cultures cellulaires à libérer les cytokines, le TNF-alpha, les intrleukines-1 (IL-1) qui activent la réponse immunitaire à l'infection (TONKS ET AL, 2001).

#### **I.I.7.2. Peroxyde d'hydrogène:**

Le fait que les propriétés antibactériennes du miel sont augmentées lorsqu'il est dilué ont été clairement observées et signalées en 1919 (BRANIKI, 1981).

L'explication de cet apparent paradoxe vient du fait que le miel contient une enzyme qui produit du peroxyde d'hydrogène lorsqu'elle est diluée (WHITE et al. 1963).

le miel a une activité bactéricide démontrée in vitro et in vivo dont le principe actif est l'inhibine identifié par WHITE en 1962 comme étant de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite sous l'action d'une enzyme sécrétée par l'abeille : la glucose oxydase du miel (DROGUET, 1983).

Elle est parfois trouvée dans le miel dilué est c'est le produit de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase (THEINISSEN et al. 2001).

L'acide gluconique et le peroxyde d'hydrogène résultant de cette réaction préservent et stérilisent le miel (miel non mûr) pendant le processus de maturation (MOLAN, 1992). Dans le miel mur la glucose oxydase est inactive, il contient seulement une petite quantité de peroxyde d'hydrogène non suffisante à empêcher la croissance bactérienne (BOGDANOV, 1997). Le peroxyde d'hydrogène donne une protection contre les microorganismes pathogène par un mécanisme biochimique qui interrompe leurs métabolismes et dénature leurs protéines (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996). L'activité antibactérienne est principalement due au peroxyde d'hydrogène, produit continuellement quand le miel est dilué (ALLEN et MOLAN, 2000)

La catalase représente l'antagoniste de la glucose oxydase car elle réduit l'eau oxygénée. La concentration du peroxyde d'hydrogène dépend donc directement de ces deux enzymes (BOGDANOV et BLUMER, 2001). Mais malgré que la catalase soit active avec de hautes concentrations de peroxyde d'hydrogène, elle est d'activité basse avec les taux physiologiques. La quantité de catalase nécessaire pour détruire l'activité antibactérienne a été trouvé étonnement élevé (WHITE et al. 1963).

Récemment le peroxyde d'hydrogène a perdu sa faveur à cause de l'inflammation et du dommage qu'il provoque dans les tissus [(SALAHUDEEN et al. 1991); (SAISSY et al. 1995)]. La concentration du peroxyde d'hydrogène produite dans le miel lors de sa dilution est normalement autour de 1 mmol/l, soit environ 1000 fois moins que la solution de 3% généralement utilisée comme antiseptique (MOLAN, 1992).

Il a été signalé que le peroxyde d'hydrogène est plus efficace quand il est produit de façon permanente par la glucose oxydase que quand il est ajouté isolement (PRUIT, 1985). Une solution de peroxyde d'hydrogène utilisée comme antiseptique est probablement de beaucoup moins efficace qu'une libération lente à partir miel (COHEN et HOCHSTEIN, 1962)

Une étude faite avec *Escherichia coli* exposée à un flot constant de peroxyde d'hydrogène, a montré que la croissance bactérienne est inhibée par 0,02-0,05 mmol/l de peroxyde d'hydrogène, une concentration qui n'endommage pas les cellules fibroblastiques de la peau humaine (HYSLOP et al. 1995).

Pour un grand nombre de miels testés, la destruction de la capacité du peroxyde par l'utilisation de la catalase était associée à la perte de l'activité antibactérienne. Les miels originaires de manuka et de vipers buglos furent les seuls miels testés qui retinrent une activité antibactérienne significative (WILLIX et al. 1992).

### **I.I.7.3. Pression osmotique:**

Les principales substances du miel sont les sucres, lesquels par leur effet osmotique exercent une action antibactérienne (MOLAN, 1992).

L'osmolarité élevée a été considérée comme un précieux outil dans le traitement des infections, car elle prévient la croissance des bactéries et renforce la cicatrisation (ARCHER et al. 1990). Selon LAVIE (1968), l'activité bactériostatique et bactéricide du miel sur diverses bactéries est due à sa forte teneur en sucres, elle élimine l'odeur désagréable liée aux brûlures et aux ulcères principaux de la peau, car les bactéries qui causent l'infection emploient les sucres du miel de préférence aux acides aminés du sérum et des cellules mortes, à partir desquels des amines et les composés de soufre sont produits.

Mais quand il est appliqué sur les plaies, la dilution du fait de l'exsudation, réduit l'osmolarité à un niveau tel qu'elle cesse de maîtriser l'infection (HERSZAGE et al. 1980).

#### **I.I.7.4. pH et acidité**

Le pH bas du miel associé à l'effet osmotique de ses sucres furent considérés comme le principal facteur antibactérien (YATSUNAMI et ECHIGO, 1984). Mais si le miel est dilué, particulièrement par les fluides du corps le pH ne sera pas ainsi un inhibiteur efficace de beaucoup d'espèces microbiennes (MOLAN, 1996). Cependant certains miels ont un pH nettement plus élevé, entre 5 et 6 (ex: miel de châtaignier, miel de miellat, mais ceux-ci possèdent néanmoins un effet antibactérien (BOGDANOV et BLUMER, 2001). Les acides organiques libres jouent un rôle dans l'activité antimicrobienne du miel car ils sont très solubles dans les membranes de la cellule et induisent des altérations dans la perméabilité cellulaire et dans la phosphorylation oxydative (JEFFREY et ECHAZARETTA, 1996).

#### **I.I.7.5. Autres substances:**

Les substances antibactériennes non peroxydes du miel sont surtout des lysozymes, des flavonoïdes, des acides aromatiques, des substances volatiles et autres composants indéterminés (BOGDANOV et BLUMER, 2001). Les flavonoïdes trouvés dans le miel ont un effet antibactérien efficace contre les bactéries et les champignons, ces flavonoïdes sont f.pinobanksin, f.chrysin, f.galangin, f.quercétine, f.lutéoline, f.kaempferol, et f.pinocembrin le seul présent en quantité élevée (MIRAGLIO et al. 2003). Une analyse systématique de la nature chimique des substances non peroxydes n'a pas encore été effectuée (BOGDANOV et BLUMER, 2001). Les composés phénoliques sont responsables de l'activité antioxydante du miel (MIRAGLIO, 2003)

#### **I.I.8. Altérations du miel**

##### **I.I.8.1. Effet de la température:**

Le traitement thermique du miel peut accélérer certaines réactions chimiques susceptibles d'altérer sa qualité au cours de l'entreposage (M.A.RAMIREZ et al. 2000). Quelques études ont montré que la température est le principal élément qui doit être contrôlé pour avoir un miel de bonne qualité WINKLER cité par RAMIREZ (2000). Mais le comportement des miels durant l'entreposage diffère selon le type de miel (.RAMIREZ et al. 2000). "Il est connu que la chaleur et la lumière altèrent la glucose oxydase et diminuent ainsi la production d'eau oxygénée" (BOGDANOV et BLUMER, 2001), et il ajoute que " la température au cours de l'entreposage a une

influence importante sur l'activité enzymatique qui diminue en fonction de la durée d'entreposage et, de la teneur en HMF qui elle, augmente.

**Tableau n° 3** Température de stockage et détérioration des enzymes du miel  
(WHITE et al. 1964)

Température de stockage, °C	Temps nécessaire à la formation de 40 mg d'HMF/Kg miel	Durée De demi-vie* diastase	Durée de demi-vie invertase
10	10 - 20 années	35 années	26 années
20	2 - 4 années	4 années	2 années
30	0,5 - 1 années	200 jours	83 jours
40	1 - 2 moins	31 jours	9,6 jours
50	5 - 10 jours	5,4 jours	1,3 jours
60	1 - 2 jours	1 jours	4,7 jours
70	6 - 20 heures	5,3 heures	47 minutes

\*-Durée de demi-vie: durée pour réduire de moitié l'activité enzymatique

**I.I.8.2. Effet de la lumière:** La lumière réduit les propriétés antibiotiques du miel, les indices de peroxyde du miel de fleurs en particulier sont fortement réduits lors du stockage à la lumière, ils ne diminuent que de moitié à l'obscurité. Les inhibines non peroxydes ne s'altèrent que légèrement en raison de la lumière et d'un long stockage (BOGDANOV et BLUMER, 2001).

**I.I.8.3. Effet de la fermentation :** Seuls les miels dont la teneur en eau est inférieure à 18% sont de bonne conservation (GONNET, 1982).BOGDANOV (1995) revoit ce chiffre légèrement à la hausse puisque selon lui la teneur en eau ne devrait pas dépasser 19g/100g de miel, étant donné que dans le cas contraire, il existe un risque de fermentation à la surface. Si l'on se réfère à STEPHEN (1946) cet écart d'une unité n'est pas à prendre à la légère, en effet, selon cet auteur la teneur en levures augmente de cinq fois dans le cas d'un accroissement de la teneur en eau de 1g/100g; en dessous d'une teneur de 17g/100g le risque de fermentation est très faible. Vu ses propriétés

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

### **I.I.9. Cristallisation du miel:**

Le miel consiste en une solution sucrée sursaturée. La cristallisation du miel est ainsi un processus naturel [(BOGDANOV, 1987); (HORN, 1991)]. Elle dépend des facteurs suivants:

**I.I.9.1. Teneur en sucres et en eau:** La vitesse de cristallisation dépend surtout de la teneur en glucose du miel [(WHITE, 1962), (BOGDANOV et al 1987)]. Les miels de fleurs avec plus de 28% de glucose cristallisent très rapidement; le miel de miellat avec une teneur en mélézitose de 10% se transforme en du miel dit miel ciment. Les miels dont la teneur en glucose est  $< 28\text{g}/100\text{g}$  ou dont le rapport glucose eau est  $< 1,7$  restent plus longtemps liquides [(HORN, 1991), (BOGDANOV et al, 1995)]. Les miels ayant une forte teneur en eau cristallisent souvent en deux phases. La phase supérieure est plus aqueuse et les levures peuvent se multiplier et provoquer la fermentation du miel (BOGDANOV, 1987).

**I.I.9.2. Température:** température optimale pour la cristallisation du miel se situe entre 10 et 18°C. Une température constante de 14°C est idéale. A basse température la cristallisation est lente avec formation de cristaux très fins, à température élevée (plus de 25°C), la cristallisation est également lente, mais le miel se fige sous la forme de cristaux grossiers (BOGDANOV, 1987).

## **I.II. Usages thérapeutiques du miel**

### **I.II.1. Cicatrisation des plaies**

Les pansements humides ou toute forme d'irrigation humidifient les tissus et donc retardent la cicatrisation. Les pansements secs adhèrent à la surface, causant de la douleur et des dommages au tissu de granulation, chaque fois qu'ils sont changés. Les pansements huileux empêchent les sécrétions de s'écouler librement et pouvant ainsi se répandre dans les surfaces de peau voisines en causant des réactions indésirables ou des effets toxiques. A l'inverse, le miel est un traitement de choix des plaies, car il est non irritant, non toxique, stérile, bactéricide, nutritif, aisément appliqué et plus confortable que les autres pansements (AMY et al. 1996). Aujourd'hui une quantité importante de publications scientifiques sur la capacité du miel dans la cicatrisation des plaies confirment sa valeur, comme agent antibactérien et cicatrisant (NATIONAL HONEY BOARD, 2002)

Les effets thérapeutiques observés lors de l'utilisation du miel comme pansement des plaies incluent une stimulation du processus cicatriciel avec cicatrisation rapide, assainissement des plaies infectées, stimulation de la régénération tissulaire, diminution de l'inflammation, il évite de même les défauts dus à l'adhésion des pansements, par formation d'une interface humide (MOLAN, 2001).

Le miel a été utilisé dans le traitement de divers types de plaies, comprenant les brûlures (EFEM, 1988) les ulcères veineux des jambes, les ulcères des jambes d'étiologies diverses, ulcères des pieds des diabétiques, sites de prélèvement de greffons non cicatrisés, abcès, furoncles, plaies opératoires (BETTS et MOLAN, 2001), processus nécrotique (EFEM, 1993), infection post opératoire des plaies néonatales (EFEM, 1988). Dans bon nombre de ces cas le miel a été utilisé avec succès pour la cicatrisation de plaies ne répondant pas aux traitements par les antibiotiques et les antiseptiques conventionnels [(HUTTON, 1966), (NDAYISABA et al. 1993), (WOOD et al. 1997), (DUNFORD et al. 2000)].

Bons nombres d'auteurs ont décrits la rapidité de cicatrisation lorsque le miel est utilisé comme pansement, DESCOTTES (1990) parle de cicatrisation de manière spectaculaire dans 90% des cas, parfois en seulement quelques jours. Selon BURLANDO (1978) la cicatrisation spécialement pour les brûlures du premier et du second degré est étonnement rapide. Le miel favorise la cicatrisation des ulcères et des brûlures mieux que tous autres applications locales utilisées auparavant (BLOMFIELD, 1973). Il a été noté que le pansement des plaies par le miel permet de

procéder aux greffes dans des délais bien plus courts, sur une plaie assainie, avec prise rapide de la greffe (PHUAPRADIT et SAROPALA, 1992). D'après SUBRAHMANYAM (1998), EFEM (1993), CAVANAGH (1970), le miel contribue à la régénération tissulaire à tel point que la reconstruction plastique est inutile. Le miel utilisé comme pansement ne cause aucune douleur (MCINERNEY RJF. 1990), n'est pas irritant (SUBRAHMANYAM, 1996), ne cause aucune réaction allergique ni d'effet nocif sur les tissus (HUAPRADIT et SAROPALA, 1992), il n'y a aucune adhésion qui risquerait de causer des dommages au tissu de granulation lors du changement de pansement (SUBRAHMANYAM, 1998).

Cent patients brûlés ont été divisés en deux groupes égaux et traités ou avec un pansement à base de miel, ou avec un pansement de gaze traitée avec la sulphadiazine argentée. Dans le groupe traité avec le miel, les lésions guérissaient plus rapidement (temps moyen, 15,4 jours contre 17,2 jours). Les niveaux des lipides peroxydes sériques étaient augmentés dans la période immédiatement après la brûlure dans tous les deux groupes. Pourtant, avant le jour 7 et le jour 14 après la brûlure, les Auteurs ont noté une réduction significative des valeurs malondialdéhydes, qui étaient plus significative dans le groupe traité avec le miel. Les cultures bactériennes ont révélé que dans 90% des cas les plaies étaient rendues stériles dans le groupe traité avec le miel tandis que dans le groupe traité avec la sulphadiazine argentée l'infection persistait. Le miel, à cause de son effet anti-oxydant, a contribué vraisemblablement à limiter la peroxydation lipide et a contribué aussi à la guérison rapide des lésions, sans parler des autres effets favorables (SUBRAHMANYAM et al. 2001).

Vingt cas de gangrène de fourmier ont été traités par des applications quotidiennes de miel sans recours à la chirurgie, et comparés avec 21 cas similaires traités par excision chirurgicale des tissus infectés et par des antibiotiques systémiques. Les résultats ont été similaires pour les deux traitements, mais avec une réponse plus rapide lors de l'utilisation du miel (1 semaine) (EFEM, 1993).

CAVANAGH et al (1970) ont décrits 12 cas où le miel a été utilisé comme pansement après une vulvectomie radicale (plaie reconnue notoirement comme difficile à garder saine de l'infection), cette plaie est devenue stérile après 3-6 jours, présentant une granulation saine, requérant un minimum d'excision des tissus morts et ne nécessitant pas de greffe de peau comme normalement requis. Le miel a été trouvé non irritant et beaucoup plus efficaces que les antibiotiques topiques, le délai d'hospitalisation a été réduit à 3-4 semaines au lieu des 7-8 semaines usuelles.

Le miel a été utilisé avec succès pour la cicatrisation de plaies abdominales faisant suite à une rupture consécutive à une césarienne, il a été appliqué en une fine couche sur la plaie et recouvert avec un pansement à micropores (PHUAPRADIT et SAROPALA, 1992); le fait que cet article a été publié dans "Australian NZ Journal of Obstetrics and Gynecology" mérite d'être cité.

**I.II.2. Propriétés cicatrisantes du miel et mécanismes d'action** (voir tableau n°4)

**I.II.3. Ulcère gastrique, gastrite et diarrhée:** L'usage du miel dans le traitement de l'ulcère gastrique et des gastrites provient du folklore traditionnel, il y est également fait état dans les temps modernes. La découverte du rôle de *Helicobacter pylori* comme agent causal de l'ulcère gastrique ont orienté les recherches vers l'activité antibactérienne du miel, il s'est avéré que *H.pylori* est sensible au miel (MOLAN, 2001). L'administration orale de miel à des rats chez lesquels un ulcère gastrique a été induit par administration d'indométacine a abouti à une accélération considérable de la cicatrisation (Ali, 1995).

Trois cuillerées à soupe de miel (30ml) données avant les repas trois fois par jour, ont été utilisées dans le traitement de patients males et femelles (20-40 ans) souffrant de gastrites, duodénites et ulcères duodénales, les deux tiers des patients ont guéri suite à ce traitement, avec augmentation du taux d'hémoglobine chez la majorité et diminution de la quantité de sang éliminée dans les selles (SALEM, 1982)

Un essai clinique dans lequel le miel a été utilisé à la place du glucose dans une solution de réhydratation (solution d'électrolytes), administrée à des nourrissons et à des enfants admis à l'hôpital pour gastroentérite; a montré statistiquement une réduction significative de la durée de la diarrhée due à des infections bactériennes, 58 heures au lieu de 93 heures (HAFFEJEE et MOOSA, 1985).

**Tableau n°4 : Propriétés cicatrisantes du miel et mécanismes d'action (NATIONAL HONEY BOARD, 2002)**

Propriétés	Résultats cliniques	Mode d'action présumé
Activité antimicrobienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Stérilisation des plaies</li> <li>*Inhibition des pathogènes potentiels des plaies et des enzymes qui détruisent les tissus.</li> <li>*Élimination des mauvaises odeurs des plaies infectées.</li> <li>*Barrière protectrice contre les contaminations croisées.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Production de peroxyde d'hydrogène</li> <li>*Action des composés phytochimiques.</li> <li>*Acidité</li> <li>*Stimulation de la multiplication des <math>\beta</math>-lymphocytes et des T-lymphocytes, de la libération des cytokines par les monocytes; source d'énergie et d'acidité pour les macrophages contribuant à leur action destructrice des bactéries</li> <li>*Métabolisme du glucose par les bactéries en acide lactique au lieu du métabolisme des acides aminés du sérum et des cellules mortes en ammoniac, amines et composés soufrés.</li> <li>*Viscosité élevée créant un effet barrière contre les contaminations par l'environnement</li> </ul>
Activité anti-inflammatoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Résolution des oedèmes et des exsudats</li> <li>*Réduction des cicatrices</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Osmolarité élevée provoquant un appel de liquide formant une interface humide empêchant ainsi les dommages dus à l'adhésion du pansement à la surface des plaies.</li> <li>*Diminution des leucocytes associés à l'inflammation.</li> <li>*Inhibition de la production de l'oxygène réactif intermédiaire (ORI) grâce à son activité antioxydante.</li> <li>*Suppression du processus inflammatoire. Par la captation des radicaux libres par les antioxydants.</li> </ul>
Stimulation d'une cicatrisation rapide	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Augmentation de la phagocytose.</li> <li>*Augmentation du débridement autolytique.</li> <li>*Augmentation de l'angiogénèse.</li> <li>*prolifération cellulaire</li> <li>*Synthèse de collagène.</li> <li>*Re-épithélialisation avec un recours minimum aux greffes de peau.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Effets stimulants des divers composants sur les macrophages</li> <li>*pansement humide</li> <li>*Apport de nutriments et d'oxygène aux tissus suite à l'extravasation de la lymphe.</li> <li>*Libération lente de peroxyde d'hydrogène et de substances antioxydantes modifiant certaines protéines, importantes pour la croissance cellulaire et le débridement.</li> </ul>

**III.4. Les troubles cardiovasculaires:** Le miel pourrait protéger le cœur en ralentissant le processus d'oxydation du « mauvais » cholestérol (LDL) grâce à sa richesse en antioxydants. Des chercheurs ont d'abord mesuré la teneur en antioxydants et en phénols de miels provenant de sept sources florales différentes. Les résultats obtenus par le dosage de la capacité d'absorption des radicaux libres ont clairement montré la présence d'antioxydants dans le miel. Les auteurs de l'étude ont ensuite ajouté les miels à des échantillons de sang humain afin de vérifier leur effet sur les lipoprotéines à basse densité (LDL ou « mauvais » cholestérol) après avoir simulé leur oxydation à l'aide de cuivre. Ils ont alors constaté que le miel ralentissait la formation de « diènes conjugués », produits de cette oxydation potentiellement responsables de troubles cardiovasculaires. Le miel de couleur plus foncée est à privilégier puisque sa teneur en antioxydants est plus élevée. (GHELDOLF ET ENGESETH, 2002).

**III.5. Troubles Ophtalmiques:** Un certain nombre d'articles à travers le monde décrivent l'usage du miel dans le traitement de blépharite, conjonctivite catarrhale, kératite et d'affection variées. En général le traitement est efficace pour obtenir la rémission ou stopper la progression de la maladie (NATIONAL HONEY BOARD, 2002). Dans une étude avec 102 patients présentant des troubles ophtalmiques divers, ne répondant pas aux traitements conventionnels, 85 personnes ont présentés de nettes améliorations, pour les 15 autres l'évolution a été stoppé après le traitement au miel (MOLAN, 2001).

**III.6. Le miel dans le traitement des mammites chez les animaux laitiers:** Un type d'affection dans lequel de fortes concentrations in situ de miel peuvent être obtenues sont les mammites chez les bovines et les caprins laitiers. Le miel pourrait être approprié pour le traitement des ces mammites, par introduction du miel dans la mamelle via le canal du trayon. Il est inoffensif pour les tissus et ne donne lieu à aucun résidu indésirable dans le lait. Sept espèces bactériennes généralement à l'origine de mammites bovines ont été testées pour leur sensibilité à l'action antibactérienne de deux types de miels; l'un à forte activité peroxyde et à activité non peroxyde non détectable et l'inverse pour le second. Les CMI des deux variétés de miel ont été de 1 à 10% (action relative presque similaire) (WAIKATO HONEY RESEARCH UNIT, 2006).

**I.II.7. Propriétés prébiotiques:** Les bifidobactéries sont une sous classe d'un groupe de bactéries considérées comme importantes pour la santé du tractus gastro-intestinal. Des études cliniques ont associé à la présence de bifidobactéries dans le tractus gastro-intestinal, des effets bénéfiques comme la stimulation du système immunitaire et l'anticarcinogénicité. Un prébiotique est un supplément alimentaire non digestible qui modifie la balance de la microflore intestinale en stimulant la croissance et/ou l'activité des organismes bénéfiques, et en supprimant les bactéries nuisibles potentielles (TANNOCK, 1999). KAJIWARA et al. (2002), USTUNOL et GANDHI (2002), après une série d'études arrivèrent aux conclusions suivantes :

- Le miel favoriserait la croissance, l'activité et la viabilité de bifidobactéries habituellement incorporées lors de la fabrication de produits laitiers fermentés.
- Il existerait un effet synergique entre les carbohydrates du miel dans la stimulation de la croissance et l'activité des bifidobactéries.

### **I.III. Les maladies staphylococciques**

Les infections à staphylococciques dues à *S.aureus* occupent en pathologie infectieuse une place importante par leur nombre et leur gravité, aussi bien à l'hôpital qu'à l'extérieur de celui-ci. Elles peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané, ou diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique et un polymorphisme symptomatique extrême

On distingue chez l'homme :les staphylococcies cutanées et muqueuses qui sont les plus fréquentes, les staphylococcies septicémiques qui succèdent généralement à une infection cutanéomuqueuse souvent passée inaperçue et les syndromes provoqués par certaines toxines (LE MINOR et VERON, 1989).La porte d'entrée peut être un follicule pileux, mais généralement c'est une coupure au niveau de la peau qui peut être occasionnée par une minuscule piqûre d'aiguille, ou une plaie chirurgicale. Les corps étrangers incluant les points de sutures sont facilement colonisés par les staphylocoques pouvant ainsi entraîner des infections difficiles à contrôler (KENNETH TODAR UNIVERSITY, 2005).

**I.III.1 Les staphylococcies cutanées, sous cutanées et muqueuses :** *Staphylococcus aureus* peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles, ou profondes.

L'infection superficielle atteint surtout l'enfant ; elle se traduit par, un impétigo réalisant des lésions très superficielles de la peau des jambes de la face (qui prennent

un aspect croûteux vernissés), ou une folliculite qui représente une lésion inflammatoire suppurée et douloureuse. (AVRIL et al, 2000).

L'infection profonde est représentée par un abcès intrafolliculaire de toute la gaine de poil (furoncle), ou par des infections des canaux des glandes sudoripares appelé : hidrosadénite, qui laissent suinter une sérosité purulente (nécessite une exérèse chirurgicale des nodules scléroinflammatoire) et des anthrax.

-Les infections staphylococciques de la glande mammaires peuvent ainsi se développées chez 1 à 3% des femmes qui allaitent, surtout vers le 2<sup>eme</sup> et 3<sup>eme</sup> semaine suivant l'accouchement. (Pouvant se compliquer d'abcès mammaire).

Les infections localisées aux muqueuses atteignent les yeux (conjonctivite), la sphère générale (cervicite,), les voies aériennes (sinusite, amygdalite) [ (SCHAECHTER et al. 1999), (AYQUEM et al. 1998)].

**I.III.2. Le syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée:** .Au cours de cette maladie assez courante, l'épiderme se décolle en mettant à nu une zone rouge sous-jacente, il est observé le plus fréquemment chez les enfants, y compris ceux en bas âge. Dans les crèches, il y'a parfois une multiplication soudaine et massive de ces cas. (PRESCOTT et al. 2003).. C'est une maladie grave qui met en jeu le pronostic vital (AYQUEM et al, 1998).

**I.III.3. Syndrome du choc toxique:** Maladie staphylococcique pouvant avoir des conséquences graves, se déclare souvent chez des femmes qui emploient des tampons menstruels très adsorbants, qui apparemment favoriseraient la croissance des germes. Il peut avoir lieu en dehors de la période de menstruation chez la femme, et chez l'homme. La porte d'entrée peut être vaginale, ou suite à des interventions chirurgicales et des infections cutanées à Staphylocoques (PRESCOTT et al. 2003).La létalité peut atteindre 10% (LE MINOR et MICHEL, 1989).

**I.III.4. Les infections digestives à *Staphylococcus aureus* :** Les entérocolites aiguës à *Staphylococcus aureus* surviennent chez un malade ayant reçu pendant une période prolongée, un antibiotique à large spectre, mal absorbé par la muqueuse intestinale. La flore intestinale normale est détruite et remplacée par *Staphylococcus aureus* résistant aux antibiotiques (FERRON, 1984).

**I.III.5. Les septicémies à *Staphylococcus aureus* :** Les septicémies à *Staphylococcus aureus* sont à l'origine d'un taux de mortalité élevé (de 20 à 30%), cela malgré le traitement antibiotique. (AVRIL et al. 2000).

Elles peuvent survenir à tout âge, favorisées par des traumatismes locaux, des corps étrangers (Cathéter, sonde...), des interventions chirurgicales et des brûlures étendues. [(PILET et al. 1987), (GAILLARD et al. 1989)].

**I.III.6. Intoxication alimentaire :** Les intoxications alimentaires à *Staphylococcus aureus* surviennent après l'ingestion d'aliment souillé (le lait, produits laitiers et les viandes...). Chez les très jeunes enfants et chez les individus à résistance diminuée, un état de choc et la mort peut survenir à la suite d'une déshydratation brutale ou d'accidents cardio-vasculaires résultant essentiellement de vomissements violents [(SINGLETON, 1999), (SCHAECHTER et al. 1999)].

#### **I.III.7. Résistance aux antibiotiques**

La facilité avec laquelle cette espèce bactérienne devient résistante aux antibiotiques a été observée dès les premiers essais thérapeutiques de la pénicilline G. La présence dans les hôpitaux de *S. aureus* multirésistants aux bêtalactamines, aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones est de plus en plus préoccupante car les alternatives thérapeutiques se restreignent (LE MINOR et MICHEL, 1989). La résistance aux pénicillines du groupe méticilline-oxacilline est croisée pour toutes les bêtalactamines y compris les céphalosporines et l'imipénème même s'ils apparaissent actifs sur l'antibiogramme (DUVAL, cité par LE MINOR et VERON, 1989).

Une étude américaine portant sur les infections nosocomiales à staphylocoque, a retrouvé une proportion de d'infection à SARM 16 à 22 % en 1990, alors qu'elle était seulement de 5 à 8 % en 1980 (EL KOURI et al. 1998). La fréquence de la résistance est variable selon les services hospitaliers. Vingt à vingt-cinq pour cent des SAMR sont isolés dans les services de traumatologie, d'urologie, de chirurgie générale, de chirurgie plastique et d'ORL, contre 1 à 6 % dans les services de pédiatrie, de gynécologie obstétrique et les crèches (d'enfants sains). Dans les services de soins intensifs, le nombre de SAMR est plus élevé dans les services des brûlés (36 %) que dans les services de cardiologie (14 %) (BAQUERO et PELAEZ, 1987)

La plupart des souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes à plusieurs des agents antimicrobiens d'usage courant, dont les aminoglycosides, les macrolides et les

antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactame, y compris la dernière génération de céphalosporines. Des infections graves par des souches résistantes à la methiciline ont été le plus souvent traitées avec succès à l'aide d'un antibiotique plus ancien, potentiellement, la vancomycine. Cependant des souches sont devenues récemment résistantes à la vancomycine (PRESCOTT et al. 2003).

### **I.VI. Affections dues à *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* est certainement l'espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie infectieuse (HUSSON et al.1994). L'infection à *Pseudomonas aeruginosa* est particulièrement fréquente chez les malades dont les mécanismes de défenses sont affaiblis. Elle set une cause majeure de mortalité chez les grands brûlés [(BERCHE et al.1988), (AVRIL et al. 1992)].

*P. aeruginosa* se place parmi les agents étiologiques majeurs impliqués dans les infections nosocomiales. Une enquête multicentrique menée aux États-Unis par le centre national des infections nosocomiales indiquait qu'entre 1990 et 1992, *P.aeruginosa* était le deuxième bacille à Gram négatif et le cinquième agent pathogène en fréquence (EMORI ET GAYNES, 1993).

**I.VI.1. Surinfection des plaies :** Les patients se contaminent habituellement pendant leur hospitalisation, suite à la surinfection des plaies opératoires, traumatiques ou ulcéreuses. En fonction de leurs localisations elles peuvent donner lieu à des otites moyennes ou mastoïdites lors de plaies à la tête, méningites purulentes après neurochirurgie, endocardites aiguës après chirurgie cardiaque...certaines de ces infections peuvent devenir chronique ou récidivantes (LE MINOR ET VERON, 1989).

La colonisation des lésions par *P.aeruginosa* est rapide fréquente et grave lors de brûlures étendues (10% de la surface corporelle), le risque majeur en est la septicémie qui intervient dans un tiers des cas; même sous traitement, la mortalité de ces septicémies par brûlures reste élevée (75% environ) (STONE, 1969).

**I.VI.2. Infections oculaires:** Les atteintes oculaires font le plus souvent suite à des microtraumatismes de la cornée, liés au port de lentilles souples et à une contamination par une eau contenant *P. aeruginosa*. Ces infections sont également favorisées par une corticothérapie locale, l'utilisation inappropriée d'un anesthésique

de contact ou d'un collyre contaminé. L'infection débute classiquement par un petit ulcère nécrotique rapidement extensif pouvant évoluer vers un abcès de cornée, puis une perforation de la cornée, et fonte purulente de l'œil en 48 heures. *P. aeruginosa* est une cause de *conjonctivite* chez les prématurés ou les enfants de faible poids à la naissance. Cette conjonctivite peut se compliquer d'une atteinte méningée et cérébrale (DUBROUS et al. 1997)

**I.VI.3. Atteintes digestives:** *P. aeruginosa* est responsable d'atteintes digestives parfois épidémiques : diarrhées du nouveau-né et « fièvre de Shanghai », dont le tableau est proche de celui de la typhoïde. *P. aeruginosa* est isolé chez 10 à 20 % des malades souffrant d'une péritonite communautaire (NGUYEN ET JARLIER, 2001).

**I.VI.4. L'otite externe maligne:** est observée principalement chez le diabétique âgé, elle est à point de départ cutané sous forme d'une otite externe banale, mais qui résiste au traitement. Cette infection met en jeu le pronostic fonctionnel et vital, la mortalité peut atteindre 50% des cas. *P. aeruginosa* est l'agent quasi exclusivement responsable de cette infection. [(LE MINOR ET VERON, 1989), (CARPENTIER et al. 2003)].

**I.VI.5. L'ecthyma gangrenosum :** du presque exclusivement à *P. aeruginosa* caractérisé par l'apparition d'une vésicule hémorragique puis ulcéronécrotique. L'aspect final est celui de nodules inflammatoires siégeant préférentiellement au niveau des cuisses, du périnée, du creux axillaire ou des extrémités (ELBAZE et al. 1991).

#### **I.VI.6. Résistances aux antibiotiques**

La prescription d'antibiotiques à large spectre majore la capacité de colonisation de *P. aeruginosa* en éliminant la flore saprophyte qui joue normalement un rôle de barrière vis-à-vis de la flore transitoire (à laquelle appartient *P. aeruginosa*). Les antibiothérapies probabilistes à large spectre pour traiter un épisode infectieux, sont à l'origine d'une colonisation par des bacilles naturellement résistants et aptes à acquérir de nouvelles résistances, comme *P. aeruginosa* (CARPENTIER et al. 2003). La fréquence observée des souches résistantes aux antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa* varie sensiblement d'une étude à l'autre (influence de la technique),

D'une région à l'autre, et même d'un hôpital à l'autre, en raison de la pression de sélection sur les souches résistantes (LE MINOR et.VERON, 1989).

*P. aeruginosa* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques, dont la plupart des bêtalactamines hydrophiles (LIVERMORE, 2002). Les résistances acquises sont très fréquentes chez *P. aeruginosa* et touchent les trois principales familles d'antibiotiques utilisées contre cette bactérie : bêtalactamines, aminoglycosides et fluoroquinolones (CARPENTIER et al. 2003). . Les résistances sont parfois associées pour une même souche (CAVALLO JD, et al. 2001).

#### **I.V.Activité antibactérienne du miel vis-à-vis de *S.aureus* et de *P.aeruginosa***

"*Staphylococcus aureus* est l'une des espèces les plus sensible à l'action antibactérienne du miel, il a été souvent fait état de la complète inhibition de *S.aureus* par des miels dilués à des concentrations très basses" (MOLAN ,1992). "Le miel à un potentiel antibactérien suffisant pour stopper le croissance bactérienne s'il est dilué au moins 9 fois et au plus 56 fois en présence de *Staphylococcus aureus* (COOPER et MOLAN, 1999).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 82 souches de SAMR ont été trouvées allant de 3% à 8% (ALLEN et al 2000). Des plaies infectées par SAMR ont été débarrassées de l'infection et guéries par l'application de miel (NATARAJAN et al. 2001).Un récent bilan sur le succès de l'usage du miel comme pansement sur les plaies infectées, a montré que beaucoup d'auteurs soutiennent l'usage du miel dans les plaies infectées et quelques uns suggèrent son usage prophylactique sur les plaies des patients prédisposés au SAMR et autres bactéries antibiorésistantes.

Des isolats humains au total de 50 de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ont été collectionnés de diverses sources pathologiques et testés pour leur sensibilité à la gentamycine à différentes concentrations et au miel (trois échantillons) à différentes dilutions. Il à été trouvé que l'activité antibactérienne de la gentamycine était inférieure à celle du miel (ADELEKE ET AL. 2006).Cependant les auteurs ont trouvé une activité remarquable du miel non dilué sur *Pseudomonas Aeruginosa* contrastant avec celle observée sue *E.coli*, ce qui est en désaccord avec les travaux de EFEM (1992) qui a trouvé *P.aeruginosa* résistante au miel non dilué.

NZEAKO ET HAMDI (2000) travaillant sur six échantillons de miels ont trouvé que des souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'amikacine, ceftriaxone,

tobramicine, aztreonam, gentamycine et l'imipénème étaient sensibles à tous les échantillons de miels étudiés.

VARDI et al (1998) ont rapporté le cas d'une cicatrisation complète après application de miel pendant 21 jours sur des plaies sternales profondes compliquées par une infection à *S.aureus*, MRSA, *Pseudomonas*, *E.coli* et *Eterobacter spp*, suite à une intervention chirurgicale pour une affection cardiaque congénitale chez neuf nouveaux nés et bébés. La majorité de ces patients ont été traités sans succès pendant plus de 14 jours avec des antiseptiques et des antibiotiques systémiques

Dans un autre cas une plaie étendue par suite d'une exérèse chirurgicale de tissus nécrosé, et fortement infectée avec *P.aeruginosa* après l'excision, n'a pu être greffée (greffon de peau). L'utilisation du miel (miel de Manuka) comme pansement a entraîné un assainissement rapide de cette plaie, et a permis la prise de la greffe (ROBSON, 2000). Le même type de miel (miel de Manuka) a permis la cicatrisation rapide d'un ulcère profond est étendu de la peau du à une septicémie meningococcique Fortement infecté par *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *Enterococcus* , et n'ayant pas répondu A tous les traitements conventionnels modernes pendant plus de 9 mois de soins intensifs (DUNFORD et al.2000).

Un cas qui mérite d'être cité est la remarquable guérison d'un adolescent au royaume unis souffrant d'une lésion infectée chronique suite à une septicémie méningococcique avec nécrose tissulaire étendue, compliquée par une infection à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, rebelle a tous les traitements conventionnels, et nécessitant une amputation de ses deux jambes juste en dessous des genoux et des phalanges distales et moyennes de ses deux mains. Un traitement à l'aide de tampons imprégnés de miel (miel de Manuka), a abouti à une guérison totale au bout d'un délai de dix semaines (DUNFORD et al. 2000).

**I.VI.Conclusion** : S'il est exagéré d'attribuer au miel toutes les vertus, la masse de publications scientifiques concernant ses effets antibactériens, cicatrisants antioxydants et anti-inflammatoires ainsi que son utilisation dans le traitements des plaies infectés, des ulcères gastriques, des affections ophtalmiques, des mammites (pour ne citer que ceux-la) le tout étayé par des résultats parfois quasi-miraculeux lors d'essais cliniques en font un produit quasi-miraculeux. Il est non toxique non irritant, n'entraîne pas d'effets secondaires et permet d'éviter les désagréments de certains traitements lourds et astreignants physiquement, psychologiquement et économiquement. A l'ère ou les antibiotiques et même certains antiseptiques semblent pratiquement révolus, son utilisation semble une des meilleures alternatives qui s'offriraient à la médecine moderne conventionnelle.

## **I.VII. L'amidon**

### **I.VII.1. Source de l'amidon:**

L'amidon est un des polymères glucidiques les plus abondants dans la nature. Il est produit à l'état de granules dans les feuilles, racines, tubercules, noyaux, graines et pollens des plantes et y sert de réserve nutritive (VERCAUTEREN et RAPAILLE, 1999).

### **I.VII.2. Structure de l'amidon:**

Les amidons sont des mélanges en proportions variables de deux types de constituants, l'amylose et l'amylopectine (CHEFTEL C. et CHEFTEL H., 1978).

L'amidon contient également des constituants non glucidiques tels que: L'acide phosphorique, Des cations (  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ), des phosphatides (lipides phosphorés). La teneur des différents amidons en ces composés annexes varie selon leur origine végétale (LOUISOT, 1983).

### **I.VII.3. Eléments fondamentaux de l'amidon**

MASSAUX et al (2006) travaillant sur l'amidon de blé concluent que les variations de proportion des petits granules en fonction de la variété et leur teneur en lipides vont par exemple influencer l'hydrolyse enzymatique, et sont aussi moins enclins aux transformations physico-chimiques. Les amidons formés de petites granules et riches en lipides sont moins facilement attaqués par les amylases. Le maïs "normal" contient environ 27% d'amylose et 73% d'amylopectine. Le maïs cireux est composé essentiellement d'amylopectine et seulement de 1 à 2% d'amylose. Selon le diamètre moyen des granules d'amidon de maïs est de 3  $\mu m$  à 26  $\mu m$  et leur teneur en lipides de 0,75%, alors que le diamètre des granules d'amidon de pomme de terre est de 40 à 50  $\mu m$  et leur teneur en lipides 0,15 (VERCAUTEREN et RAPAILLE, 1999).

La dimension et la répartition des grains d'amidon sont importantes pour des applications bien précises. D'autres caractéristiques physiques simples importantes relativement à la fonctionnalité sont la forme et la surface des grains d'amidon. Les deux polymères ont des structures très différentes - l'amylose étant linéaire et l'amylopectine très ramifiée - et chacun joue un rôle déterminant dans la fonctionnalité finale de l'amidon naturel et de ses dérivés: viscosité, résistance au cisaillement, gélatinisation, texture, solubilité, pouvoir adhésif, stabilité du gel, gonflement au froid et rétrogradation, tout dépend du ratio amylose/amylopectine (VERCAUTEREN et RAPAILLE, 1999).

L'amidon présente une pression osmotique négligeable (BARRY et BARRY, 1971).

TORLEY et al (2004) après une étude visant à déterminer comment les composants mineurs présents dans le miel affectent la gélatinisation de l'amidon ont trouvé que les miels de différentes sources montrent un effet variable sur la gélatinisation de l'amidon et attribuent cette différence à l'activité diastasique mais également à la composition et à la concentration des éléments organiques mineurs présents dans le miel.

Selon BOUKRAA et al (2006) le miel et l'amidon présenteraient une activité synergique antibactérienne vis-à-vis de *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

## Chapitre II

### Matériel et méthodes

#### II.1. Lieu d'étude:

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie; Département des Sciences Vétérinaires, Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires Université Ibn Khaldoun de Tiaret, durant une période de six mois (Octobre à Avril 2006/2007).

La détermination des taux de HMF et des indices diastasiques a été effectuée au CARI (laboratoire de références) Asbi 4 place Croix du sud B-1348 LOUVAIN-LA- NEUVE Belgique.

#### II. 2. Matière première:

##### II.2.1. Le miel:

Pour la réalisation de ce travail, nous avons testé l'effet de six échantillons (ech) de miels Algériens provenant de six régions différentes.

-Une variété de Bouguirat (Mostaganem), présentée par l'apiculteur comme un miel multifloral mais à prédominance oranger (conservée depuis la récolte dans un pot en plastique opaque).L'apiculteur ne disposant pas d'extracteur il à été procédé à un pressage sans filtration.

-Une variété de Sidi Lazreg (Relizane), présentée par l'apiculteur comme étant un miel d'eucalyptus (Conservée depuis la récolte dans un pot en plastique transparent).

-Une variété de Oued Djemaa (Relizane), présentée par l'apiculteur comme étant un miel d'oranger (Conservée depuis la récolte dans un pot en plastique transparent).

-Une variété de Laghouat, conditionnée en pots de verre transparent et portant mention « miel de jujubier ».

-Une variété de Ain Oussera (Djelfa), conditionnée en pots de verre transparent et portant la mention « miel de chardon ».

-Une variété de la région de Frenda (Tiaret) et déclarée être du miel multifloral .

**Tableau n°5 :** Répartition géographique et dates de récolte des différents échantillons de miel.

Echantillons des miels	Origine botanique	Origine géographique	Date de récolte
Echantillon 1	Multifloral	Bouguirat	Juillet 2006
Echantillon 2	« Eucalyptus »	Sidi Lazreg	Juin 2006
Echantillon 3	« Oranger »	Oued Djemaa	Avril 2006
Echantillon 4	« Jujubier »	Laghouat	Juin 2006
Echantillon 5	« Chardon »	Ain Oussera	Juin 2006
Echantillon 6	Multifloral	Frenda	Juillet 2006

Les échantillons du miel ont été conservés à température ambiante et à l'obscurité.

### II.2.2 L'amidon:

On a utilisé l'amidon de maïs (poudre pur) conservé à la température ambiante du Laboratoire (amidon soluble F.A, Cheminova).

### II.2.3 Souches bactériennes:

-*Staphylococcus aureus*: Obtenue auprès des services de la répression des fraudes de la wilaya de Tissemsilt. Il a été isolé à partir d'un produit de pâtisserie. Entretien sur milieu de Chapman en boîte de petri, conservation au froid à une température de 4°C.

-*Pseudomonas aeruginosa* : obtenue auprès d'un laboratoire d'analyses médicales privé (Tiaret). Entretien sur Milieu King A en tube, conservation au froid à une température de 4°C.

-Ces souches ont été confirmées au laboratoire.

### **II.3. Analyse physico-chimiques:**

#### **II.3.1. Recherche de falsification :** méthode de Fiehe.

Citée par HUCHET M. (1996). Voir annexes.

#### **II.3.2. Détermination de la teneur en eau**

Méthode harmonisée de la commission européenne (2001). Voir annexes

#### **II.3.3. Détermination du pH**

##### **II.3.3.1.Principe**

Détermination de la concentration du miel en ions dissociés  $H^+$

##### **II.3.3.2. Matériel**

pH-mètre digital CG 818

-Etalonnage du pH mètre

##### **II.3.3.3. Mode opératoire**

-laisser le commutateur en position pH.

-Régler le bouton "°C" à la température du miel (température de la pièce).

-Plonger l'électrode dans le miel. Après un temps de mise en température approprié, procéder à la mesure de la valeur pH.

#### **II.3.4. Détermination de la teneur en HMF d' après *Winkler***

Méthode harmonisée de la Commission européenne (2001)

#### **II.3.5. Détermination d'activité de diastase selon Phadebas**

Méthode harmonisée de la Commission européenne (2001)

### **II.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales inhibitrices synergiques.**

#### **II.4.1.Principe**

La détermination de l'effet antibactérien du miel est révélé par la mise en évidence de la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui est la plus petite concentration en miel, pour laquelle on n'observe aucune croissance visible de germes, elle définit l'arrêt du pouvoir de reproduction bactérienne.

La détermination de la concentration inhibitrice synergique minimale est révélée par la mise en évidence de la concentration minimale en miel et en amidon pour lesquelles on n'observe aucune croissance visible de germes.

#### **II.4.2. Matériels**

- Autoclave (Sanoclav)
- Etuve (Heraeus)
- Four a micro-ondes (Whirlpool)
- Vortex ( tecno Kartell TK 3S)

#### **II.4.3. Solutions**

Eau distillée

KOH (pH:14).

Poudre d'amidon de maïs a des concentrations de 10% ,20% ,30%

#### **II.4.4. Milieu de culture**

Gélose nutritive

#### **II.4.5. Détermination de la CMI**

##### **II.4.5.1. Mode opératoire**

Homogénéisation du miel, prélèvement de la quantité à tester à l'aide de seringues graduées, cette quantité de miel est mise dans un tube à essai.

-la gélose nutritive est liquéfiée au four à micro ondes et refroidie à une température de 50°C pour éviter la destruction des enzymes du miel au moment de son incorporation à ce dernier.

En respectant les conditions d'asepsie, on prélève une quantité de gélose nutritive, et on l'ajoute à la quantité de miel à tester (dans le tube à essai) de telle sorte que le volume total (miel et gélose) soit de 5 ml. On homogénéise le mélange au vortex, on mesure le pH (pH-mètre digital) puis on coule en boîte de pétri et on laisse solidifier

-Après solidification du mélange et aseptiquement, à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée au bec bunsen on prélève un inoculum bactérien et on ensemence en stries. Les boîtes de pétri sont placées en position renversée dans l'incubateur réglé à 37°C pendant 24h au bout desquelles on fait la lecture.

#### **II.4.6. Détermination des concentrations inhibitrice synergiques (CIS) avec une solution stock d'amidon à 10%.**

En démarrant en dessous des valeurs de la CMI on incorpore des quantités croissantes d'une solution d'amidon à des quantités décroissantes de miel de tel sorte que le mélange miel, solution d'amidon et gélose soit égal à 5 ml. Les concentrations inhibitrices synergiques sont les concentrations en miel et en amidon pour lesquelles il n'y a aucune croissance visibles des bactéries test.

##### **II.4.6.1. Mode opératoire**

##### **II.4.6.2. Préparation de la solution d'amidon**

- Mesurer 50 ml d'eau distillée à l'aide d'un Becher la mettre dans une fiole stérile de 100 ml.
- Peser 5g de poudre d'amidon à l'aide de la balance analytique; la verser dans la fiole contenant l'eau distiller, agiter manuellement pour homogénéiser la solution.
- Couvrir l'embout de la fiole avec du papier d'aluminium et chauffer dans le four à micro ondes jusqu'à ébullition et que le mélange devient visqueux et translucide.
- Préserver cette fiole dans l'étuve à 37°C.

##### **II.4.6.3. Préparation d'un milieu à base de miel, d'empois d'amidon et de gélose nutritive**

- Addition de l'empois d'amidon au miel
- étiqueter les tubes à essai en précisant pour chaque tube la variété et la concentration de miel, ainsi que les concentrations d'empois d'amidon qui doivent y être introduites.
- A l'aide de seringues graduées stériles introduire des quantités décroissantes de miel en démarrant de la valeur située juste en dessous de la CMI dans des tubes à essai stériles.
- Ajouter des volumes croissants d'empois d'amidon.
- Neutraliser le mélange par le KOH pour favoriser l'action des amylases du miel dont l'activité est optimale à un pH 7 (mais elles restent actives dans une large gamme de pH entre 4 et 11).
- Homogénéiser le contenu à l'aide du vortex.
- Mesurer le pH avant l'incubation avec des bandelettes.
- Fermer les tubes et mettre à incuber dans l'étuve réglée à 37°C pendant 24h.
- .Incorporation des mélanges (miel et empois d'amidon) à la gélose nutritive.
- Etiqueter le fond de boîtes de pétri stériles en mentionnant pour chacune les concentrations en miel, empois d'amidon et gélose qui doivent y être mises.

- Liquéfier la gélose au four à micro ondes
- laisser refroidir jusqu'à une température de 50°C et maintenir cette température en plongeant le flacon de gélose dans un bain Marie réglé à 50°C (la quantité d'eau ne doit pas atteindre le bouchon pour éviter une infiltration éventuelle).
- Incorporer la gélose aux différents mélanges (miel et empois d'amidon) de telle sorte que le volume total soit égal à 5ml.
- Homogénéiser le tout au vortex.
- Couler les différents mélanges dans les boites de pétri respectives.
- Laisser refroidir sur une surface froide
- ensemencement, incubation (37°C pendant 24h) et lecture.

## **II.5. Tests confirmatifs**

### **II.5.1. Test confirmatif à l'eau distillée**

Le but de ce test confirmatif est de montrer que l'inhibition de la croissance au-delà de la CMI n'est pas due à la dilution (donc de la génération peroxyde d'hydrogène) du fait de l'adjonction de la solution d'amidon.

#### **II.5.1.1. Addition d'eau distillée au miel**

- Dans des tubes à essai stériles, ajouter des volumes d'eau distillée correspondants à celles de l'empois d'amidon qui entrent dans les différentes inhibitions synergiques aux mêmes concentrations de miel.
  - neutraliser le mélange (miel et eau distillée) par le KOH.
- Homogénéiser au vortex.
- Mesurer le pH à l'aide de bandelettes.
- Fermer les tubes.
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24h.

#### **II.5.1.2. Addition du mélange (miel et eau distillée) à la gélose nutritive**

- Etiqueter des boites de pétri stériles en mentionnant les volumes de miel d'eau distillée et de gélose respectives qui doivent y être coulées.
- Liquéfier la gélose au four à micro-ondes.
- La laisser refroidir à une température de 50°C et la maintenir à cette température en mettant le flacon dans un bain marie réglé à 50°C.
- Incorporer la gélose aux différents mélanges (miel et eau distillée) de telle sorte que le mélange total soit égal à 5 ml.
- Laisser refroidir sur une surface froide et stérile.

-A l'aide d'une anse en platine prélever à chaque fois deux colonies isolées, ensemercer par striation. Ces ensemencements sont fait à partir de bactéries jeunes (en croissance) ensemencées la veille.

- incubation à 37°C pendant 24 h et lecture.

### **II.5.2. Test confirmatif avec l'amidon**

Le but de ce test est de montrer que l'amidon à lui seul n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

#### **II.5.2.1. Addition de l'empois d'amidon à la gélose nutritive**

-Etiqueter des boites de pétri stériles en mentionnant les concentrations respectives d'empois d'amidon et de gélose qui doivent y être coulées.

-Comme pour le précédent test, liquéfier la gélose nutritive la laisser refroidir à une température de 50°C et la maintenir a cette température à l'aide du bain marie.

-Incorporer les concentrations d'empois d'amidon égales à celles qui entrent dans les différentes valeurs des inhibitions synergiques à la gélose nutritive.

-Bien mélanger à l'aide du vortex.

-Couler en boites de pétri, laisser solidifier sur une surface froide et stérile.

-Ensemencement, incubation (37°C pendant 24 h) et lecture.

## II.6. Protocole expérimental

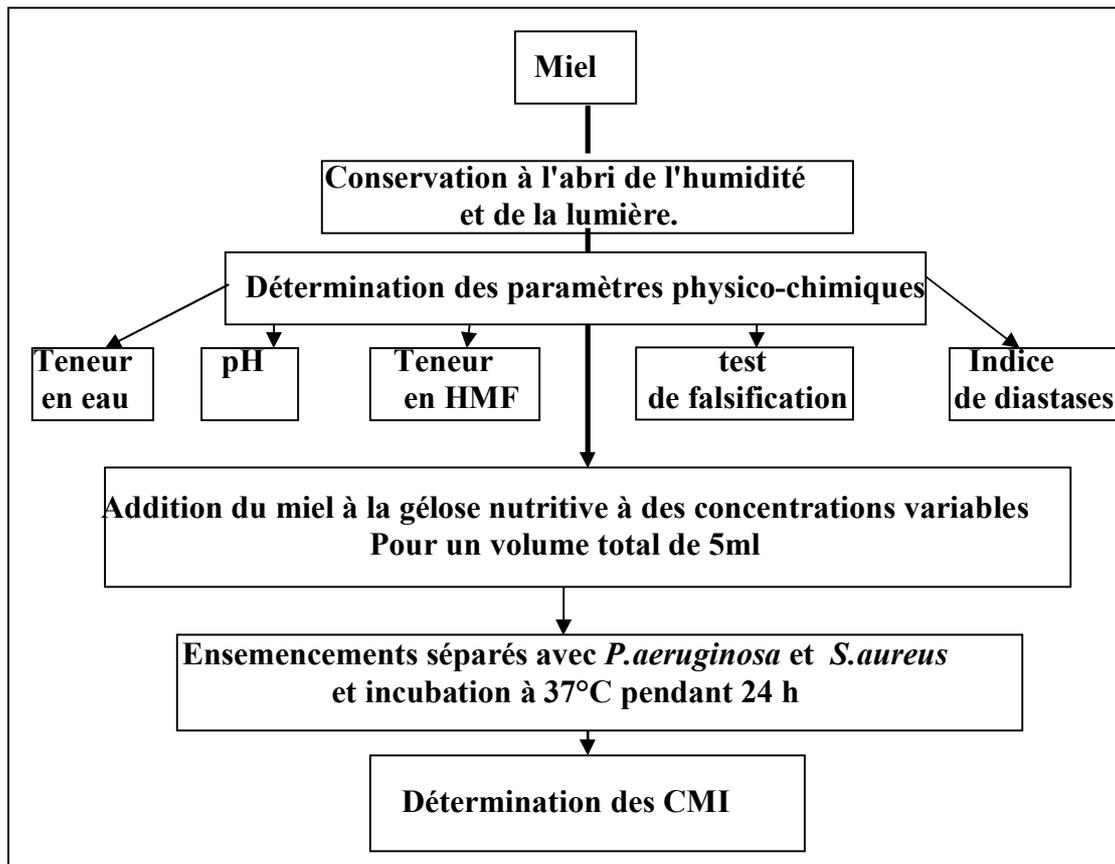


Figure n° 2: Détermination des CMI

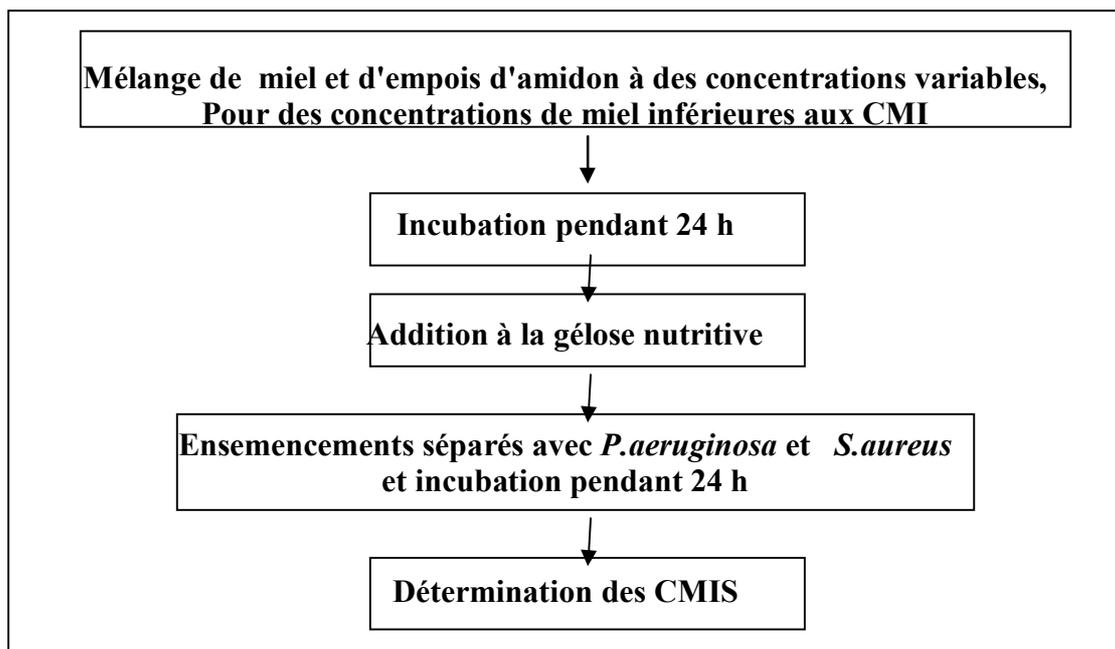


Figure n°3: Détermination des CMIS

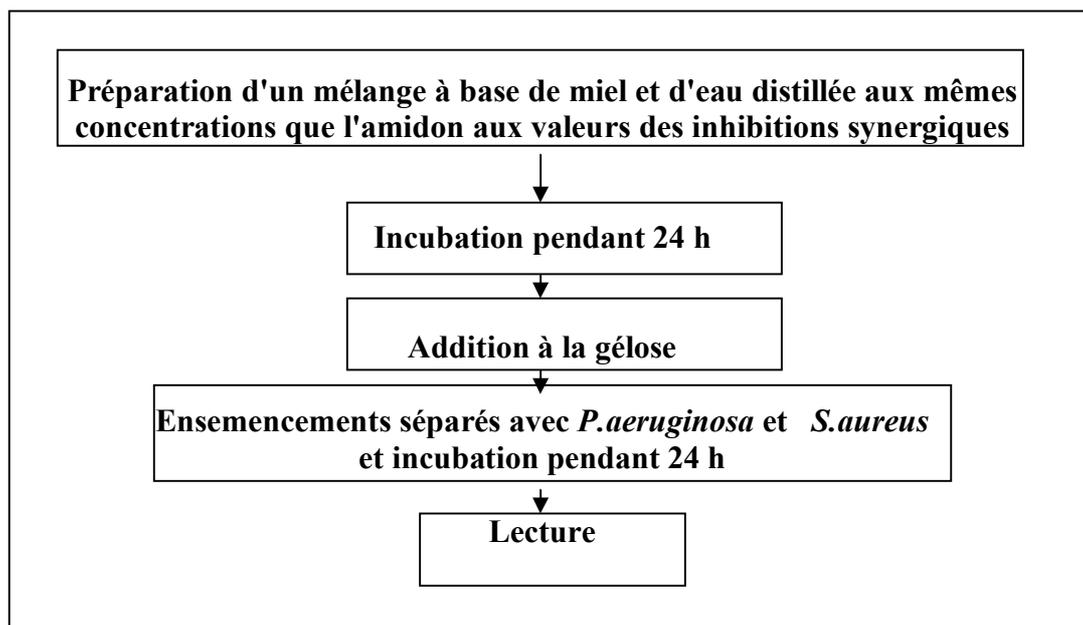


Figure n° 4 : tests confirmatifs à l'eau distillée

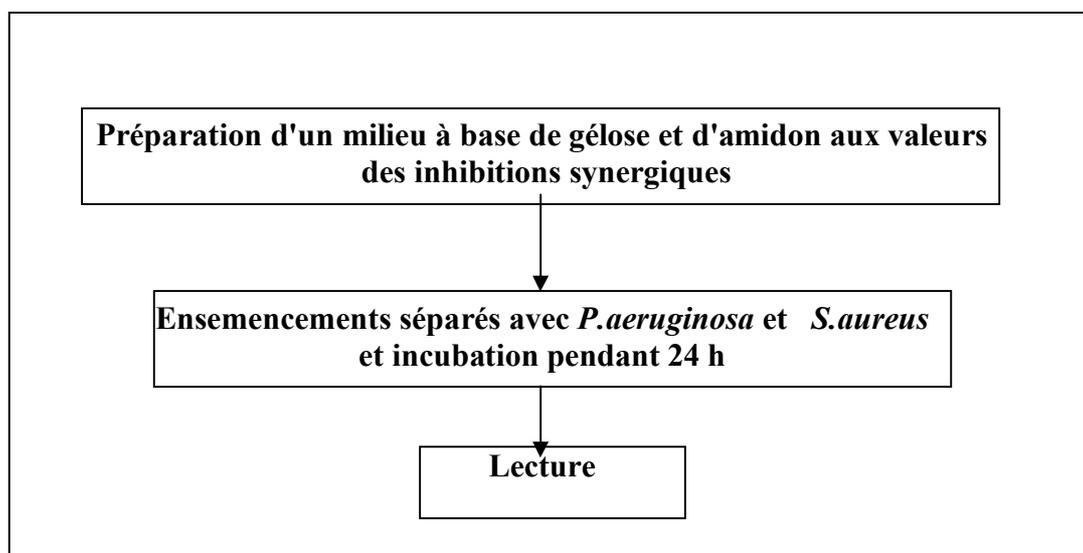


Figure n°5: test confirmatif à l'amidon

**II.7. Détermination des concentrations inhibitrice synergiques (CIS) avec une solution stock d'amidon à 20%.**

-Même protocole qu'avec la solution d'amidon à 10%, mais avec des concentrations en dessous des valeurs de la CMIS, obtenues avec la solution stock de 10%, et sans descendre en dessous d'un pourcentage relatif de 40% de gélose.

**II.8. Détermination des concentrations inhibitrice synergiques (CIS) avec une solution stock d'amidon à 30%.**

-Même protocole que pour la solution stock à 20%,mais en utilisant une solution stock à 30%;

**II.9. Rôle des durées d'incubation sur l'effet synergique**

Les mélanges miels amidons aux concentration des CMIS sont mis à incuber pour des durées variables ( $t = 0$ ,  $t = 1h$ ,  $t = 6h$  et  $t = 12h$ ), incorporation à la gélose, puis ensemencement incubation pendant 24 h et lecture.

### **II.10. Traitement statistique**

L'analyse statistique des données par le test de Chi<sup>2</sup> de Pearson (test de corrélation) et Chi<sup>2</sup> du MV été réalisés sur le logiciel STATISTICA par une comparaison entre chaque paramètre physico-chimique du miel et la concentration minimale inhibitrice ainsi qu'entre les concentrations minimales inhibitrices synergiques et l'indice de diastases, par une comparaison a une référence internationales).

\* significatif à 0,05.

\*\* significatif à 0,01.

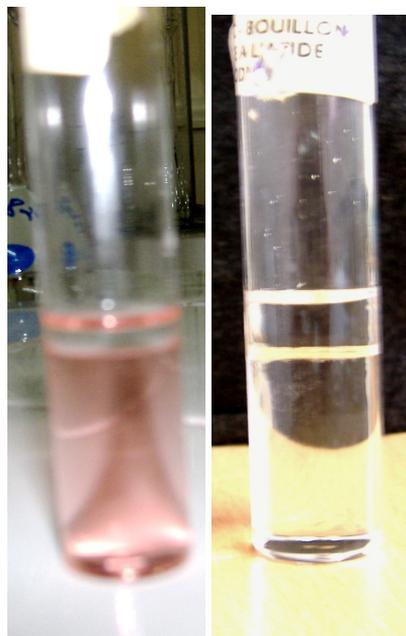
\*\*\* significatif à 0,001.

## Chapitre III

### Résultats

#### III.1. Test de falsification par rapport aux sucres:

Seul le miel de Frenda a présenté une coloration rose.



**Photo n° 1:**Résultat du test de falsification par rapport aux sucres.

Le miel ayant subi un ajout de sucre se colore en rose.

#### III.2 Teneur en eau:

**Tableau n°6:**Indice de réfraction à 20°C et teneur en eau des cinq échantillons de miels

Echantillons de miels	Indice de réfraction	Teneur en eau %
Miel de Bouguirat	1,495	16,6
Miel de Sidi Lazreg	1,498	15,4
Miel de Oued Djemaa	1,494	17,0
Miel de Laghouat	1,50	14,6
Miel de Ain Oussera	1,50	14,6

Ces valeurs concordent avec les normes du CODEX ALIMENTARIUS (2003) qui prescrit une teneur maximale de 20%.

**III.3. pH:****Tableau n°7:** Valeurs de pH pour les cinq variétés de miels

Variétés	Miel de Bouguirat	Miel de Sidi Lazreg	Miel De Oued Djemaa	Miel De Laghouat	Miel Ain Oussera
pH	4	3,86	3,81	4,64	4,73

Selon BOGDANOV et BLUMER (2001) Ces Le miel selon sa provenance un pH moyen entre 3,2 et 4,5, certains miels ont un pH nettement plus élevé entre 5 et 6 tels que les miels de châtaigner et de miellat.

**III.4 Teneur en HMF:****Tableau n°8:** Teneurs en HMF des cinq variétés de miels.

Variétés	Miel de Bouguirat	Miel de Sidi Lazreg	Miel De Oued Djemaa	Miel De Laghouat	Miel de Ain Oussera
HMF mg/kg	29,5	9,4	11,5	Non quantifié	6,7

"Non quantifié":  $1,2 < \text{HMF} \leq 3,5$

Ces valeurs correspondaient aux normes du Codex alimentarius et même aux normes de L'UE qui sont les plus draconiennes en la matière.

.C'est Le paramètre qui ompte le plus dans le commerce international (RAMIREZ CERVANTES et al. 2000).Le HMF peut être utilisé pour le dépistage des miels surchauffés (.KARABOURNIORTI et al. 2001).

**III.5 Indice diastasique:****Tableau n°9:** Valeurs des indices de diastases pour les cinq variétés de miels

Variétés	Miel de Bouguirat	Miel de Sidi Lazreg	Miel de Oued Djemaa	Miel De Laghouat	Miel de Ain Oussera
ID	15,2	26,1	13,1	16,6	14,6

### III.6. Valeurs du pH pour les différents mélanges miel gélose correspondant aux valeurs des CMI

**Tableau n° 10:** pH du mélange miel gélose aux valeurs des CMI pour les cinq variétés.

Espèce bactérienne	Type du miel	CMI	pH
		Miel %	Miel+gélose %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Miel de Bouguirat	15	6,1
	Miel de Sidi Lazreg	18	6,3
	Miel de Oued el Djemaa	26	6,7
	Miel de Laghouat	25	6,9
	Miel de Ain oussara	22	6,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	Miel de Bouguirat	25	6,3
	Miel de Sidi Lazreg	23	6,2
	Miel de Oued el djemaa	30	6,4
	Miel de Laghouat	29	6,7
	Miel de Ain oussara	30	6,9

### III.7. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°11:** Valeurs des CMI pour les cinq échantillons de miels vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

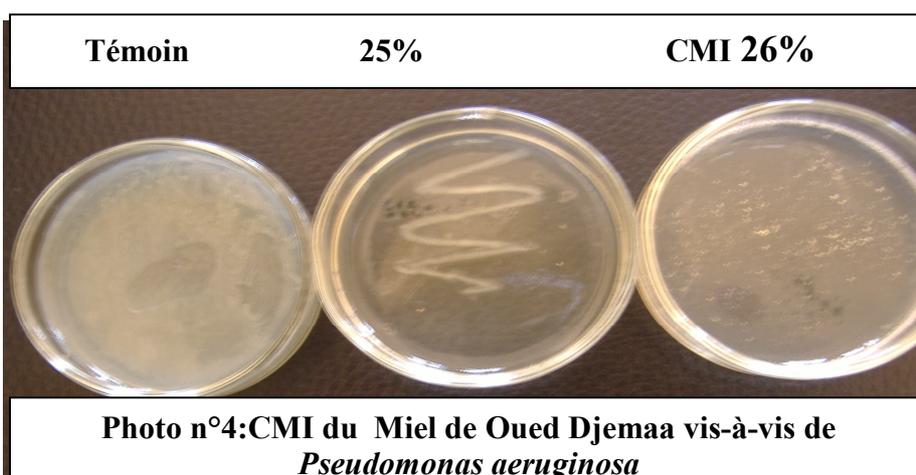
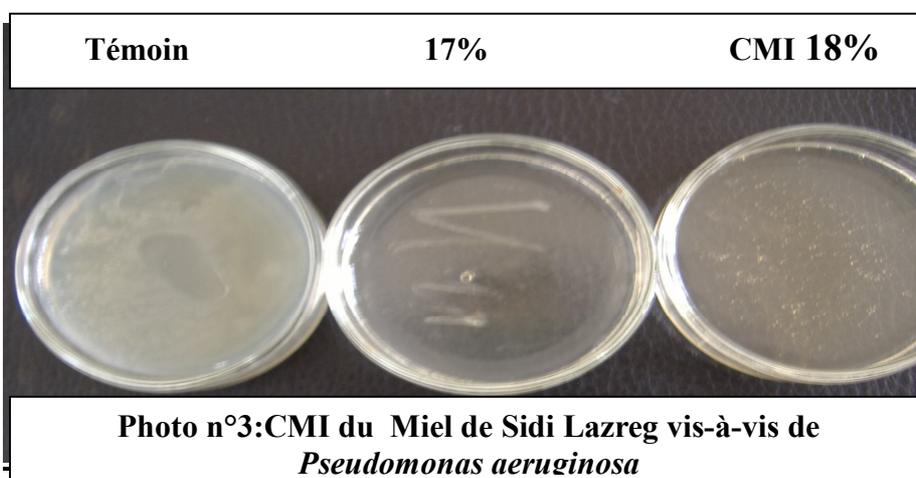
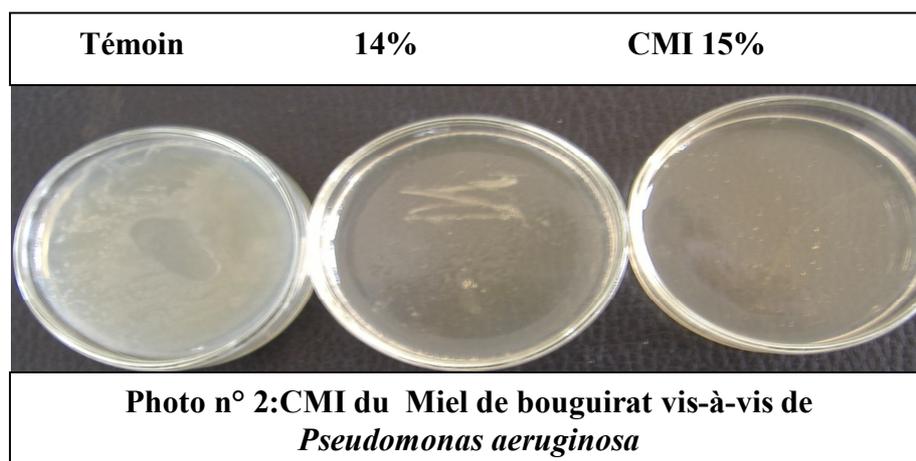
Concentration Miel en %	Concentration Gélose en %	Miel de Bouguirat	Miel de Sidi Lazreg	Miel de Oued Djemaa	Miel de Laghouat	Miel de Ain Oussera
10	90	+++	+++	+++	+++	+++
11	89	+++	+++	+++	+++	+++
12	88	++	+++	+++	+++	+++
13	87	++	+++	+++	+++	+++
14	86	++	+++	+++	+++	+++
<b>15</b>	85	<b>CMI</b>	++	+++	+++	+++
16	84	-	++	+++	+++	+++
17	83	-	++	+++	+++	+++
<b>18</b>	82	-	<b>CMI</b>	+++	+++	++
19	81	-	-	+++	+++	++
20	80	-	-	+++	+++	++
21	79	-	-	++	+++	++
<b>22</b>	78	-	-	++	++	<b>CMI</b>
23	77	-	-	++	++	-
24	76	-	-	++	++	-
<b>25</b>	75	-	-	++	<b>CMI</b>	-
<b>26</b>	74	-	-	<b>CMI</b>	-	-
27	73	-	-	-	-	-
28	72	-	-	-	-	-
29	71	-	-	-	-	-
30	70	-	-	-	-	-

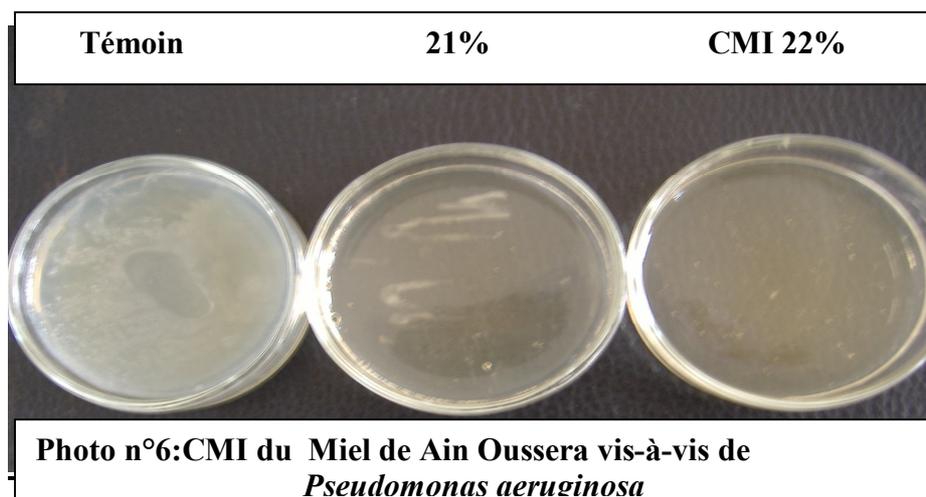
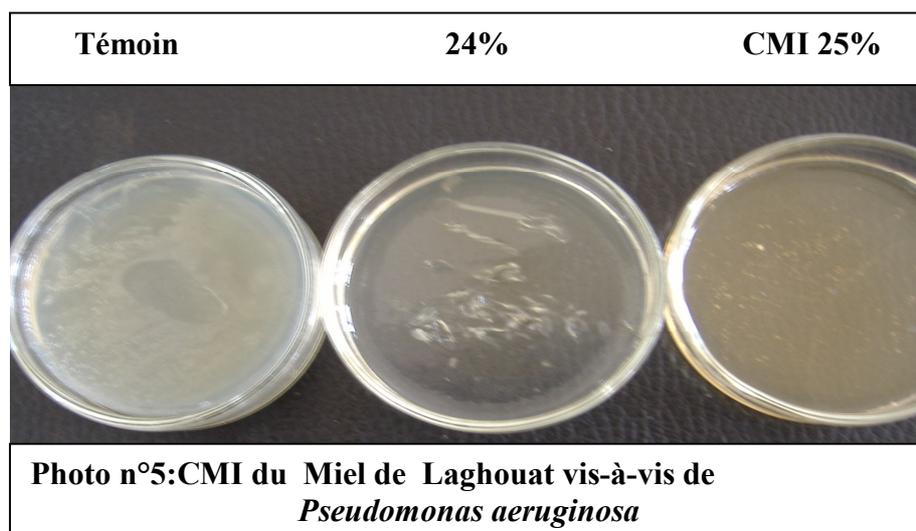
+++ : Croissance abondante

++ : Croissance moyenne

+ : Croissance faible

- : Inhibition





### III.7.1. Analyses des corrélations entre les paramètres physico-chimiques des miels et les CMI vis -a -vis *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°12:** Corrélation entre les CMI et pH :

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	5,000	df=4	p=,28731
Chi <sup>2</sup> du MV	6,730	df=4	p=,15087
R de Spearman	-,289	t=-,5222	p=,63762

**Tableau n° 13:** Corrélation entre les CMI et HMF :

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	-,205	t=-,3631	p=,74058

**Tableau n°14:**Corrélation entre les CMI et l'indice de diastase

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	20,000	df=16	p=,22025
Chi <sup>2</sup> du MV	16,094	df=16	p=,44641
R de Spearman	-,500	t=-1,000	p=,39100

**Tableau n°15:**Corrélation entre les CMI et la teneur en eau :

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	,051	t=,08897	p=,93471

### III.8. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°16:** Valeurs des CMI pour les cinq échantillons de miels vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

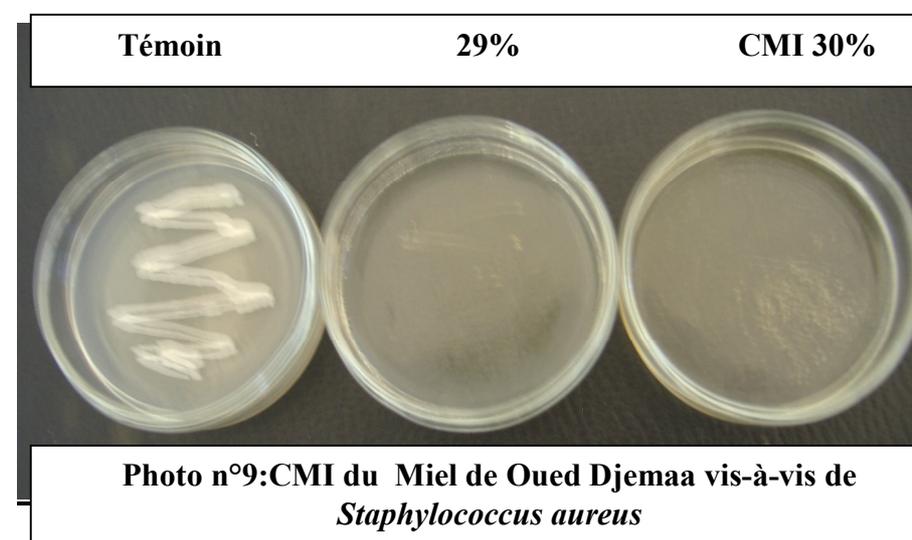
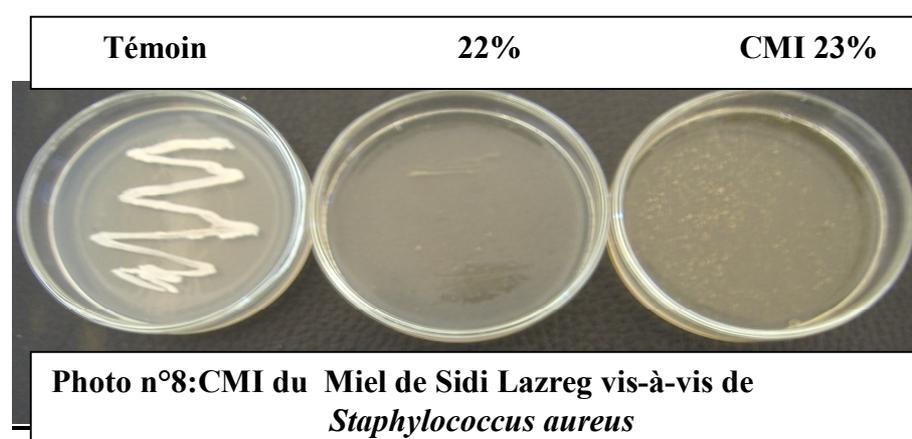
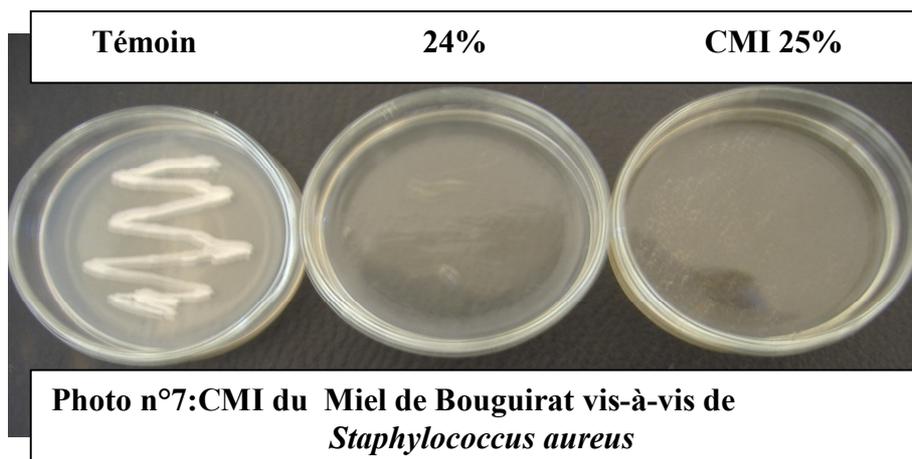
Concentration Miel en %	Concentration Gélose en %	Miel de Bouguirat	Miel de Sidi Lazreg	Miel de Oued Djemaa	Miel de Laghouat	Miel de Ain Oussera
10	90	+++	+++	+++	+++	+++
11	89	+++	+++	+++	+++	+++
12	88	+++	+++	+++	+++	+++
13	87	+++	++	+++	+++	+++
14	86	+++	++	+++	+++	+++
15	85	+++	++	+++	+++	+++
16	84	+++	+++	+++	+++	+++
17	83	++	+++	+++	+++	+++
18	82	++	+++	+++	+++	+++
19	81	++	++	+++	+++	+++
20	80	++	+	+++	+++	+++
21	79	+	+	+++	+++	+++
22	78	+	+	+++	++	+++
<b>23</b>	77	+	<b>CMI</b>	+++	++	+++
24	76	+	-	++	++	++
<b>25</b>	75	<b>CMI</b>	-	++	++	++
26	74	-	-	+	+	++
27	73	-	-	+	+	++
28	72	-	-	+	+	++
<b>29</b>	71	-	-	+	<b>CMI</b>	++
<b>30</b>	70	-	-	<b>CMI</b>	-	<b>CMI</b>

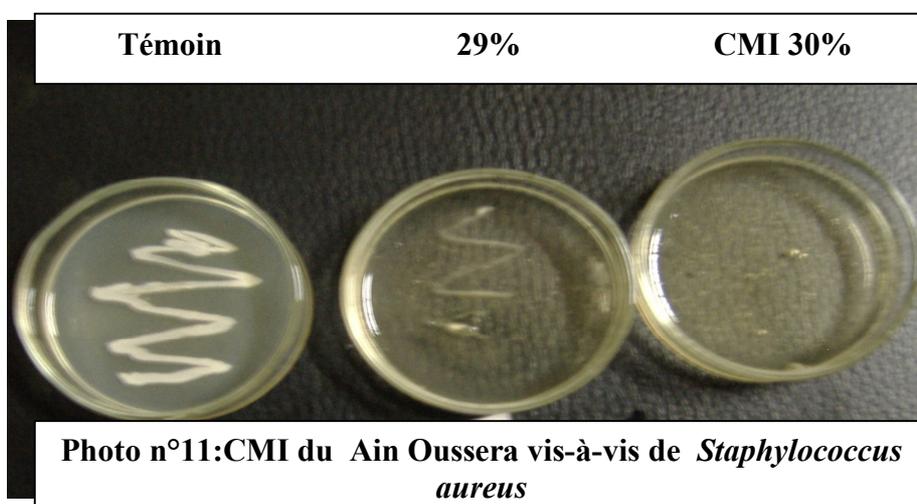
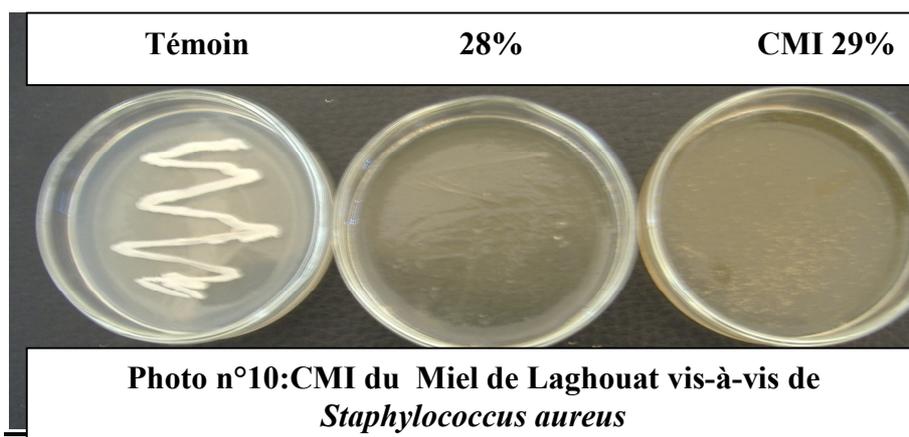
+++ : Croissance abondante

++ : Croissance moyenne

+ : Croissance faible

- : Inhibition





### III.8.1. Analyses des corrélations entre les paramètres physico-chimiques des miels Et les CMI vis -a -vis *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°17:** Corrélation entre les CMI et pH :

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	2,917	df=3	p=,40466
Chi <sup>2</sup> du MV	3,958	df=3	p=,26609
R de Spearman	,148	t=,25935	p=,81214

**Tableau n°18:** Corrélation entre les CMI et HMF :

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	-,205	t=-,3631	p=,74058

**Tableau n°19:** Corrélation entre les CMI et La teneur en l'eau :

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	,051	t=,08897	p=,93471

**Tableau n°20:** Corrélation entre les CMI et L'indice de diastase:

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	-,872	t=-3,087	p=,05385

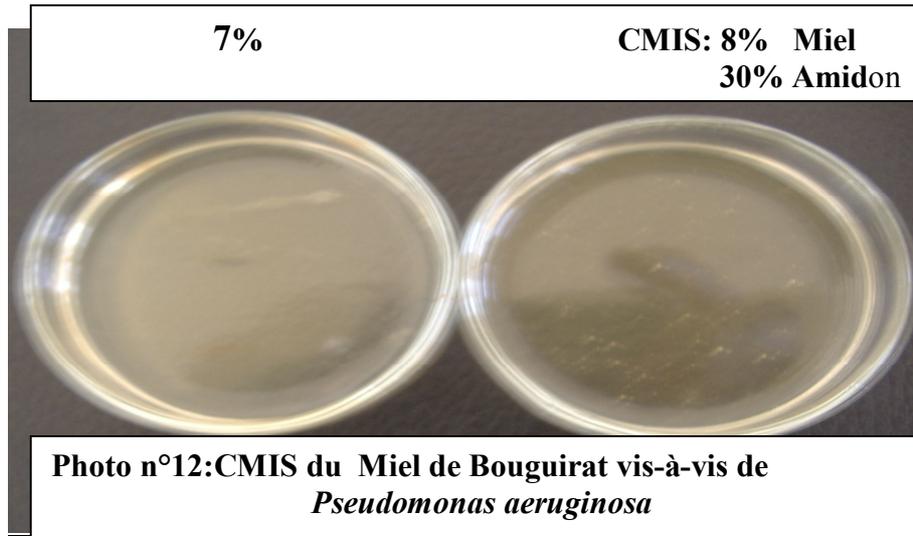
### III.9 Valeurs des concentrations minimales inhibitrices synergiques vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°21:** Valeurs des CIS vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Bouguirat.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
14	0,70	1	0,05	85	4,25	+
<b>14</b>	0,70	<b>2</b>	0,1	84	4,20	<b>IS</b>
13	0,65	2	0,1	85	4,25	+
<b>13</b>	0,65	<b>4</b>	0,2	83	4,15	<b>IS</b>
<b>13</b>	0,65	<b>5</b>	0,25	82	4,10	<b>IS</b>
<b>12</b>	0,60	<b>5</b>	0,25	83	4,15	<b>IS</b>
<b>11</b>	0,55	<b>5</b>	0,25	84	4,20	<b>IS</b>
<b>10</b>	0,50	<b>5</b>	0,25	85	4,25	<b>IS</b>
<b>9</b>	0,45	<b>5</b>	0,25	86	4,30	<b>IS</b>
8	0,40	5	0,35	87	4,35	++
8	0,40	7	0,60	85	4,25	+++
8	0,40	10	0,50	82	4,10	+++
8	0,40	12	0,75	80	4,00	+++
8	0,40	14	0,70	78	3,90	+++
8	0,40	16	0,80	76	3,80	+++
8	0,40	18	0,90	74	3,70	++
8	0,40	20	1,00	72	3,60	++
8	0,40	22	1,10	70	3,50	+
8	0,40	24	1,20	68	3,40	+
8	0,40	26	1,30	66	3,30	+
8	0,40	28	1,40	64	3,20	+
<b>8</b>	0,40	<b>30</b>	1,50	62	3,10	<b>CMIS</b>
7	0,35	30	1,50	63	3,15	+
7	0,35	32	1,60	61	3,05	+++

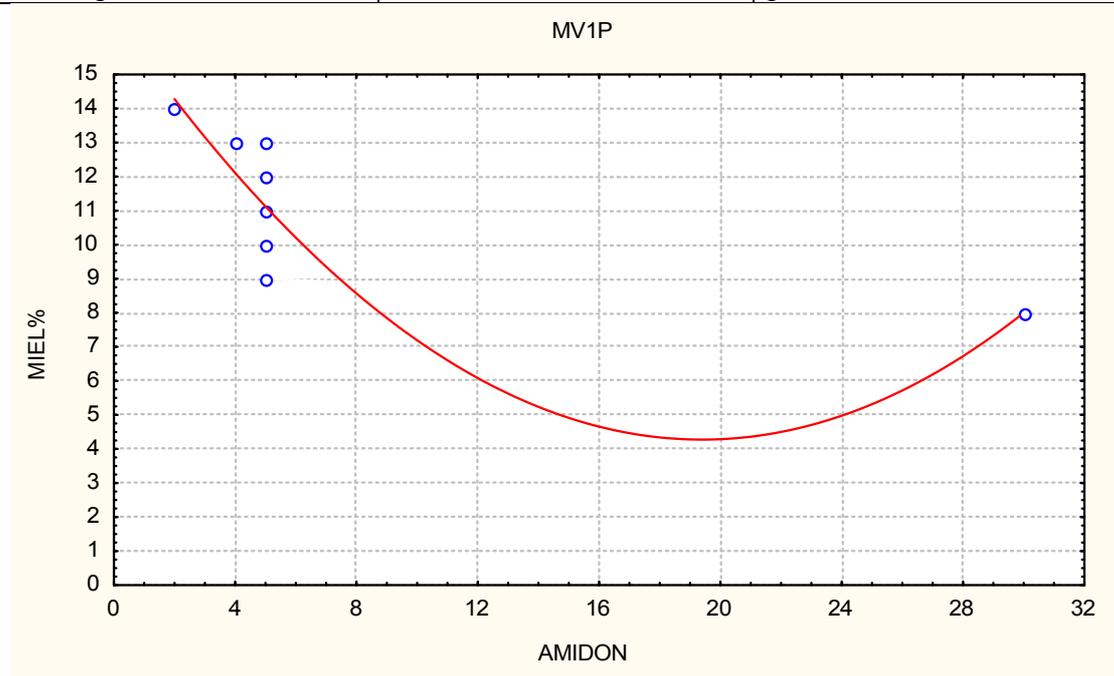
**Tableau n°22:** Les CIS de *Pseudomonas aeruginosa* par le miel de bouguirat

Miel %	14	13	13	12	11	10	9	8
Amidon %	2	4	5	5	5	5	5	30



**Tableau n°23:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Bouguirat vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	df=18	p=,37962
Chi <sup>2</sup> du MV	df=18	p=,70239
R de Spearman	T=-3,746	p=,00955**



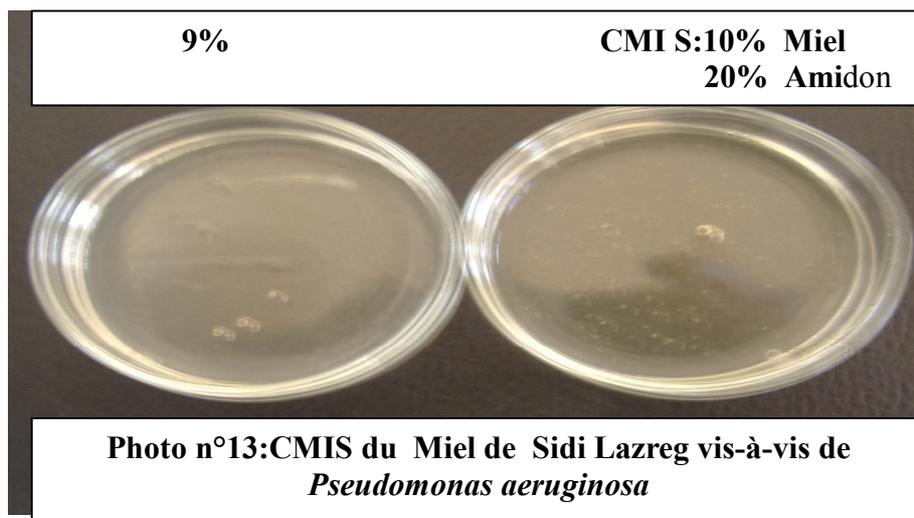
**Figure n°6:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°24:** Valeurs des CIS vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Sidi Lazreg.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
17	0,85	2	0,10	81	4,05	IS
16	0,80	2	0,10	82	4,10	+
16	0,80	3	0,15	81	4,05	IS
15	0,75	3	0,15	82	4,10	IS
12	0,6	6	0,30	82	4,10	+
12	0,6	8	0,40	80	4,00	IS
11	0,55	8	0,40	81	4,05	++
11	0,55	10	0,50	79	3,95	++
11	0,55	12	0,60	78	3,80	+
11	0,55	14	0,70	75	3,75	+
11	0,55	16	0,80	73	3,65	+
11	0,55	18	0,90	71	3,55	+
11	0,55	20	1,00	69	3,45	IS
10	0,5	20	1,00	70	3,50	CMIS
9	0,45	20	1,00	71	3,55	+
9	0,45	22	1,10	69	3,45	+
9	0,45	24	1,20	67	3,35	++
9	0,45	26	1,30	65	3,25	++
9	0,45	28	1,40	63	3,15	+++
9	0,45	30	1,50	61	3,05	+++

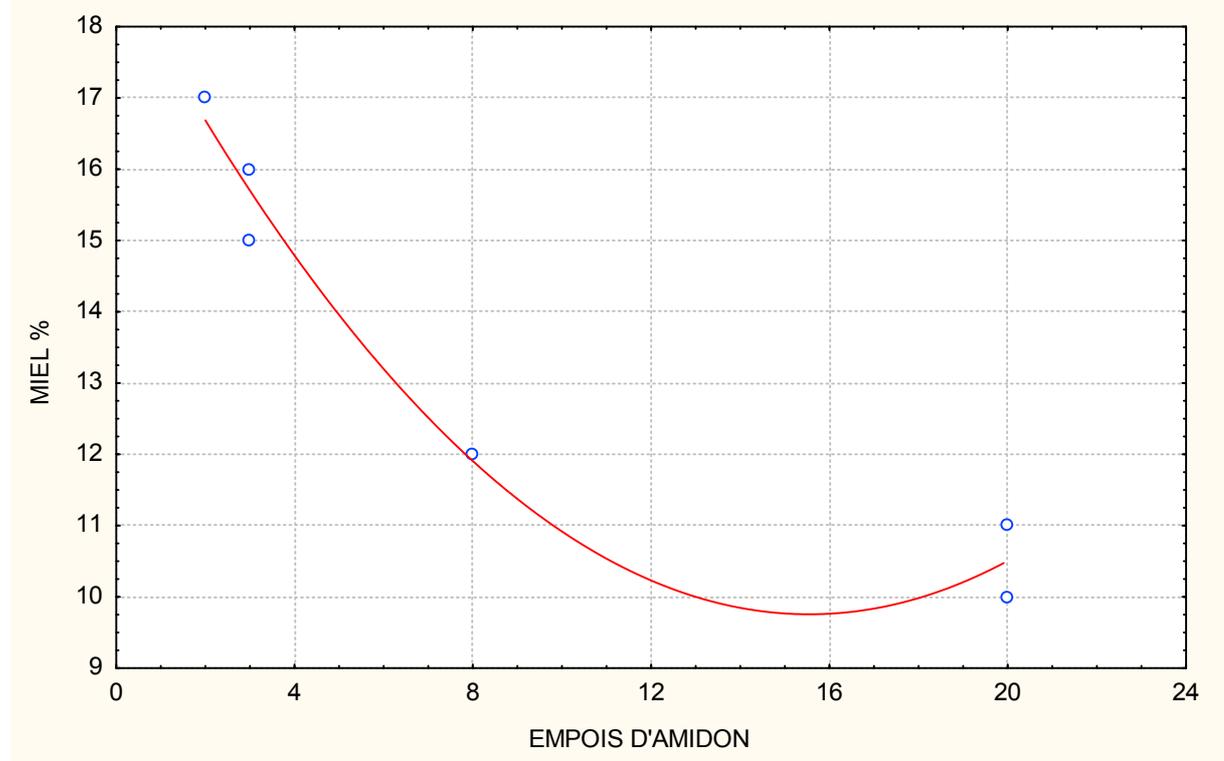
**Tableau n°25:** Les CIS de *Pseudomonas aeruginosa* par le miel de Sidi Lazreg

Miel %	17	16	15	12	11	10
Amidon %	2	3	3	8	20	20



**Tableau n°26:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Sidi Lazreg vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	18,000	df=15	p=,26269
Chi <sup>2</sup> du MV	15,956	df=15	p=,38500
R de Spearman	-,971	t=-8,124	p=,00125



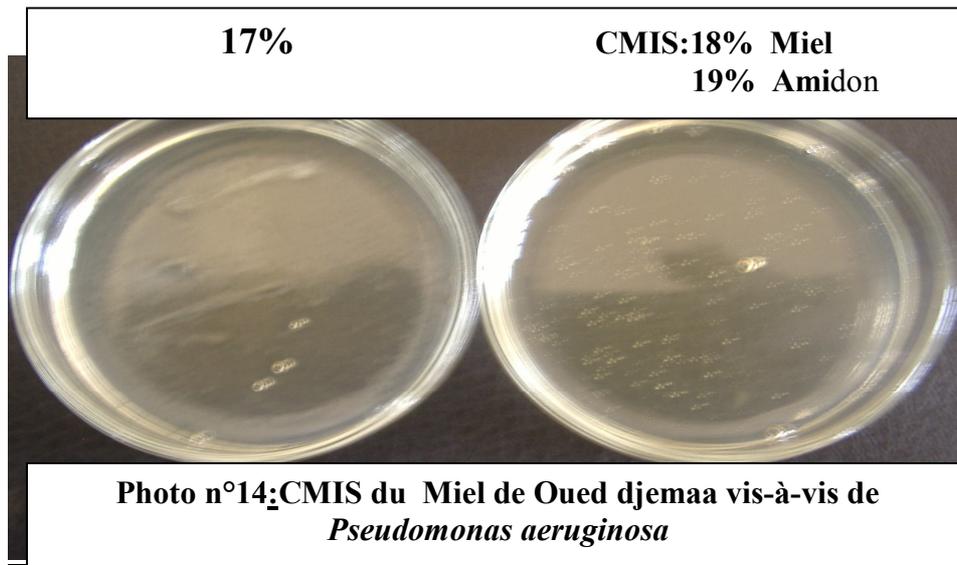
**Figure n°7:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°27:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel Oued Djemaa

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
25	1,25	1	0,05	74	3,70	+++
25	1,25	4	0,20	71	3,55	++
<b>25</b>	1,25	<b>5</b>	0,25	70	3,50	<b>IS</b>
24	1,20	5	0,25	71	3,55	+--
<b>24</b>	1,20	<b>6</b>	0,30	70	3,50	<b>IS</b>
<b>23</b>	1,15	<b>6</b>	0,30	71	3,55	<b>IS</b>
<b>22</b>	1,10	<b>6</b>	0,30	72	3,60	<b>IS</b>
<b>21</b>	1,05	<b>6</b>	0,30	73	3,65	<b>IS</b>
<b>20</b>	1,00	<b>6</b>	0,30	74	3,70	<b>IS</b>
19	0,95	6	0,30	75	3,75	+
<b>19</b>	0,95	<b>8</b>	0,40	73	3,65	<b>IS</b>
18	0,90	8	0,40	74	3,70	+
18	0,90	10	0,50	72	3,60	++
18	0,90	12	0,60	70	3,50	+
18	0,90	14	0,70	68	3,40	++
18	0,90	16	0,80	66	3,30	++
18	0,90	18	0,90	64	3,20	+
<b>18</b>	0,90	<b>19</b>	0,95	63	3,15	<b>CMIS</b>
18	0,90	20	1,00	62	3,10	+
17	0,85	20	1,00	63	3,15	+
17	0,85	22	1,10	61	3,05	+
17	0,85	24	1,20	59	2,95	++
17	0,85	26	1,30	57	2,85	+++
17	0,85	28	1,40	55	2,75	+++
17	0,85	30	1,50	53	2,65	+++

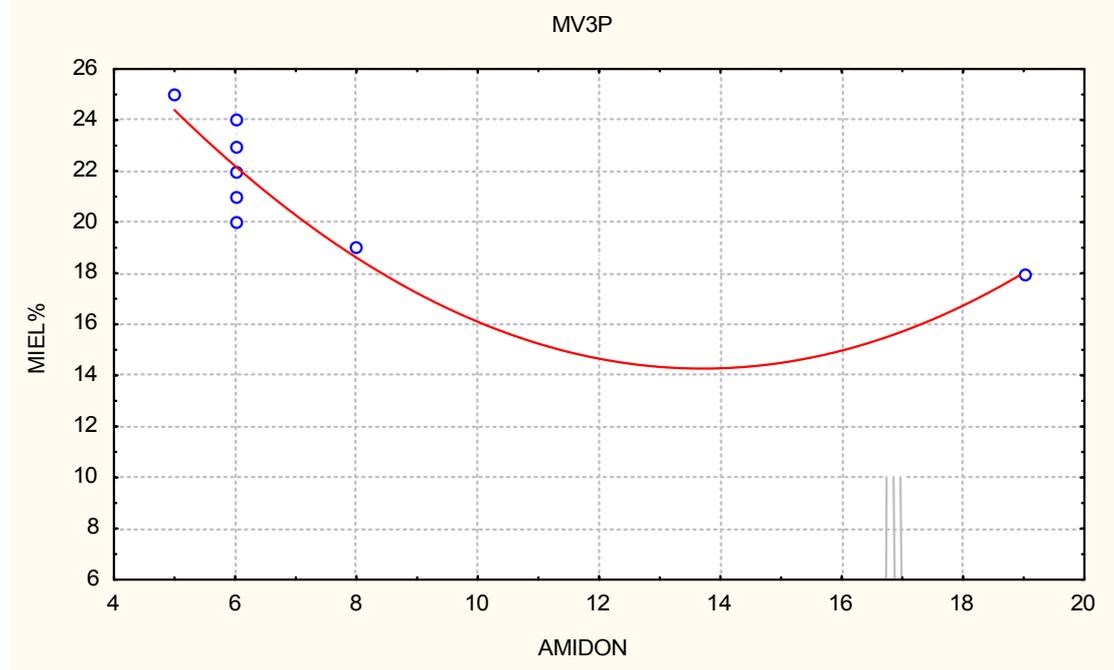
**Tableau n°28:** Les CIS de *Pseudomonas aeruginosa* par le miel de Oued Djemaa

Miel %	25	24	23	22	21	20	19	18
Amidon %	5	6	6	6	6	6	8	19



**Tableau n°29:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Oued Djemaa vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	24,000	df=21	p=,29309
Chi <sup>2</sup> du MV	17,177	df=21	p=,70033
R de Spearman	-,873	t=-4,382	p=,00466



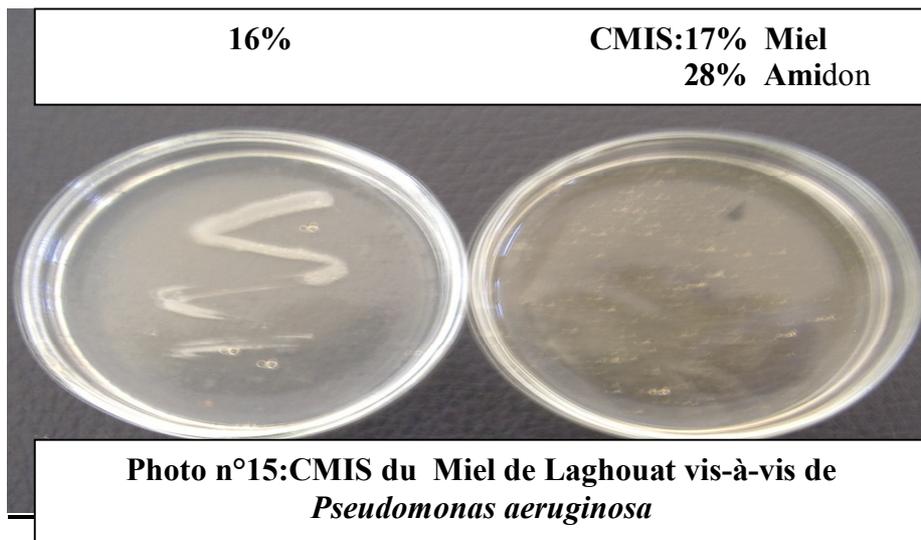
**Figure n°8:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°30:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Laghouat.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
24	1,20	2	0,10	74	3,70	+
<b>24</b>	1,20	<b>3</b>	0,15	73	3,65	<b>IS</b>
23	1,15	3	0,15	74	3,70	+
<b>23</b>	1,15	<b>4</b>	0,20	73	3,65	<b>IS</b>
22	1,10	4	0,20	74	3,70	+
<b>22</b>	1,10	<b>5</b>	0,25	73	3,65	<b>IS</b>
<b>21</b>	1,05	<b>5</b>	0,25	74	3,70	<b>IS</b>
<b>20</b>	1,00	<b>5</b>	0,25	75	3,75	<b>IS</b>
18	0,90	7	0,35	75	3,75	+
18	0,90	10	0,50	72	3,60	++
18	0,90	12	0,60	70	3,50	+
18	0,90	14	0,70	68	3,40	+
18	0,90	16	0,80	66	3,30	+
18	0,90	18	0,90	64	3,20	+
<b>18</b>	0,90	<b>20</b>	1,00	62	3,10	<b>IS</b>
17	0,85	20	1,00	63	3,15	+
17	0,85	24	1,20	59	2,95	++
17	0,85	26	1,30	57	2,85	++
<b>17</b>	0,85	<b>28</b>	1,40	55	2,75	<b>CMIS</b>
16	0,80	28	1,40	56	2,80	++
16	0,80	30	1,50	54	2,70	+++
16	0,80	32	1,60	52	2,60	+++

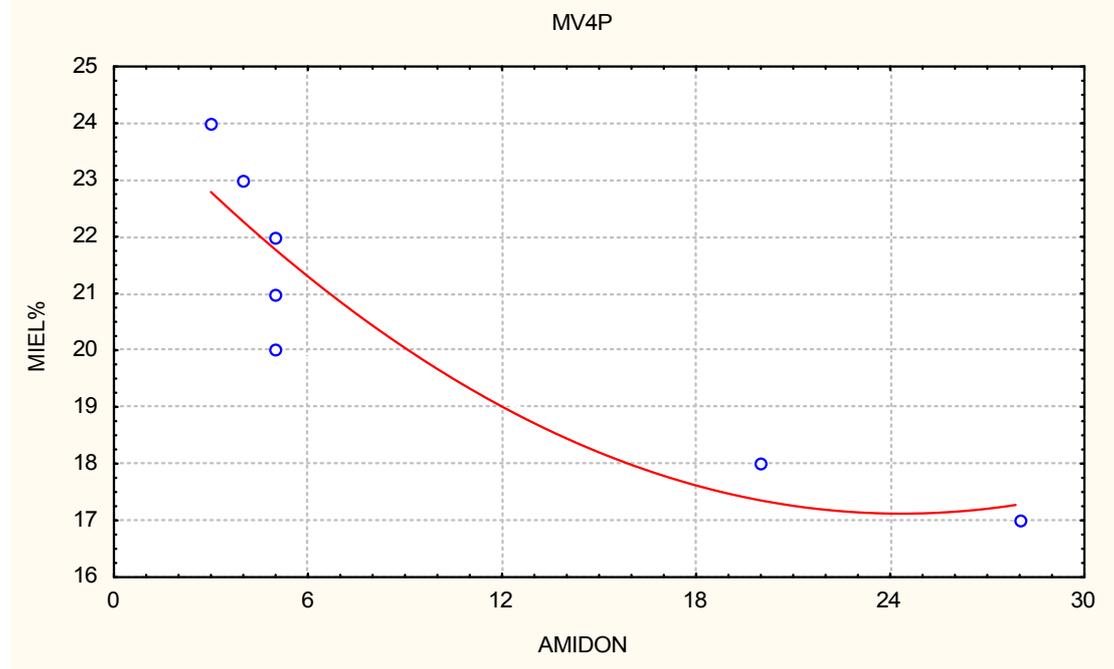
**Tableau n°31:** Les CIS de *Pseudomonas aeruginosa* par le miel de Laghouat

Miel %	24	23	22	21	20	18	17
Amidon %	3	4	5	5	5	20	28



**Tableau n°32:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Laghouat vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	24,000	df=21	p=,29309
Chi <sup>2</sup> du MV	17,177	df=21	p=,70033
R de Spearman	-,873	t=-4,382	p=,00466



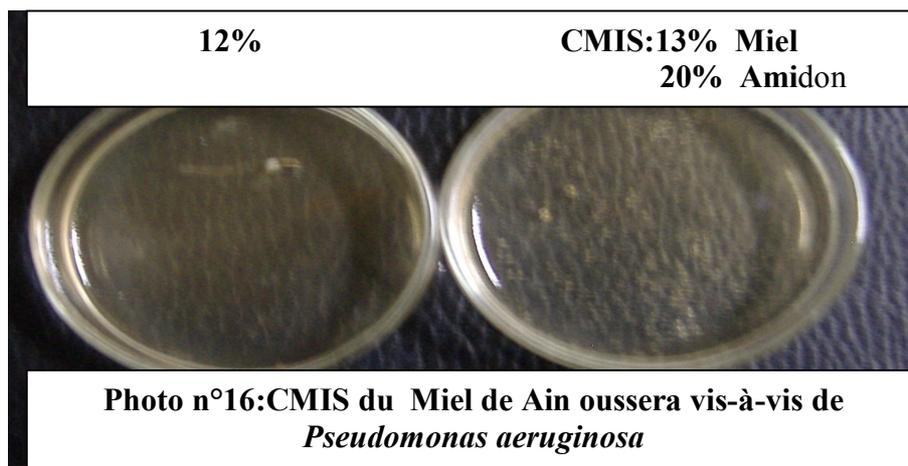
**Figure n°9:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°33:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Ain oussera.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
21	1,05	1	0,05	78	3,90	++
21	1,05	2	0,10	77	3,85	+
21	1,05	3	0,15	76	3,80	+
<b>21</b>	1,05	<b>4</b>	0,20	75	3,75	<b>IS</b>
<b>20</b>	1,00	<b>4</b>	0,20	76	3,80	<b>IS</b>
<b>19</b>	9,50	<b>4</b>	0,20	77	3,85	<b>IS</b>
<b>18</b>	0,9	<b>4</b>	0,20	78	3,90	<b>IS</b>
17	8,50	4	0,20	79	3,95	+
17	8,50	5	0,25	78	3,90	+
<b>17</b>	8,50	<b>6</b>	0,30	77	3,85	<b>IS</b>
<b>16</b>	0,80	<b>6</b>	0,30	78	3,90	<b>IS</b>
15	7,50	6	0,30	79	3,95	+
15	7,50	8	0,40	77	3,85	+
<b>15</b>	7,50	<b>10</b>	0,50	75	3,75	<b>IS</b>
14	0,7	10	0,50	76	3,80	+
14	0,7	12	0,60	74	3,70	++
<b>14</b>	0,7	<b>16</b>	0,80	70	3,50	<b>IS</b>
13	0,65	16	0,80	71	3,55	+
13	0,65	18	0,90	69	3,45	+
<b>13</b>	0,65	<b>20</b>	1,00	67	3,35	<b>CMIS</b>
12	0,6	20	1,00	68	3,90	+
12	0,60	22	1,10	66	3,30	+
12	0,60	24	1,20	64	3,20	++
12	0,60	26	1,30	62	3,10	++
12	0,60	28	1,40	60	3,00	++
12	0,60	30	1,50	58	2,90	+++
12	0,60	32	1,60	56	2,80	+++

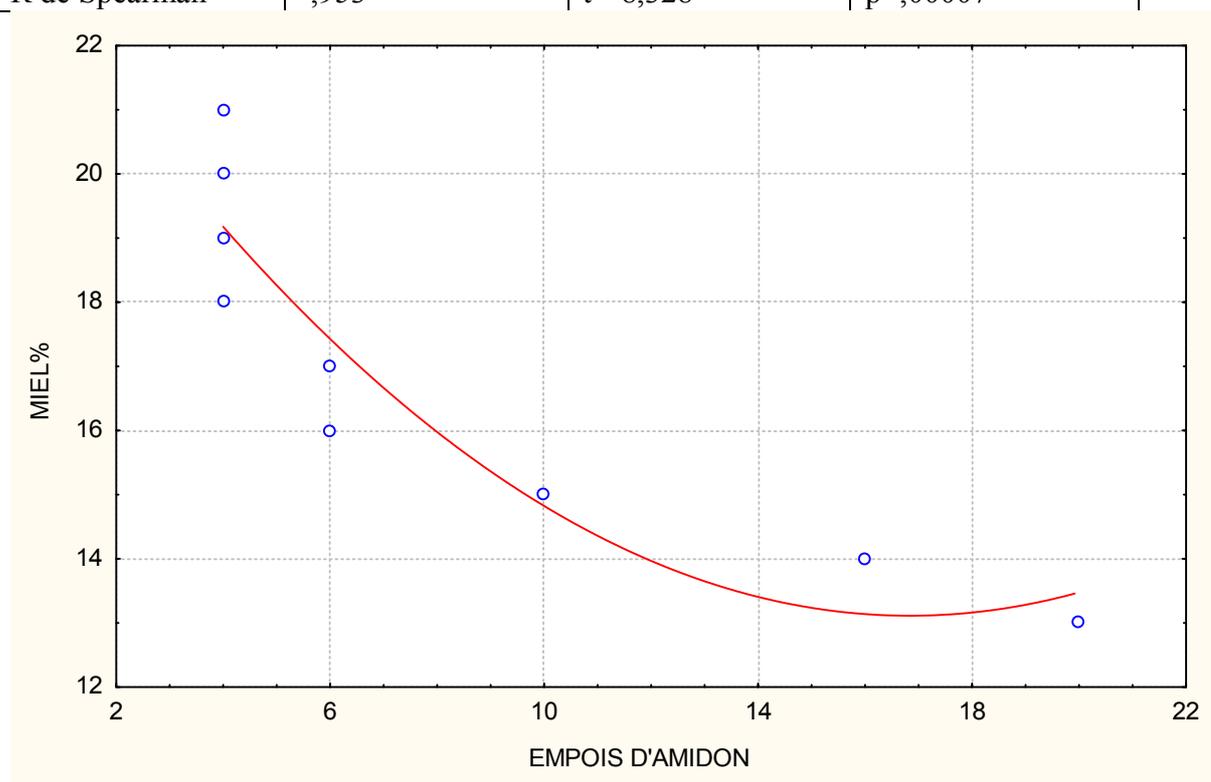
**Tableau n°34:** Les CIS de *Pseudomonas aeruginosa* par le miel de Ain Oussera

Miel %	21	20	19	18	17	16	15	14	13
Amidon %	4	4	4	4	6	6	10	16	20



**Tableau n°35:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Ain Oussera vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	36,000	df=32	p=,28670
Chi <sup>2</sup> du MV	25,687	df=32	p=,77725
R de Spearman	-,953	t=-8,328	p=,00007



**Figure n°10:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°36:** Corrélation entre les CMIS et l'indice de diastase vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24244
Chi <sup>2</sup> du MV	13,512	df=12	p=,34512
R de Spearman	,821	t=2,4887	p=,075902

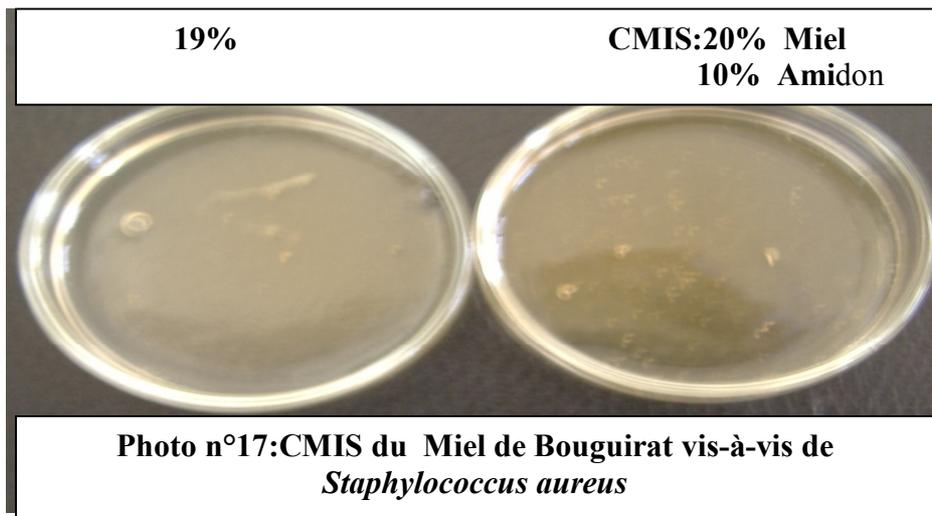
### III.10. Valeurs des concentrations minimales inhibitrices synergiques vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°37:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Bouguirat.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
24	1,20	1	0,05	75	3,75	+
24	1,20	2	0,10	74	3,70	+
<b>24</b>	1,20	<b>3</b>	0,15	73	3,65	<b>IS</b>
<b>23</b>	1,15	<b>3</b>	0,15	74	3,70	<b>IS</b>
22	1,10	3	0,15	75	3,75	+
<b>22</b>	1,10	<b>5</b>	0,25	73	3,65	<b>IS</b>
21	1,05	5	0,25	74	3,70	+
21	1,05	6	0,30	73	3,65	+
<b>21</b>	1,05	<b>8</b>	0,40	71	3,55	<b>IS</b>
20	1,00	5	0,25	75	3,75	+
20	1,00	8	0,40	72	3,60	+
<b>20</b>	1,00	<b>10</b>	0,50	70	3,50	<b>CMIS</b>
19	0,95	10	0,50	71	3,55	+
19	0,95	12	0,60	69	3,45	+
19	0,95	14	0,70	67	3,35	++
19	0,95	16	0,80	65	3,25	++
19	0,95	18	0,90	63	3,15	++
19	0,95	20	1,00	61	3,05	++
19	0,95	22	1,10	59	2,95	++
19	0,95	24	1,20	57	2,85	++
19	0,95	26	1,30	55	2,75	++
19	0,95	28	1,40	53	2,65	++
19	0,95	30	1,50	51	2,55	++

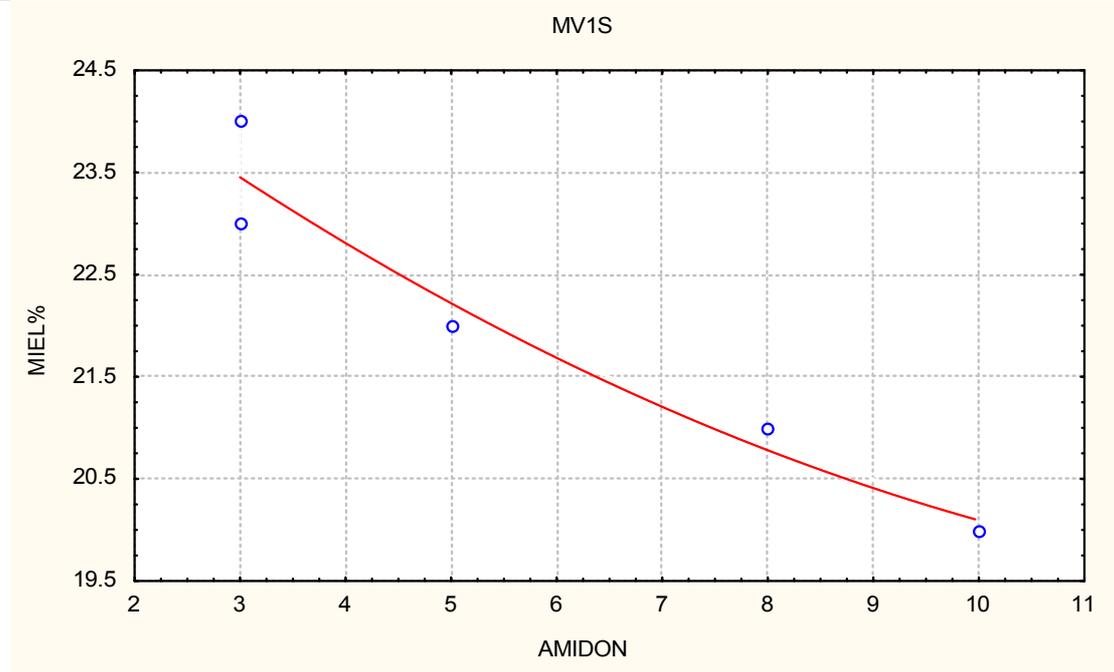
**Tableau n°38:** Les CIS de *Staphylococcus aureus* par le miel de Bouguirat

Miel %	24	23	22	21	20
Amidon %	3	3	5	8	10



**Tableau n°39:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Bouguirat vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	-,975	t=-7,550	p=,00482



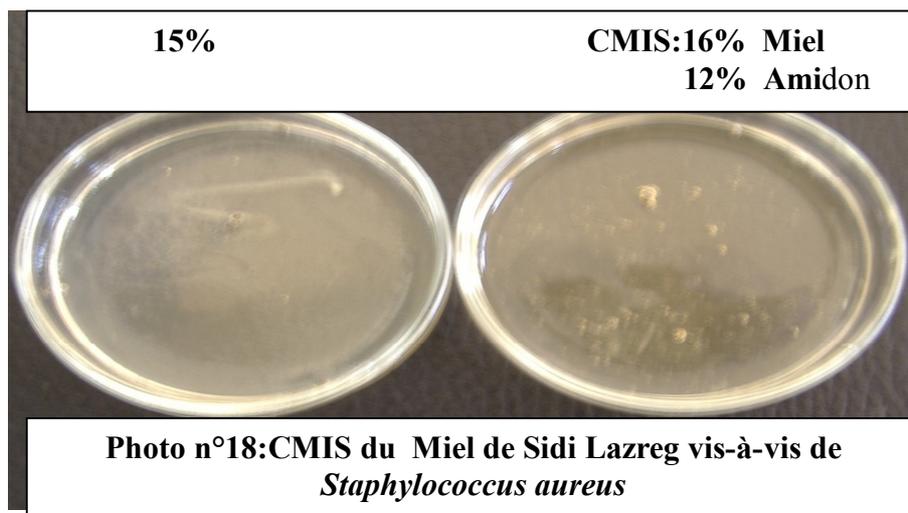
**Figure n°11:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°40:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Sidi Lazreg.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
22	1,10	1	0,05	77	3,85	+
<b>22</b>	1,10	<b>2</b>	0,10	76	3,80	<b>IS</b>
21	1,05	2	0,10	77	3,85	+
<b>21</b>	1,05	<b>3</b>	0,15	76	3,80	<b>IS</b>
<b>20</b>	1,00	<b>3</b>	0,15	77	3,85	<b>IS</b>
19	0,95	3	0,15	78	3,90	+
19	0,95	4	0,20	77	3,85	+
<b>19</b>	0,95	<b>5</b>	0,25	76	3,80	<b>IS</b>
18	0,90	5	0,25	77	3,85	+
18	0,90	6	0,30	76	3,80	+
18	0,90	8	0,4	74	3,70	+
18	0,90	10	0,5	72	3,60	+
<b>18</b>	0,90	<b>12</b>	0,6	70	3,50	<b>IS</b>
<b>17</b>	0,85	<b>12</b>	0,6	71	3,55	<b>IS</b>
<b>16</b>	0,80	<b>12</b>	0,6	72	3,60	<b>CMIS</b>
15	0,75	12	0,6	73	3,65	+
15	0,75	14	0,70	71	3,55	++
15	0,75	16	0,80	69	3,45	++
15	0,75	18	0,90	67	3,35	++
15	0,75	20	1,00	65	3,25	++
15	0,75	22	1,10	63	3,15	++
15	0,75	24	1,20	61	3,05	++
15	0,75	26	1,30	59	2,95	++
15	0,75	28	1,40	57	2,85	++
15	0,75	30	1,50	55	2,75	++

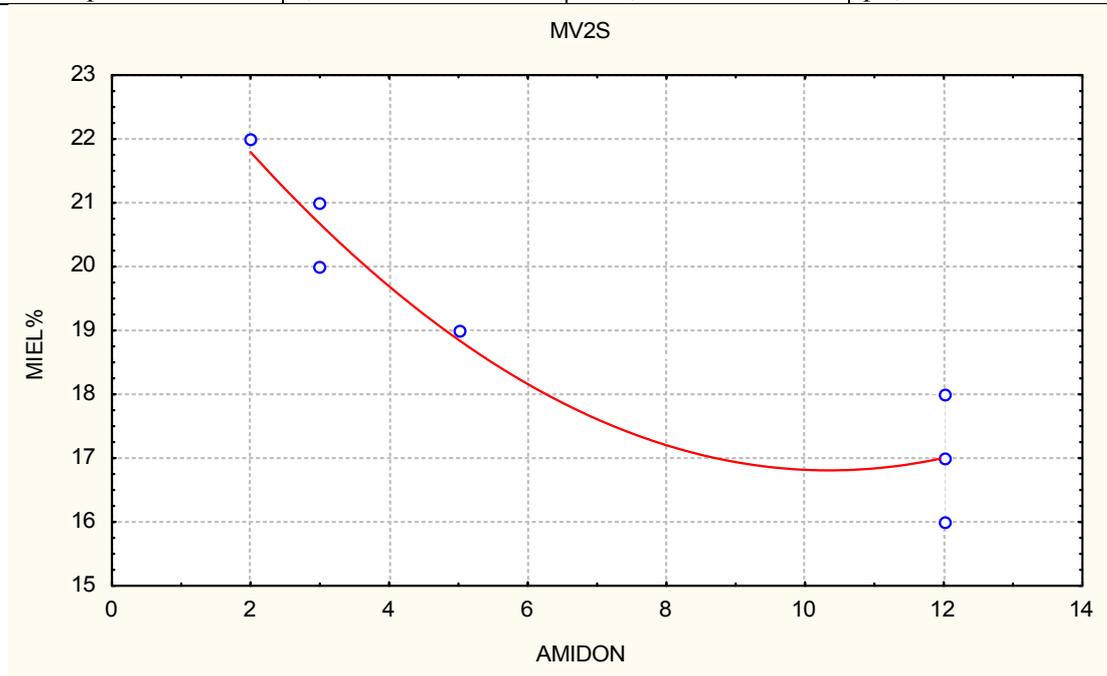
**Tableau n°41:** Les CIS de *Staphylococcus aureus* par le miel de Sidi Lazreg

Miel %	22	21	20	19	18	17	16
Amidon %	2	3	3	5	12	12	12



**Tableau n°42:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Sidi Lazreg vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	15,000	df=12	p=,24146
Chi <sup>2</sup> du MV	13,322	df=12	p=,34611
R de Spearman	-,975	t=-7,550	p=,00482



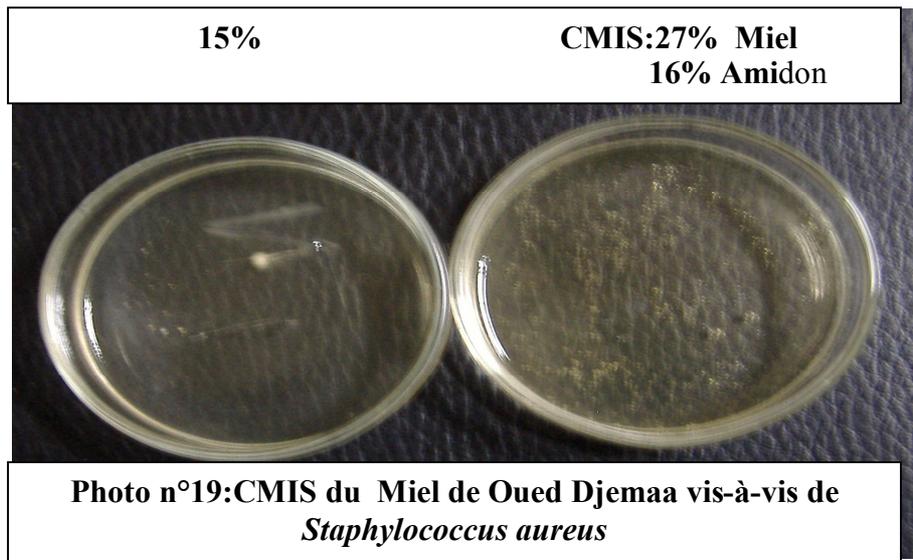
**Figure n°12:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°43:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Oued Djema

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
29	1,45	1	0,05	70	3,50	++
29	1,45	2	0,10	69	3,45	+
29	1,45	3	0,15	68	3,40	+
29	1,45	4	0,20	67	3,35	+
<b>29</b>	1,45	<b>5</b>	0,25	66	3,30	<b>IS</b>
28	1,40	5	0,25	67	3,35	++
28	1,40	6	0,30	66	3,30	++
28	1,40	7	0,35	65	3,25	++
28	1,40	8	0,40	64	3,20	++
28	1,40	9	0,45	63	3,15	++
28	1,40	10	0,50	62	3,10	+
28	1,40	11	0,55	61	3,05	+
<b>28</b>	1,40	<b>12</b>	0,60	60	3,00	<b>IS</b>
27	1,35	12	0,60	61	3,05	+
27	1,35	13	0,65	60	3,00	++
27	1,35	14	0,70	59	2,95	++
27	1,35	15	0,75	58	2,90	++
<b>27</b>	1,35	<b>16</b>	0,80	57	2,85	<b>CMIS</b>
26	1,30	16	0,80	58	2,90	+
26	1,30	17	0,85	57	2,85	+
26	1,30	18	0,90	56	2,80	+
26	1,30	19	0,95	55	2,75	+
26	1,30	20	1,00	54	2,70	+
26	1,30	21	1,05	53	2,65	+
26	1,30	22	1,10	52	2,60	+
26	1,30	23	1,15	51	2,55	+
26	1,30	24	1,20	50	2,50	+
26	1,30	25	1,25	49	2,45	+
26	1,30	26	1,30	48	2,40	+
26	1,30	27	1,35	47	2,35	+
26	1,30	28	1,40	46	2,30	+
26	1,30	29	1,45	45	2,25	+
26	1,30	30	1,50	44	2,20	+

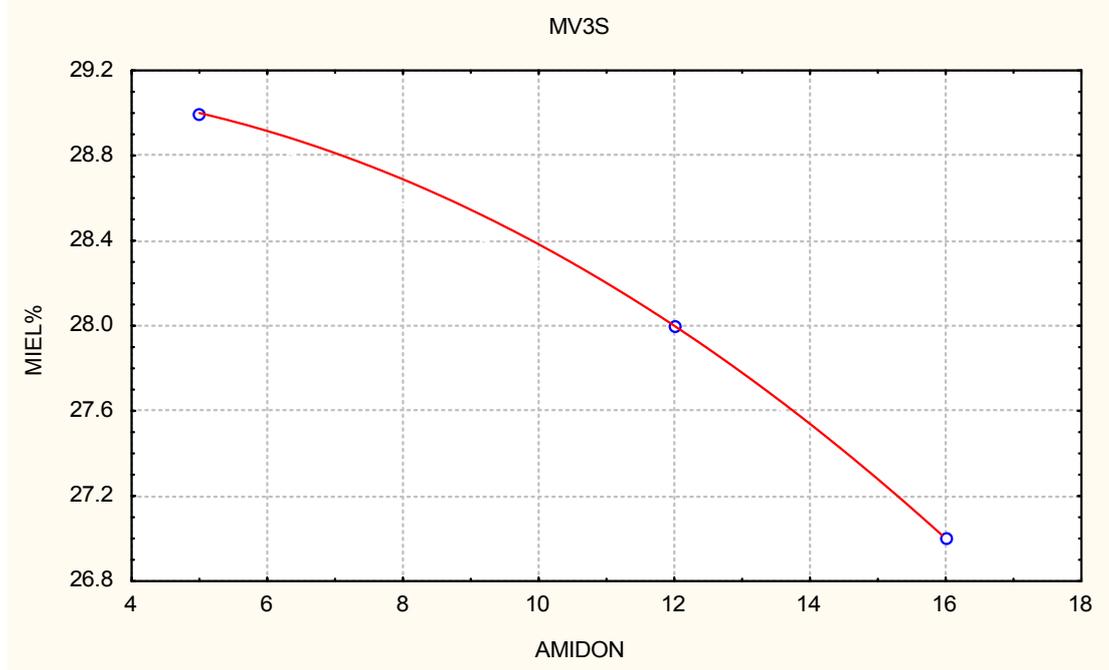
**Tableau n°44:** Les CIS de *Staphylococcus aureus* par le miel de Oued Djema

Miel %	29	28	27
Amidon %	5	12	16



**Tableau n°45:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Oued Djemaa vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	21,000	df=9	p=,01266
Chi <sup>2</sup> du MV	16,152	df=9	p=,06378
R de Spearman	,826	t=3,2778	p=,02201



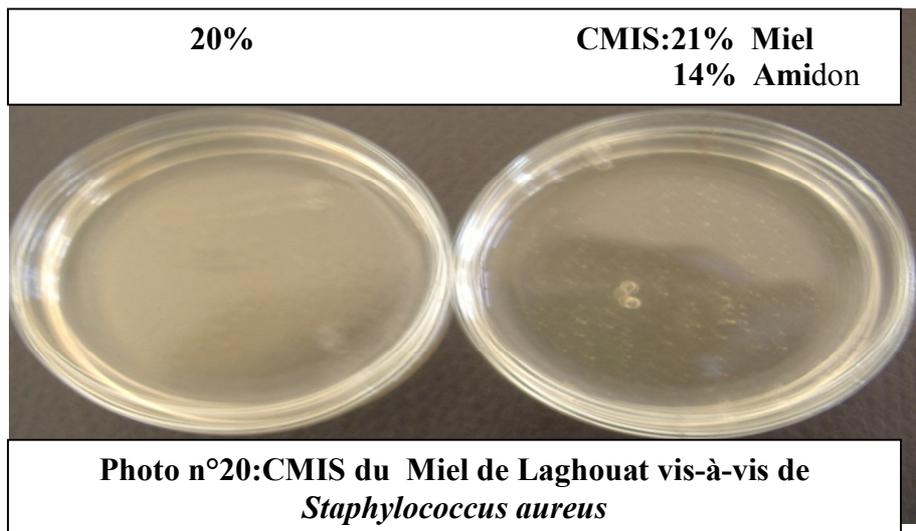
**Figure n°13:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°46:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Laghouat.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
28	1,40	1	0,05	71	3,55	+
28	1,40	2	0,10	70	3,50	+
<b>28</b>	1,40	<b>3</b>	0,15	69	3,45	<b>IS</b>
<b>27</b>	1,35	<b>3</b>	0,15	70	3,50	<b>IS</b>
26	1,30	3	0,15	71	3,55	+
<b>26</b>	1,30	<b>4</b>	0,20	70	3,50	IS
<b>25</b>	1,25	<b>4</b>	0,20	71	3,55	IS
24	1,20	4	0,20	72	3,60	+
24	1,20	6	0,30	70	3,50	++
24	1,20	8	0,40	68	3,40	++
24	1,20	10	0,50	66	3,30	++
<b>24</b>	1,20	<b>12</b>	0,60	64	3,20	<b>IS</b>
<b>23</b>	1,15	<b>12</b>	0,60	65	3,25	<b>IS</b>
22	1,10	12	0,40	66	3,30	+
<b>22</b>	1,01	<b>14</b>	0,70	64	3,20	<b>IS</b>
<b>21</b>	1,05	<b>14</b>	0,70	65	3,25	<b>CMIS</b>
21	1,05	16	0,80	63	3,15	+
21	1,00	18	0,90	61	3,05	+
21	1,00	20	1,00	59	2,95	+
21	1,00	22	1,10	57	2,85	+
21	0,95	24	1,20	55	2,75	+
21	0,95	26	1,30	53	2,65	+
21	0,95	28	1,40	51	2,55	+
21	0,95	30	1,50	49	2,45	++

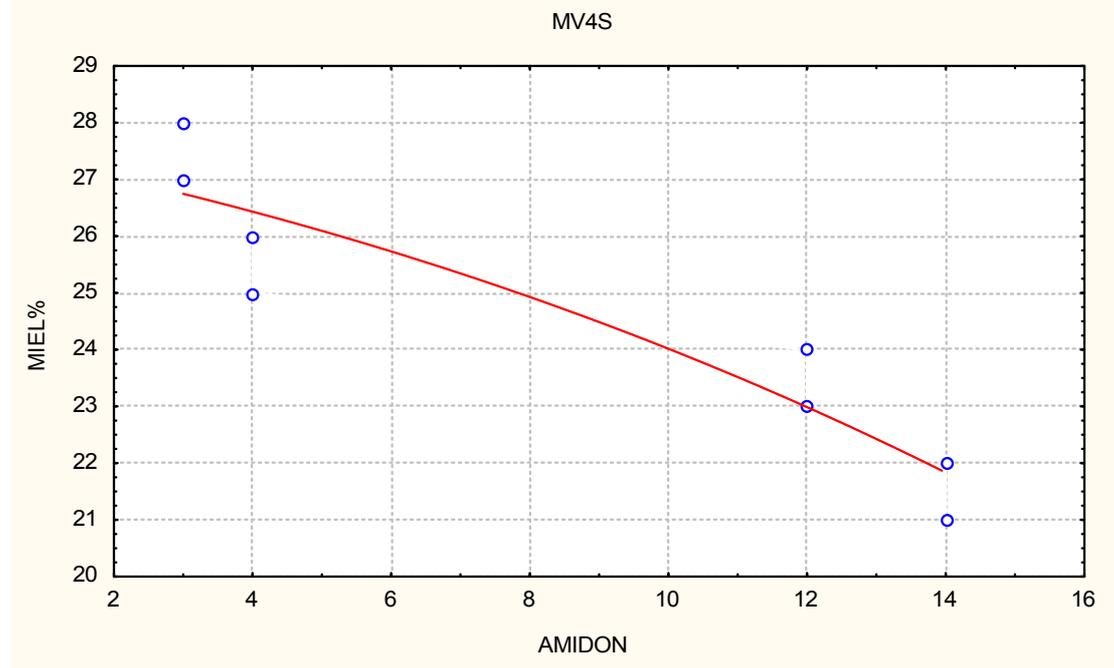
**Tableau n°47:** Les CIS de *Staphylococcus aureus* par le miel de Laghouat

Miel %	28	27	26	25	24	23	22	21
Amidon %	3	3	4	4	12	12	14	14



**Tableau n°48:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Laghouat vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	21,000	df=9	p=,01266
Chi <sup>2</sup> du MV	16,152	df=9	p=,06378
R de Spearman	,826	t=3,2778	p=,02201



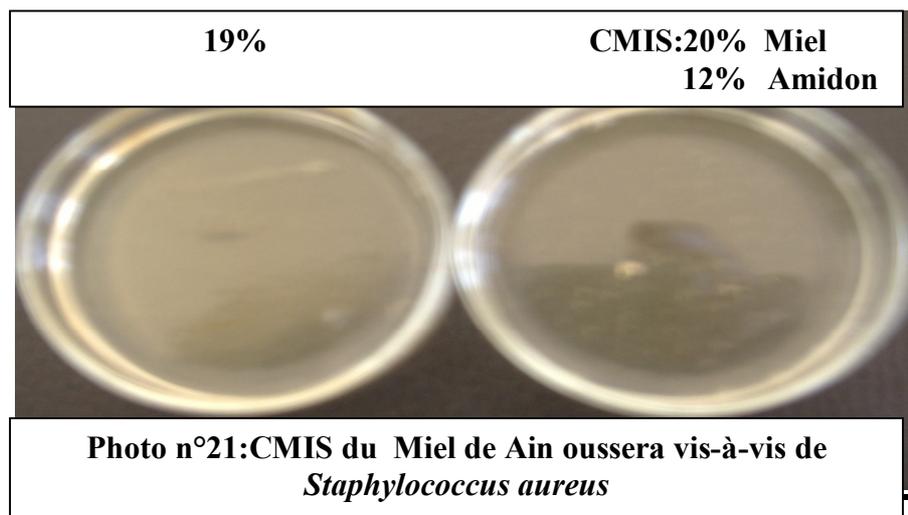
**Figure n°14:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

**Tableau n°49:** Valeurs des IS vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* obtenues par l'addition d'empois d'amidon au miel de Ain oussera.

Miel %	Miel (ml)	Amidon %	Amidon (ml)	Gélose %	Gélose (ml)	Résultat
29	1,45	1	0,05	70	3,50	+
29	1,45	2	0,10	69	3,45	+
29	1,45	3	0,15	68	3,40	+
<b>29</b>	1,45	<b>4</b>	0,20	67	3,35	<b>IS</b>
<b>28</b>	1,40	<b>4</b>	0,20	68	3,40	<b>IS</b>
27	1,35	4	0,20	69	3,45	+
<b>27</b>	1,35	<b>5</b>	0,25	68	3,40	<b>IS</b>
<b>26</b>	1,30	<b>5</b>	0,25	69	3,45	<b>IS</b>
<b>25</b>	1,25	<b>5</b>	0,25	70	3,50	<b>IS</b>
24	1,20	5	0,25	71	3,55	+
24	1,20	6	0,30	70	3,50	+
<b>24</b>	1,20	<b>7</b>	0,35	69	3,45	<b>IS</b>
<b>23</b>	1,15	<b>7</b>	0,35	70	3,50	<b>IS</b>
<b>22</b>	1,10	<b>7</b>	0,35	71	3,55	<b>IS</b>
21	1,05	7	0,35	72	3,60	+
21	1,05	8	0,40	71	3,55	+
21	1,05	10	0,50	69	3,45	+
<b>21</b>	1,05	<b>12</b>	0,60	67	3,35	<b>IS</b>
<b>20</b>	1,00	<b>12</b>	0,60	68	3,40	<b>CMIS</b>
19	0,95	12	0,60	69	3,45	+
19	0,95	14	0,70	67	3,35	+
18	0,90	14	0,70	68	3,40	+
17	0,85	14	0,70	69	3,45	+
17	0,85	16	0,80	67	3,35	+
17	0,85	18	0,90	65	3,25	+
17	0,85	20	1,00	63	3,15	++-
17	0,85	22	1,10	61	3,05	+++
17	0,85	24	1,20	59	2,95	+++
17	0,85	26	1,30	57	2,85	+++
17	0,85	28	1,40	55	2,75	+++
17	0,85	30	1,5	53	2,65	+++

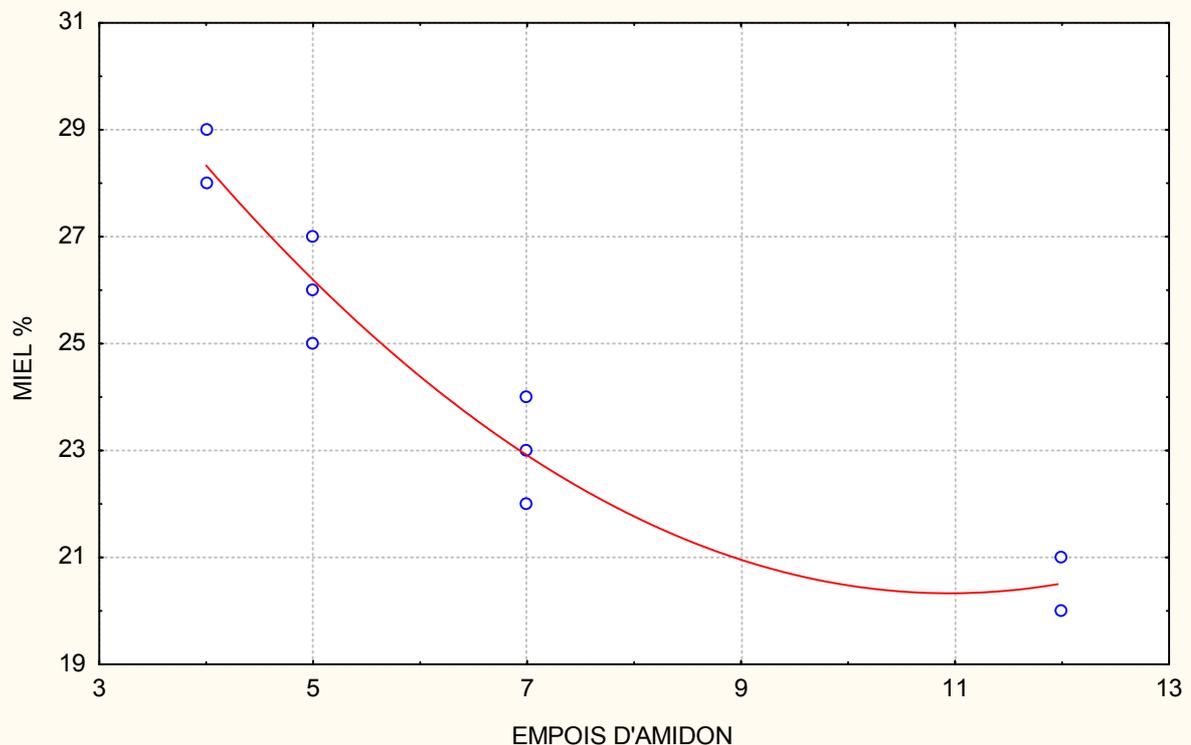
**Tableau n°50:** Les CIS de *Staphylococcus aureus* par le miel de Ain Oussera

Miel %	29	28	27	26	25	24	23	22	21	20
Amidon %	4	4	5	5	5	7	7	7	12	12



**Tableau n°51:** Corrélation négative de l'effet synergique de l'empois d'amidon sur l'action antibactérienne du miel de Ain Oussera vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	30,000	df=27	p=,31419
Chi <sup>2</sup> du MV	27,323	df=27	p=,44648
R de Spearman	-,969	t=-11,14	p=,00000



**Figure n°15:** Ajustement exponentiel négatif représente l'évaluation de l'inhibition Synergétique vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

### III.10.1. Ccorrélation entre les CMIS et l'indice de diastase vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*...

**Tableau n°52:** Analyse statistique (corrélation entre les CMIS et l'indice de diastase

Vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

Chi <sup>2</sup>	dl	p	
Chi <sup>2</sup> de Pearson	10,000	df=8	p=,26704
Chi <sup>2</sup> du MV	9,503	df=8	p=,30269
R de Spearman	,224	t=,39736	p=,767689

### III.11. Test confirmatif à l'eau distillée:

Toutes les boîtes de pétri inoculées, et aux différentes concentrations; que ce soit avec *P.aeruginosa* ou *S.aureus* présentaient une croissance.

### III.12. Test confirmatif à l'amidon ;

De même il y avait une croissance dans tous les cas.

### III.13. Calcul des concentrations inhibitrices synergiques avec une solution d'amidon à 20%

Lors de l'emploi de solution stock d'amidon à 20%, en dessous des valeurs des CMIS obtenues avec la solution stock de 10% ; toutes les boîtes de pétri inoculées présentaient une croissance.

### III.14. Calcul des concentrations inhibitrices synergiques avec une solution d'amidon à 30%

Résultats identiques à ceux de l'emploi de la solution stock de 20%

### III.15. Incubation des mélanges miel amidon pour des temps variables

Après les temps d'incubation à t = 0, t = 1h, t = 6h, t = 12h; toutes les cultures ont été positives.

## Chapitre IV Discussion

### IV.1. Paramètres physico-chimiques

#### IV.1.1. Recherche de falsification

Le miel de Frenda s'étant coloré immédiatement en rose, toutes les conditions du test étant réunies ;a été considéré comme falsifié et écarté.

#### IV.1.2. Teneur en eau

Les valeurs de la teneur en eau des cinq échantillons de miels se situent entre 14,6 et 17,0; ces valeurs concordent avec les normes du CODEX ALIMENTARIUS (2003) qui prescrit une teneur maximale de 20%.

Cependant des différences de cristallisation existent et qui sont en relation avec le rapport glucose/eau (G/E) (BOGDANOV, 2005).

-Les miels de Bouguirat, de Sidi Lazreg et de Laghouat son restés liquides durant toute la durée de notre étude.

Le miel révélant des rapports G/E inférieurs à 1,7 reste en principe plus d'une année liquide.

-Le miel de Ain Oussera avait dés l'achat présenté une cristallisation (malgré une teneur en eau identique a celle de Laghouat) sans séparation en phases.

Plus le rapport G/E est élevé, plus le miel cristallisera rapidement; avec une valeur G/E supérieure à 1,7 la cristallisation est très probable.

Le miel de Oued Djemaa avait tendance à se séparer en deux phases, la phase supérieure plus claire et, la phase inférieure plus foncée.

Quand le miel contient trop d'eau par rapport aux sucres cette eau finit par se libérer du réseau cristallin. La gravité entraîne les cristaux au fond du pot, l'eau remonte à la surface (PAUL SCHWEITZER, 2004).

#### IV.1.3. pH

Le miel présente selon sa provenance un pH moyen entre 3,2 et 4,5, cependant, certains miels ont un pH nettement plus élevé entre 5 et 6 tels que les miels de châtaigners et de miellat (BOGDANOV et BLUMER, 2001).

Les échantillons 1,2 et 3 s'inscrivaient dans les premières valeurs. Les échantillons 4 et 5 se situaient entre les deux; contiennent-ils une certaine quantité de miellat? Ou est ce une propriété intrinsèque aux miels du Sahara?

MOLAN (1992) a expliqué que la dilution du miel dans les conditions de l'expérience change ou neutralise le pH du miel entraînant ainsi un changement dans l'activité antibactérienne du miel. Il serait logique de dire que pour la méthode d'incorporation en gélose, la dispersion du miel est la conséquence d'un effet tampon plus marqué.

(RYCHURCH et DOLEZOI 1961), (LINDER 1962), (DAGHIE et al.1971) ont trouvé qu'il n'existait pas de corrélation entre l'activité antibactérienne et le niveau de pH.

#### **IV.1.4. HMF**

Teneur en HMF par ordre croissant des cinq variétés de miels:

Laghouat (non quantifié:  $1,2 < \text{HMF} \leq 3,5$ ), Ain Oussera (6,7), Sidi Lazreg (9,4), Oued Djemaa (11,5), Bouguirat (29,5).

Ces valeurs correspondaient aux normes du codex alimentarius et même dans les normes de L'UE qui sont les plus draconiennes en la matière.

Le paramètre qui –ces dernières années- a compté le plus dans le commerce international quant à la qualité du miel est la teneur en HMF (RAMIREZ CERVANTES et al. 2000).Le HMF peut être utilisé pour le dépistage des miels surchauffés (.KARABOURNIORTI et al. 2001).

Après réchauffement, le miel présente un indice de peroxyde peu élevé et perd donc sa capacité à former l'eau oxygénée (BOGDANOV et BLUMER, 2001).Dès 1963 le peroxyde d'hydrogène a été identifié comme étant la source majeure de l'activité antibactérienne du miel (WHITE et al. 1963).

Donc notre but dans la détermination du taux de HMF est de détecter un éventuel surchauffage et par voie de conséquence une diminution de l'activité antibactérienne. (voir CMI).

Si l'on se réfère à BOGDANOV (1995), je cite "les valeurs HMF (sous nos latitudes enregistrent annuellement une augmentation moyenne d'environ 5-10 mg/kg de miel.

-les miels de Laghouat et de Ain Oussera, vue la date de récolte juin 2006 pour les deux, soit une période d'entreposage depuis la récolte jusqu'à la date d'analyse de 7 mois; y répondaient bien,et même très bien pour le premier vue la différence relative du climat. le pH élevé et la teneur en eau basse pourrait en être la cause.

-En ce qui concerne la variété de Bouguirat, l'augmentation de la teneur en HMF à 29,5 en sept mois qui était la période la plus courte d'entreposage entre les cinq variétés étudiées, permettait de s'avancer à dire que le miel avait subi un surchauffage. Suite à notre enquête à la vue de ce chiffre, l'apiculteur en question ne disposant pas d'extracteur, pendait après desoperculation ses cadres au soleil pour égouttage. Ceci s'ajoutant au fait que la récolte s'étant faite au mois de juillet, cela pourrait donner n début d'explication.

#### **IV.1.5. L'indice diastasique**

Les valeur de l'ID pour les cinq variétés de miels étudiées étaient de:26,1 (ech 2), 16,6 (ech 4), 15,2 (ech1), 16,6 (ech 4), 14,6 (ech 5) et 13,1 (ech 3).

Ces valeurs sont conformes aux exigences internationales (voir annexe))

Elles varient fortement d'un miel à l'autre (BOGDANOV, 1995).

Il convient de faire une remarque pour ce qui du miel de Bouguirat (ech 1), comme il est fort probable que ce miel avait subit un surchauffage, et étant donné que les diastases sont sensibles à un tel traitement l'ID de ce miel ne reflétait pas la réalité.

L'indice diastasique originel devait être plus élevé

#### **IV.2. Concentrations minimales inhibitrices**

Dans cette partie de notre étude les cinq échantillons de miels ont été testés pour leurs activités antibactériennes sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Ces cinq variétés ont montré une activité inhibitrice sur les deux microorganismes mais à des degrés différents.

Les CMI obtenues s'étaient situées entre 15% et 26% en ce qui concerne *P.aeruginosa* pour une moyenne 21,2% ; et de 25% à 30% vis-à-vis de *S.aureus* pour une moyenne de 27,4%.(moyenne des CMI des cinq variétés de miels).

Mais pour les cinq variétés respectives *P.aeruginosa* s'était montré plus sensible à l'action du miel que *S.aureus*.

Pour beaucoup d'auteurs (ANDARGERCHEW et al. 2004), (WILLIX et al. 1992), (COOPER et al. 1999), (MURAT et al. 2005), *S.aureus* était plus sensible à l'action du miel que *P.aeruginosa* et la plupart des bactéries; NZEAO et HAMDI (2000) trouvaient *P.aeruginosa* plus sensible que *S.aureus* pour six échantillons de miels testés, pour EFEM (1992) *P.aeruginosa* était résistante à l'action du miel non dilué.

La CMI la plus basse pour *P.aeruginosa* dans la littérature que j'ai pu consulter a été de 3% (DAGHIE et al. 1973), et la plus haute  $\leq$  36% (DUSTMANN, 1979).

Les valeurs intermédiaires ont été de 3,1-6% (GROCHOWSKI et BILINSKA, 1987); 5% (KHRISTOV et MLADENOV, 1961); 6,4% (HODGSON, 1989),  $\leq$ 25% (NABRDALIK et SKARBEK, 1974), 30% (JEDDAR et al. 1985).

Pour ce qui est de *S.aureus*, la CMI la plus basse a été de 0,3% (DUSTMANN, 1979), et la plus haute 50% (JEDDAR et al. 1985).

Les valeurs intermédiaires ont été de 0,6% (CHRISTOV et MLADENOV, 1961); 3,6% (ADDOCK, 1962);  $\leq$ 25% (NABRDALIK et SKARBEK, 1974), 4% (WOTTON et al. 1978); 9% (IBRAHIM, 1981); 3,1-6% (GROCHOWSKI, et BILINSKA, 1987), 1% (MOLAN et RUSSELL, 1988); 2,9% (HOGDSON, 1989).

Les résultats cités ci-dessus émanaient de techniques différentes:

- "Agar diffusion assay technique": une petite quantité de miel ou d'une solution de miel est appliquée sur gélose inoculée avec une culture microbienne, lors de l'incubation, le miel diffuse dans l'agar à partir de son point d'inoculation, et la zone claire qui correspond à l'inhibition est mesurée (COOPER et al. 1999).

- "La méthode des puits": des puits sont creusés au centre du milieu de culture est rempli avec une certaine quantité de miel ou de solution de miel et les zones claires d'inhibition sont mesurées [(ADEBOLU, 2005); (MURAT et al. 2007)].

- Méthode des disques: à l'image des disques de l'antibiogramme, des disques sont imprégnés de miel est placés sur le milieu inoculé par la culture bactérienne [(PETER J., 2001) ;(ANDARGARCHEW et al. 2004)]

- Méthode d'incorporation en gélose ou en bouillon nutritif (dont la notre): le miel est incorporé dans le milieu dans lequel sont inoculés les germes et on observe s'il y'a une croissance visible [MOLAN (1992) ;(BOUKRAA et al. 2006),

Selon MOLAN (1992), la sensibilité des espèces bactériennes ne saurait être comparées en se basant sur les résultats des différentes études, car les miels utilisés pourraient avoir de larges différences dans leurs activités antibactériennes. "Quand l'effet d'un miel ou d'un groupe de miels, sont testés sur un certains nombres d'espèces bactériennes dans les mêmes conditions et dans une même étude, les sensibilités peuvent être comparées".

On pourrait faire un semblant de comparaison avec les travaux de BOUKRAA et al (2006) puisqu'on a utilisé les mêmes souches bactériennes et la même technique, mais pas les mêmes miels.

Testant l'effet antibactérien de sept variétés de miels sur la même souche de *P.aeruginosa* et selon la même technique, ils ont trouvé des CMI entre 10% et 31% soit une moyenne de 23,5% (moyenne des CMI des 7 variétés de miels).

Dans une autre étude, sur l'effet de trois types de miels sur *S.aureus* (même souche que la notre) et toujours selon la même technique, les mêmes auteurs ont trouvé des CMI de 11%, 24% et 29% donc un moyenne de 21,3%.

On remarque dans ce cas qu'il n'existe pas une grande discordance entre nos résultats respectifs.

Le miel qui avait donné la meilleure CMI pour *P.aeruginosa* (15%°), et la seconde pour *S.aureus* (25%), est le miel de Bouguirat (Ech 1), paradoxalement c'est le miel qui au vu de la valeur de la teneur en HMF semblait être celui qui avait subi un surchauffage et par voie de conséquence une diminution de l'activité des inhibines peroxydes.

Cependant il serait intéressant de noter d'une part, que c'est le seul miel parmi les cinq qui a été conservé à l'abri de la lumière dès la récolte, et d'autre part présentant la coloration la plus foncée. La teneur en antioxydants est plus élevée dans les miels foncés (FRANKEL, et al. 1998). Les miels foncés ont une activité inhibitrice plus élevée (PETER, 2001).

Comparons "pour toutes valeurs égales", ce miel au miel de Laghouat qui au vu de sa teneur en HMF ne semblait avoir subi aucun surchauffage mais ayant été conservé dans un pot en verre transparent, et dont les CMI pour *P.aeruginosa* et pour *S.aureus* était respectivement de 25% et de 29%. Si on se réfère aux travaux de BOGDANOV et BLUMER (2001), le miel de Laghouat devrait avoir un meilleur effet sur l'inhibition de la croissance bactérienne car la chaleur altère plus le miel que la lumière en ce qui concerne l'activité de l'inhibines peroxyde, laquelle ne l'oublions pas est considérée par la plupart des auteurs comme l'inhibine majeure. Ceci ne fait que confirmer que l'activité antibactérienne diffère avec la variété de miel. Il serait important d'ajouter que pour certains types de miels les inhibines non peroxydes constituent le facteur majeur de l'activité antibactérienne (GONNET et LAVIE, 1960).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre les CMI et les différents paramètres physico-chimiques (teneur en eau, teneur en HMF, indice de diastase et pH), pour ce dernier et comme le montre le tableau n°10 les différents mélanges miel gélose ont des pH compris entre 6,1 et 6,9.

### IV.3. Concentrations minimales inhibitrices synergiques

Au vu des résultats on voit qu'il existait une action inhibitrice synergique antibactérienne entre le miel et l'amidon (concentration de la solution stock:10%), pour les cinq variétés de miels et pour les deux bactéries étudiées. Fait étayé par les tests confirmatifs (à l'amidon et à l'eau distillée) qui prouvaient que l'augmentation de l'effet antibactérien n'était pas due à une augmentation de la dilution ou à un quelconque effet antibactérien de l'amidon, d'ailleurs selon BARRY ET BARRY (1971) l'amidon présente une pression osmotique négligeable.

Les gains en miel qui étaient la finalité de notre étude étaient dans l'ensemble assez conséquents

Les Gains en miel lors de la CMIS vis-à-vis de *P.aeruginosa* étaient de: 30,7% à 46,6% Soit un gain moyen de 38,92%

Et vis-à-vis de *S.aureus* de:10% à 33%, soit un gain moyen de 24,14%

Les gains en miel étaient donc plus substantiels avec *P.aeruginosa* qu'avec *S.aureus* C'est avec l'échantillon 3, qu'on avait le moins de gain en miel que ce soit pour *P.aeruginosa* ou pour *S.aureus*.

BOUKRAA et al (2006) étudiant les CMIS de trois types de miels, sur *S. aureus* (même souche que la notre) ont obtenu des gains de miels de 54,5%; 20,8% et 13,7% (dans leur étude l'ID n'a pas été déterminée), donc un gain moyen de 29,6 donc pratiquement comparables aux nôtres

L'effet de chacun des miels et pour un même indice diastasique diffère vis-à-vis des deux germes. Il n'existait pas de corrélation significative entre l'indice diastasique et la CMIS (soit le gain en miel), ainsi qu'entre le volume de la solution d'amidon et l'ID. Le meilleur exemple en était l'échantillon 5 qui pour un ID de 14,6 soit la deuxième valeur la plus basse, donne le meilleur gain en miel (33,3%) vis-à-vis de *S.aureus* et, l'échantillon 1 qui pour un ID de 15,2 donne un gain en miel de 46,6%, alors que l'échantillon 2 qui pour un ID de 26,1 (soit pratiquement le double), le gain en miel est de 44,4%. Selon MASSAUX et al (2006) étudiant l'amidon, je cite-"Les variations de proportions de petites granules (de l'ordre de 15% en volume) en fonction de la

variété vont par exemple influencer l'hydrolyse enzymatique. Les petites granules offrent en effet par leur teneur en lipides plus élevée et un accès en surface réduit, une moindre sensibilité à l'hydrolyse enzymatique".

L'utilisation de solutions stock de 20%, et de 30% n'avait pas permis d'obtenir des CMIS plus basses. Cela serait il du a la faiblesse de l'hydrolyse de par le fait de l'utilisation de l'amidon de maïs ? un dosage de l'amidon avant et après incubation avec le miel pourrait y répondre.

Lors de l'utilisation du mélange miel amidon sans incubation, ainsi que des périodes d'incubation de la solution miel-amidon, de une heure, six heures et douze heures; il y'a eu croissance dans tous les cas après incorporation du miel à la gélose et incubation (période inchangée de 24 h). Le but en était un gain de temps. Le pourquoi du choix de cette période d'incubation de 24 h par BOUKRAA et al (2006) n'a pas été précisé.

Il existait une synergie entre le miel et l'amidon quant à l'effet antibactérien, mais les paramètres qui permettraient d'expliquer que cette synergie différerait avec le type de miel ne semblent pas pour le moment assez clairs. Existent t-il dans les miels des composants qui en dehors des amylases présentent des interactions avec l'amidon? Des études plus poussées et plus fines permettraient peut être d'y répondre.

Selon AHMED et WILLIAMS (1999) cités par TORLEY et al (2003) : "Les deux composants du miel susceptibles d'affecter les propriétés de l'amidon, sont les sucres et l'amylase".

Une large variété de composants organiques peuvent affecter les propriétés de l'amidon (TORLEY et al. 2003). Les mêmes auteurs étudiant l'effet de huit miels de différentes sources et différant par le pH et l'indice diastasique, sur la gélatinisation de l'amidon, trouvent que quand pour six types de miels, la viscosité de l'amidon augmente avec la quantité de miel, elle décroît pour deux autres dans les mêmes conditions.

L'hydrolyse en fonction de la taille des granules et de leur teneur en lipides avancée par MASSAUX et al (2006) pourrait expliquer cette absence de corrélation de la CMIS avec l'indice diastasique. Raisonnant par déduction:

-Selon VERCAUTEREN et RAPAILLE (1999) le diamètre moyen des granules d'amidon de maïs est de 3µm à 26 µm et leur teneur en lipides de 0,75%, alors que le

diamètre des granules d'amidon de pomme de terre est de 40 à 50  $\mu\text{m}$  et leur teneur en lipides 0,15.

-Dans la méthode de détermination de l'indice diastasique selon Schade (INTERNATIONAL HONEY COMMISSION,2002), il est spécifié que lors du calibrage de la solution d'amidon, la gamme d'absorbance obtenue doit être située entre 0,770 et 0,745 sinon, l'amidon utilisé n'est pas valable pour cette méthode..

-Dans le journal officiel de la république Algérienne il est spécifié que l'amidon utilisé pour la méthode précédente doit être l'amidon de fécule de pomme de terre. Le pourquoi de l'utilisation de cet amidon de fécule de pomme de terre n'a pas été précisé.

Ces différents arguments opteraient pour une utilisation de l'amidon de fécule de pomme de terre plutôt que celui de maïs afin de potentialiser l'action d'hydrolyse, et probablement l'effet synergique par voie de conséquence.

## Conclusion

Les résultats obtenus indiquent qu'il existait un effet synergique antibactérien entre le miel et l'amidon. Cet effet variait selon les types de miels pour une même espèce bactérienne, et pour le même miel pour deux espèces bactériennes différentes.

La corrélation entre l'indice diastasique et cet effet synergique est non significative du moins pour les cinq échantillons de miel étudiés et le seul type d'amidon utilisé (amidon de maïs). On ne saurait affirmer que cette synergie était due à une augmentation de l'osmolarité, vu que l'amidon a été utilisé sous forme d'empois (amidon dilué), les degrés de dilution utilisés pourraient être à l'origine d'une diminution de l'osmolarité plutôt qu'à son augmentation. N'ayant pas fait de dosage des sucres des miels avant et après mélange avec l'amidon on ne saurait se prononcer ni dans un certain sens ni dans l'autre.

Les gains en miel, ce qui était la finalité de notre étude étaient dans certains cas assez conséquents. Par comparaison la quantité d'amidon utilisé par rapport à celle de miel économisée est pratiquement négligeable. Cependant les études *in vitro* ne sauraient remplacer celles *in vivo*, dans ce dernier cas et dans le cas de l'utilisation du miel comme pansement par exemple (à l'image de la méthode des disques), les concentrations relatives de miel, ou du mélange miel amidon seraient plus importantes selon les conclusions de beaucoup de chercheurs

Cette voie mériterait d'être affinée, en tenant compte de paramètres non pris en compte. Car la grande question qui reste posée est comment établir les paramètres qui permettraient de choisir le miel qui tout en ayant la meilleure synergie avec l'amidon aurait une bonne action antibactérienne. Vu que l'hydrolyse dépendrait de la nature de l'amidon (maïs, riz, blé,...), quel serait celui à même de potentialiser cet effet synergique? Cette étude n'a nullement la prétention d'y répondre.

## **Recommandations**

-Les miels utilisés doivent être stockés dès la récolte à une température de 2-8°C, et à l'abri de la lumière.

-Employer des amidons facilement hydrolysables, tel que l'amidon de fécule de pomme de terre.

-Employer des méthodes susceptibles de bien refléter l'activité antibactérienne du miel, telles que, la méthode des disques imprégnés de miels ou la méthode des puits.

-Le miel de Bouguirat semble assez prometteur quant à l'activité antibactérienne. Il devrait faire l'objet d'une étude plus poussée, étalée sur une période de plusieurs années afin de vérifier si son potentiel antibactérien est conservé lors des différentes miellées.

-Utiliser des inoculum standards.

Ces différents paramètres seront pris en compte lors de notre prochaine étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABUHARFEIL N. AL-ORAN R. ABO-SHEHADA M.** (1999). The effect of bee honey on the proliferative activity of human B- and T-lymphocytes and the activity of phagocytes. *Food Agric Immunol* .11, pp: 169-77.
- ADCOCK D.** (1962) The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. *Journal of Apicultural Research* 1, pp: 38-40.
- ADEBOLU TT.** (2005) Effect of natural honey on local isolates of diarrheacausing bacteria in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (10), pp: 1172-1174,
- ADELEKE O.E, OLAITAN J.O, OKPEKPE E.I.** (2006). Comparative antibacterial activity of honey and gentamicin against escherichia coli and pseudomonas aeruginosa *Annals of Burns and Fire Disasters - vol. XIX - n. 4*
- AESCHLIMANN J R.** (2003). The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa and other Gram-negative bacteria: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 23:916-924
- ALLEN K L. HUTCHINSON G. MOLAN PC.** (2000) the First World Wound Healing Congress, 10-13 September 2000, Melbourne, Australia. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE.
- AMON S. MIDURA T. DAMUS K. THOMPSON B. WOOD R. CHIN J.** (1979) Honey and other environmental risk factors for infant botulinism .*J of Pediatrics* 94, pp: 331-336.
- AMY E. JEFFREY, CARLOS M. ECHAZARRETA.** (1996). Medical uses of honey. *Rev Biomed*; 7:43-49.
- ALI ATM.**( 1995). Natural honey accelerates healing of indomethacin-induced antral ulcers in rats. *Saudi Med J*, 16(2):161-166,
- ANDARGARCHEW M. BELAY T. FETENE D.** (2004).In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethio.J. health Dev*; 18(2), pp: 107-111.
- ANONYME** (1995). The most frequently occurring aminoglycoside resistance mechanisms. Combined results of survey in eight regions of the world. The aminoglycoside resistance study groups. *J Chemother* ; 7 (suppl 2),pp: 17-30.
- ARCHER HG. BARNETT S. IRVING S. MIDDLETON KR. SEAL DV.** (1990) A controlled model of moist wound healing: comparison between semipermeable film, antiseptics and sugar paste. *J Exp Pathol*, 71, pp: 155-70.
- AUDIGIE C.** (1980). *Biochimie structurale*. Edition Doin,Paris pp:101-103.
- BADAWY OFH. SHAFII SSA. THARWAT EE. KAMAL AM.** (2004) Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium infection *Rev. sci. tech. off. Int. Epiz*, 23 (3), pp: 1011-1022.
- BAQUERO F. PELAEZ T.** (1987). Sensibilité des staphylocoques à la fosfomycine *Paris*; 63, pp:3546-3548.
- BARRY JM. BARRY EM.** (1971).*Eléments de biochimie structurale*, édition Masson et Cie éditeurs, Paris, p:80
- BOGDANOV S.** (1984). Characterization of antibacterial substances in honey. *Lebensmittel. Wissensch. Technol.*, 17 (2), 74-76.
- BOGDANOV S.** (1987). Cristallisation et qualité des miels, *JSA*, 84(3), pp:73-81.
- BOGDANOV S.** (1997). Non-peroxide antibacterial activity of honey. *In Bee-products: properties applications and apitherapy* (A. Mizrahi & Y. Lensky eds). Plenum Publishing Corporation, New York, 39-47.

- BOGDANOV S. (2005).** Miels monofloraux suisses.  
Ed Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP forum 23; p:8.
- BOGDANOV S. BIERI B. FIGAR M. IFF D. KANZIG A. FIGUEIREDO V. BOUKRAË L., AMARA K. AND AGGAD H. (2006):** Synergistic effect of starch on the antibacterial activity of honey against *Staphylococcus aureus*. 1<sup>st</sup> International Conference on the Medical Uses of Honey. USM, Kota Bharu, Malaysia. 26-28
- STOCKLI H. ZURCHER K.(1995).**Miel: definition et directives pour l'analyse et l'appréciation.Centre suisse de recherches apicoles. Station suisse de recherches laitières, Liebefeld, CH-3003.Berne pp:1-26.
- BOGDANOV S. GALLMANN P. STANGACIU S. THEODORE CT. (2006).** Produits apicoles et santé. ALP forum, N°4 41f p:6-8
- BOGDANOV S. LULLMAN C. MARTIN P. et al (1999).** Honey quality and international regulatory standards. Review of the work of the International Honey Commission. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 90, pp: 108-125.
- BOGDANOV S. RIEDER K. RUEGG M. (1987).** New qualitats. Kriterien bei Honiguntersuchungen. *Apidologie*, 18 (3), pp: 267-278.
- BOGDANOV S. RUOFF K.ODDO PL. (2004).** Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys. *Apidologie* 35pp: 4-17.
- BOGDANOV S.BLUMER P. (2001)** Propriétés antibiotiques naturelles du miel. Centre suisse de recherches apicoles. Station fédérale des recherches laitières. Liebefeld,CH-3003 Berne pp:1-8.
- BOUKRAA L. AGGAD H. AMARA (2007)**
- BOUSSETA A. COLLINS S. DUFOUR JP. (1992).** *Characteristic* aroma profiles of unifloral honeys obtained with dynamic headspace GC-MS system, *J. Apic. Res.* 31, pp: 96-109.
- BRANIKI F.J. (1981)** Surgery in Western Kenya. *Ann R Coll Surg Engl* 63, pp: 348-52.
- BRISSON-NOEL A. ARTHUR M. COURVALAIN P. (1998).** Dissémination de la résistance aux antibiotiques dans les conditions naturelles.*Med mal infect* ; 20, pp:3-8.
- BUNTING C.M. (2001).** The production of hydrogen peroxide by honey and its relevance to wound healing. MSc thesis. University of Waikato
- CAILLAS A. (1974).**Le rucher de rapport. Les produits de la ruche. *Traité pratique d'apiculture moderne.* Pp:485-502.
- CAMBAU E. PERANI E. DIB C. PETINON C. TRIAS J. JARLIER V. (1995).** Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* ; 39, pp: 2248-2252.
- CARPENTIER JP. MORILLON M. PETROGNANI R et CAVALLO JD. (2003).** Infections à bacille pyocyanique. *Encycl Méd Chir (Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-025-B-50, 23 pp:1-7.*
- CAVALLO JD. LEBLANC F. FABRE R. FOURTICQ-ESQUEÖUTE A. (1999)** et le groupe d'étude de la résistance de *P.aeruginosa* aux bétalactamines (GERPB). Surveillance de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en France et distribution des mécanismes de résistance aux béta-lactamines : étude GERPB. *Pathol Biol* 2001 ; 49 : 534-539
- CAVANAGH D, BEAZLEY J AND OSTAPOWICZ F (1970)** Radical operation for carcinoma of the vulva. A new approach to wound healing. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 77 (11) 1037-1040.
- CHAUVIN R. (1968).**Traité de biologie de l'abeille Tome III, les produits de la ruche. Edition Masson et Cie, Paris pp:66-84.

- CHEFTEL C.J. CHEFTEL H.** (1978). Introduction à la biochimie et à la technologie alimentaire. Vol 1, Edition Lavoisier, Paris pp:130-131.
- GHELDOF N, ENGESETH NJ.** (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem*; 50(10):3050-5
- COHEN G. HOCHSTEIN P.** (1962) Glutathione peroxidase, the major pathway for the detoxification of hydrogen peroxide in erythrocytes. En Procc 141st Meeting Amer Chem Soc. New York: Amer Chem Soc, 1.
- CONDON RE.** (1993). Curious interaction of bugs and bees. *Surgery* 113 (2),pp: 234-235.
- COOPER RA. MOLAN PC.** (1999). The use of honey as an antiseptic in managing Pseudomonas infection. *J Wound Care*; 8(4), pp: 161-4.
- DAGHIE V. CÎRNU I. CIOCAV.** (1973) Contributii privind actinunea bactericida si bacteriostatica a mierii de lecaniide (Physokermes sp) din zona coniferelor. *Apicultura* 26(2),pp: 13-16.
- DECOSTER A. LEMAHIEU JC.** (2004). Pseudomonas. Cours de bactériologie Ed Azay .Lyon.pp:1-11.
- DONADIEU Y.** (1978). Le miel thérapeutique naturelle, 2eme édition. Edition Maloine, Paris. Pp:14-36.
- DROGUET N.** (1983) Utilisation de sucre et miel dans le traitement des plaies infectées. *Presse Med*, 12, pp; 2355-2356.
- DUNFORD C. COOPER RA. MOLAN PC.** (2000). Case report: Using honey as a dressing for infected skin lesions. *Nursing Times* 96(14):7-9.
- DUSTMANN J H.** (1972). Über den Einfluß des Lichtes auf den Peroxid-Wert (Inhibin) des Honigs. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 148(5),pp: 263-268.
- DUSTMANN JH.** (1979) Antibacterial effect of honey. *Apiacta* 14(1),pp:7-11.
- DUSTMANN JH.** (1993). Honey quality and its control. *American Bee Journal* 133(9) pp: 648-651.
- DUVAL.J. SOUSSY CJ.** (1984).Cités par LEON LE MINOR, M.VERON 1989) bactériologie médicale 2eme édition Médecine science Flammarion, pp-584-585.
- ECHIGO TE. TAKENAKA T.** (1974). Production of organic acids in honey by honeybees. *J. of the Agr. Chem. Soc. of Japan* 48, pp: 225-230. Ed Azay .Lyon.pp:1-11.
- EFEM SE. UDOH KT. IWARA CI.** (1992). The antibacterial spectrum of honey and its clinical significance. *Infect*, 20, pp: 227-9.
- EFEM SEE.** (1993). Recent advances in the management of Fournier's gangrene: Preliminary observations. *Surgery*; 113(2):200-204.
- ELBAZE P. THYSS A, VINTI H, DEVILLE A. DELLAMONICA P. ORTONNE JP.** (1991). A study of nineteen immuno-compromised patients with extensive skin lesions caused by *Pseudomonas aeruginosa* with and without bacteremia. *Acta Derm Venereol* ; 71 : 411-415.
- EL KOURI D. POITIER M.A. TREWICK D. BARON D. POTEL G. LE GALLOU F.** (1998). Encyclopédie médicochirurgicale 8-007-4-10.
- FRANKEL S. ROBINSON GE. BERENBAUM MR.** (1998) Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J Apic Res*; 37(1) pp: 27-31.
- GHOSH DASTIDAR N. CHAKRABARTI J.** (1992). Studies on hydroxymethylfurfural formation during storage of honey. *J. of Food Science and Technology*, 29 (6), pp 399.

- GONNET M.** (1982). Le miel composition propriétés, conservation.
- GONNET M. LAVIE P.** (1960). Influence du chauffage sur le facteur antibiotique présent dans les miels. *Annales de l'Abeille* (Paris) 3(4), pp: 349-364.
- GOUT J.** (1998) Le monde du miel et des abeilles. Edition Delachaux et Niestlé. S.A.
- GROCHOWSKI J. BILINSKA M.** (1987) Biological activity of pollen, bee bread and honey relative to selected bacterial strains. Proceedings of the XXXIst International Apicultural Congress of Apimondia, Warsaw, Poland. Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania, pp: 462.
- GROUPE D'ETUDE DE LA RESISTANCE DE P. AERUGINOSA AUX BETALACTAMINES (GERPB).** (2000) Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* en France de 1994 à 1998. *Lettre Infect*; 15, pp: 18-23
- HALLIWELL B. CROSS CE.** (1994) Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 10, pp: 5-12.
- HAFFEJEE IE AND MOOSA A (1985).** Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *Br. Med. J.* 290 1866-1867.
- HERSZAGE L. MONTENEGRO JR. JOSEPH AL.** (1980) Tratamiento de las heridas supuradas con acúcar granulado comercial. *Bol Trab Soc Argent Cir*; 41(21-22), pp: 315-30.
- HODGSON M J.** (1989) Investigation of the antibacterial action spectrum of some honeys. M.Sc. Thesis; University of Waikato, New Zealand.
- HORN H. (1991).** La cristallisation des miels. Hefte 11 pp: 323-326.
- HUCHET E. COUSTEL J. GUINOT L.** (1996) Les constituants chimiques du Miel Méthodes d'analyses chimiques - Département Science de l'Aliment. 2<sup>ème</sup> édition. OPIDA; pp: 18-19, 168-172.
- HUTTON DJ. (1996) Treatment of pressure sores. Nurs Times; 62(46): 1533-4.**
- HYSLOP PA. HINSHAW DB. SCRAUFSTATTER IU. COCHRANE CG. KAJIWARA S. HASAND J. USTUNOL Z. (2002).** Effect of honey on growth and acid production by intestinal *Bifidobacterium* spp: An *in vitro* comparison to commercial oligosaccharides and inulin. *J. Food Prot.* 65:214-218.
- KUNZ S. VOSBECK K.** (1995) Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. *Free Radic Biol Med.* 19(1), pp: 31-7.
- IBRAHIM A S.** (1981) Antibacterial action of honey. Proceedings of the First International Conference on Islamic Medicine. (2nd edition) (Bulletin of Islamic Medicine, volume 1). Kuwait Ministry of Public Health; Kuwait; pp 363-365.
- INTERNATIONAL HONEY COMMISSION (2002).** Harmonised methods of the International Honey Commission IHC responsible for the methods: Stefan bogdanov Swiss bee research centre FAM, liebefeld, ch-3003 Bern, Switzerland pp: 12 -13, 31, 38- 40
- JEDDAR. A. KHARSANY A. RAMSAROOP U G. BHAMJEE A. HAFFEJEE, I E. MOOSA A.** (1985). The antibacterial action of honey. An *in vitro* study. *South African Medical Journal* 67, pp: 257-258.
- JEFFREY A.E. ECHAZARETTA M.** (1996) Medical uses of honey *Rev Biomed* 7, pp: 43-49.
- JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES (2002)**  
ANNEXE II. Directive 2001/110/ce du conseil du 20 décembre 2001 relative au miel  
Caractéristiques de composition des miels.
- KARABOURNIOTI S. ZERVALAKI P.** (2001) Les effets du chauffage sur le HMF et l'invertase des miels. *Apiacta*, 36 (4), pp: 178 – 181.

- KEAST-BUTLER J.** (1980) Honey for necrotic malignant breast ulcers. *Lancet* ii (October 11) 809.
- KHRISTOV G. MLADENOV S.** (1961) Honey in surgical practice: the antibacterial properties of honey.] *Khirurgiya (Moscow)* 14(10),pp: 937-946.
- LAVIE P.** (1968). Propriétés antibactériennes et action physiologique des produits de la ruche et des abeilles. Traité de biologie de l'abeille. (Chauvin editor) Masson et Cie pp:2-115.
- LEON LE MINOR VERON M.** (1989).Bactériologie médicale 2eme édition Médecine science Flammarion; pp-575-790.
- LINDER K.E. (1962).** Ein Beitrag zur Frage der antimikrobiellen Wirkung der Naturhonige. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.*, 115 (7), 720-736.
- LIVERMORE D.M.** (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*; 34, pp: 634-640
- LOIRICHE.N.** (1979) Les abeilles pharmaciennes ailées-Science pour tous. Ed MIR, Moscou, pp.40-70.
- LOUISOT P.** (1983).Biochimie générale et médicale structurale, métabolique et sémméiologique.Ed Simep s-a, Paris pp:105-106.
- LOUVEAUX J.** (1968). Propriétés et technologie du miel. Traité de biologie de l'abeille. Edition Masson et Cie, Paris; pp:277-308.
- LOUVEAUX J.** (1985) Les abeilles et leur élevage. 2<sup>ème</sup> édition. OPIDA ; pp:18-19,168-172.
- MASSAUX C. BODSON B. SINDIE M. SINNAEVE G. DARDENNE P. FALISSE A.** (2006).L'amidon antif du grain de blé:un composé naturel à valoriser par la propriétés de ses propriétés techno-fonctionnelles. Livre blanc "céréales" F.U.S.A. et CRA-Gembloux
- MC INERNEY RJF.**( 1990). Honey a remedy rediscovered. *J R Soc Med*; 83:127.
- MEDA A.LAMIEN CE. MILLOGO J. ROMITO M. NACOULMA O G.** (2005). Physicochemical analysis of Burkina Faso Fasan honey; Ed Vet. Brno 74 pp; 147-152.
- MIRAGLIO AM. BEUCHAT IR.COULSTON A.M. CARL I.K. NATARO JP. SPECKMANN EW.** (2003). Honey health and therapeutic qualities. The national honey board; pp: 1-28.
- MOLAN P C. RUSSELL K M.** (1988) Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research* 27(1), pp: 62-67.
- MOLAN PC.** (1992). The antibacterial activity of honey. I. The nature of antibacterial activity. *Bee World*, 73 (1), pp: 5-28.
- MOLAN PC.** (1999).The role of honey in the management of wounds. *J. Wound care* 8 pp: 415-418.
- MOLAN PC.** ( 2001).Why honey is effective as a medicine ed.P.Munn and R.jones International Bee Research Association, Cardiff, UK
- MOLAN PC. ALLEN KL.** (1996). The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey." *J Pharm Pharmacol* 48, pp: 1206-1209.
- MOLAN PC.** (1996) Honey for the treatment of infections. *Bee Infor. Med.*, 3 (2) pp: 6-7
- MORSE R A** (1986). The antibiotic properties of honey. *Pan-Pacific Entomologist* 62(4), pp: 370-371.
- MURAT KUCUK A. SEVGI KOLAYL A S.ENGU L. KARAOGLU B. ESRA ULUSOY A.** (2007)-Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia .*Food Chemistry* 100,pp: 526–534

- NABRDALIK M. SKARBEEK R** (1974) [Inhibitory properties of bee's honey.] *Medycyna Weterynaryjna* 30(11),pp: 669.
- NATARAJAN S. WILLIAMSON D. GREY JA. HARDING KG. COOPER RA.** (2001). Healing of an MRAS-colonised, hydroxyurea-induced leg ulcer with honey. *J Dermat Treat* ; 12,pp:33-6.
- NATIONAL HONEY BORD.** (2002). Honey-Health and therapeutic qualities pp: 11-18.
- NDAYISABA G, BAZIRA L, HABONIMANA E, MUTEGANYA D.** (1993)Clinical and bacteriological outcome of wounds treated with honey. *J Orthop Surg*; 7(2): 202-4.
- NGUYEN J, JARLIER V.**(2001) Épidémiologie bactérienne et intérêt des prélèvements microbiologiques périopératoires. Conférence de consensus : Prise en charge des péritonites communautaires. *Ann Fr Anesth Réanim* ; 20 : 395-399.
- NZEAKO B.C, HAMDI J** (2000) Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. *Medical sciences*.2, 75-79.
- ODDO PL. PIAZZA MG. PULCINI. P.** (1999). Invertase activity in honey. *Apidologie* 30,pp: 57-65.
- PETER J. TAORMINA A. BRENDAN A. NIEMIRA B. LARRY R. BEUCHAT A.** (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power *International Journal of Food Microbiology* 69,pp: 217–225
- PHUAPRADIT W, SAROPALA N.**( 1992) Topical application of honey in treatment of abdominal wound disruption. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*; 32(4):381-384.
- PRUITT KM. REITER B.** (1985) Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects. In: Pruitt KM, Tenovuo JO, editors. *The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance*. New York: Marcel Dekker;pp: 144-78.
- RAMÍREZ CERVANTES M.A. GONZÁLEZ NOVELO S. E. SAURI DUCH E.** (2000) Les effets du traitement thermique sur la qualité du miel pendant l'entreposage *Apiacta*, 35 (4), pp:162 – 170.
- ROBSON V, WARD RG AND MOLAN PC (2000).**The use of honey in split skin grafting. 10th Conference of the European Wound Management Association, Harrogate, UK
- ROTH L A. KWAN S. SPORNS P.** (1986). Use of a disc-assay system to detect oxytetracycline residues in honey. *Journal of Food Protection* 49(6), pp: 436-441.
- RYCHURCH M. & DOLEZOL M.** (1961).Wlasciwosci inhibitowne niektorych miodow Polskich. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 5 (2), pp:53-64.
- SAISSY JM. GUIGNARD B. PATS B. GUIAVARCH M. ROUVIER B.** (1995) Pulmonary edema after hydrogen peroxide irrigation of a war wound. *Intensive Care Med.* 21(3), pp: 287-8.
- SALAHUDEEN AK. CLARK EC. NATH KA.** (1991) Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 88(6), pp: 1886-93.
- SALEM SN.** (1982). Honey regimen in gastrointestinal disorders. *Bulletin of Islamic Medicine*, 2(5): 422-425.
- SCHAEFLER S.** (1989). Methicillin-resistant of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones, *J.Clin microbiol*; 27 pp: 335-336.
- SCHWEITZER P.** (2004) Le monde des miellats Laboratoire d'analyses et d'écologie apicole.Cetam lorraine.Revue l'abeille de France.6p

- SEYMOUR FI WEST KS.** (1951) Honey - its role in medicine. *Med. Times* 79, pp: 104-107.
- SOMERFIELD S.D** (1991) Honey and healing. *J. R. Soc. Med.* 84 (3) 179.
- STEPHEN W.** (1946). The relationship of moisture content and yeast count in honey fermentation. *Scientific agriculture* 26 pp: 258-264.
- STONE HH.** (1969). The diagnostic and traitement of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in major burns. *JInf. Dis* ,119:504-505.
- SUBRAHMANYAM MA.**( 1998). Prospective randomised clinical and histological study of superficial burn wound healing with honey and silver sulfadiazine. *Burns*; 24(2):157-161.
- SUBRAHMANYAM M. SAHAPURE A.G. NAGANE N.S. BHAGWAT V.R. GANU J.V.**(2001) effects of topical application of honey on burn wound healing. *Annals of Burns and Fire Disasters - vol. XIV - n. 3*
- TALPAY B.** (1985) Spezifikationen für Trachthonige. *Dtsch .Lebensm.Rundsch.*81, 148-452. Effect of honey types and concentration on starch gelatinization *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, pp: 161–170
- TANNOCK J.** (1999). *Probiotics A Critical Review.* Norfolk, England. Horizon Scientific Press.pp 1-3.
- THEUNISSEN F. GROBLER S. GEDALIA I.** (2001).The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans* *Apidologie* 32 pp: 371–379
- TONKS A. COOPER RA. PRICE AJ. MOLAN PC. JONES KP.** (2001) Stimulation of tnf-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine* .14(4), pp: 240-2.
- TORLEYA PJ. RUTGERS RPG. D'Arcy B. Bhandari BR** (2004) Effect of honey types and concentration on starch gelatinization *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, pp: 161–170
- TOVEY FI.** (1991). Honey and healing. *J. R. Soc. Med.* 84 (7),pp:447-52..
- TYSSET C. ROUSSEAU M.**(1981). Le problème du microbisme et de l'hygiène des miels du commerce.*Rev Med vet*; 132, 591-600.
- USTUNOL Z. GANDHI H** (2002). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in honey sweetened skim milk. *J. Food Prot.* 64(11): 1775-1779
- VARDI A, BARZILAY Z, LINDER N, COHEN HA, PARET G, BARZILAI A** (1998) Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection. *Acta Paediatr* 87(4):429–432
- VERCAUTEREN R. RAPAILLE A.** (1998). Productions industrielles des glucides alimentaires, propriétés technologiques et utilisations alimentaires. Dossier scientifique de l'IFN n° 11pp:36 - 39.
- VOSBECK K.** (1995) Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. *Free Radic Biol Med.* 19(1), pp: 31-7.
- VON DER OHE W.DUSTMANN J. VON DER OHE K.** (1991). La proline comme critère d'appréciation des miels.*Dtsch.Lebensm-Rundsch* 87, pp: 383-386.
- VORLOVA L. CELECHOVSKA O.** (2002): Activity of Enzymes and Trace Element Content in Bee Honey. *Acta Vet. Brno*, 71,pp: 375-378.
- WELFORD T. EADIE T. LIEWELLYN G.** (1978). Evaluation the inhibitory action of honey on fungal growth, sporulation and aflatoxin production.
- WHITE J., SUBERS M. SCHEPARTZ A.**(1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system; *Biochim. Biophys. Acta* 73, 57-70.
- WHITE J.** (1981). Natural honey toxicants. *Bee world* 62,pp:23-28.
- WHITE J. KUSHNIR I. SUBERS M H.** (1964) Effect of storage and processing Temperatures on honey quality. *Food Technology* 18(4) pp: 153-156.

- WHITE J.W.** (1975). Composition of honey. *In* Honey: a comprehensive survey (E. Grane, Ed.). Heinmann, London, pp: 157-206.
- WHITE JW SUBERS MH. SCHEPARTZ AI.** (1962) The identification of inhibine. *Amer Bee J*; 102, pp: 430-431.
- WHITE JW. RIETHOF ML. KUSHNIR I.** (1960).Composition of honey. The effect of storage on carbohydrate acidity and diastase content.*J food Sci*, 26(1), pp: 63-71.
- WHITE JW. SUBERS MH.**(1964) Studies on honey inhibine. Effect of heat. *J Apicultural Res*, 3(1), pp: 45-50.
- WHITE, JW.** (1994). The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. *Bee World* 75(3) pp: 104-117.
- WILLIX DJ. MOLAN PC. HARFOOT CJA.** (1992) Comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *Journal of Applied Bacteriology* 73, pp: 388-394.
- WOOTON M. EDWARDS R A. ROWSE A.** (1978) Antibacterial properties of some Australian honeys. *Food Technology in Australia* (May),pp: 175-176.
- YATSUNAMI K. ECHIGO T.** (1984). Antibacterial action of honey and royal jelly *Honeybee Science* 5(3), pp: 125-130.
- YILMAZ H. KÜFREVIÖGLU I.** (2001) Composition of Honeys Collected from Eastern and South-Eastern Anatolia and Effect of Storage on Hydroxymethylfurfural Content and Diastase Activity *Turk J Agric For* 25 pp 347-349

## International Honey Commission (2002) 31

### Determination of hydroxymethylfurfural after Winkler

#### 1. SCOPE

The method can be applied to all honey samples.

#### 2. DEFINITION

The method determines the concentration of 5-(hydroxymethyl-)furan-2-carbaldehyde, defined as the constituents of honey which are capable of combining with barbituric acid and p-toluidine under the conditions of the test.

#### 3. PRINCIPLE

This method describes the determination of hydroxymethylfurfural in honey and is based on the original method of Winkler (1).

To aliquot parts of a honey solution, solutions of p-toluidine and barbituric acid are added and the

resultant colour is measured against a blank in 1-cm cuvettes at 550nm.

#### 4. REAGENTS

-p-toluidine-solution.

NOTE: p-toluidine is carcinogenic and presents a risk to health. Contact with the reagent should be avoided. If possible, use one of the other two methods for HMF determination.

Dissolve 10.0 g p-toluidine in 50 ml 2-propanol by gently warming on a water bath.

Transfer with a few ml of 2-propanol to a 100 ml volumetric flask and mix with 10.0 ml glacial acetic acid. After cooling to ambient temperature, fill to volume with 2-propanol.

Store in the dark for at least 24 hours before use. Discard after three days or if there is undue coloration.

-Barbituric acid solution.

Transfer 500 mg barbituric acid as quickly as possible to a 100 ml volumetric flask with about 70 ml water. Dissolve by warming the stoppered flask gently on a water bath. Cool to ambient temperature and dilute to volume.

-Carrez solution I: dissolve 15 g of potassium hexacyanoferrate(II),  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  in water and make up to 100 ml.

-Carrez solution II: dissolve 30 g of zinc acetate,  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  in water and dilute to 100 ml with water.

## 5. EQUIPMENT

Spectrophotometer or filter photometer for measuring absorbance at 550 nm.

1 cm cells.

Volumetric flasks, 50 and 100 ml.

Test tubes.

Beaker.

Filter paper, analytical grade.

## 6. PROCEDURE

Preparation of the sample solution

Weigh about 10g of honey to the nearest mg. Dissolve in about 20 ml water and quantitatively transfer to a 50 ml volumetric flask. Add 1 ml of Carrez I, shake well, add 1 ml of Carrez II, shake once more, dilute to volume with water and mix once more. A drop of ethanol prevents possible foaming. Filter the solution through filter paper. Discard the first 10 ml of the filtrate. Complete the rest of the analysis immediately.

In the case of very clear samples, clarification with Carrez' reagents is not necessary.

Determination

Pipette 2.0 ml of the sample solution to each of two tubes and add 5.0 ml p-toluidine solution to both.

Add 1.0 ml of water to one tube (blank value) and 1.0 ml of barbituric acid solution to the other with gentle shaking. Carry out without delay and complete in 1 - 2 minutes. Measure the absorbance of the sample against the blank as soon as the colour intensity has reached a maximum (3 – 4 minutes after adding the barbituric acid solution), using 1cm cells at 550nm.

## 7. CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS

The content of HMF is calculated as follows:

$HMF = 192 \times A \times 10$

Weight of honey in grams

Where

A = Absorbance,

192 = Factor for dilution and extinction coefficient

Express results in mg/kg to 1 decimal place

International Honey Commission (2002) 38

## **Determination of diastase activity with Phadebas**

### 1. SCOPE

The method can be applied to all honey samples.

### 2. DEFINITION

The unit of Diastase Activity, the Gothe unit, is defined as that amount of enzyme which will convert 0.01 gram of starch to the prescribed end-point in one hour at 40°C under the conditions of test. Results are expressed in Gothe units (or Schade units) per gram of honey

### 3. PRINCIPLE

Determination of the diastatic activity of honey is by a photometric method in which an insoluble blue dyed cross-linked type of starch is used as the substrate. This is hydrolysed by the enzyme, yielding blue water-soluble fragments, determined photometrically at 620 nm. The absorbance of the solution is directly proportional to the diastatic activity of the sample. The method is based on that originally published by Siegenthaler (1) and modified by Bogdanov (2).

### 4. REAGENTS

Phadebas tablets, Pharmacia Diagnostics.

Sodium hydroxide 0.5M.

Acetate buffer (0.1M, pH 5.2): Dissolve 13.6 g of sodium acetate trihydrate in water.

Adjust the pH of the solution to 5.2 with glacial acetic acid (1 - 2 ml) and dilute to 1L with water.

### 5. EQUIPMENT

Photometer

Reagent mixer

Thermostated water bath

Timer

### 6. PROCEDURE

#### GENERAL COMMENTS ON THE METHODS.

#### Determination

Weigh 1.00 g of honey into a 100 ml volumetric flask, dissolve in the acetate buffer solution and fill to the mark. Complete the procedure within an hour. Transfer 5.0 ml of the solution to a test tube and place it in the water bath at 40°C.

Prepare a blank by placing a 5.0 ml aliquot of the acetate buffer in another test tube which is treated exactly as the sample solution.

To both solutions add a Phadebas tablet, using tweezers, and start the timer. Stir the solutions in the reagent mixer until the tablets disintegrate (ca. 10 seconds) and return them to the water bath.

Terminate the reaction after exactly 15 minutes by adding 1 ml sodium hydroxide solution. Stir the mixture again in the reagent mixer for approximately 5 seconds. Immediately filter the solutions through filter papers and measure the absorbance in 1 cm cuvettes at 620 nm using water as reference. The absorbance of the blank is subtracted from that of the sample solution ( $\tilde{A}_{620}$ ). If the absorbance is higher than 1.0, dilute the sample with water. Take into consideration the dilution factor when calculating the results.

## 7. CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS

The classical method for the determination of the honey diastase activity is the method of Schade

(3,4). The diastase activity is expressed as the diastase number (DN) in Schade units and is defined as follows: one diastase unit corresponds to the enzyme activity of 1 g of honey, which can hydrolyse 0.01 g of starch in one hour at 40°C.

A simultaneous measurement with the Phadebas and the Schade method (3,4) of 57 different commercial honey samples covering the range of diastase activity from 8 to 40 was carried out.

There was a very good correlation ( $r=0.987$ ) between the two measurements. Linear regression of y (diastase number) against  $\tilde{A}_{620}$  yielded the following relation:

$$DN = 28.2 \tilde{A}_{620} + 2.64$$

where 28.2 and 2.64 are respectively the slope and the intercept of the best straight line obtained by linear regression of  $\tilde{A}_{620}$  (x axis) on DN (y axis).

For low diastase values (between 0 and 6 DN) a very good correlation ( $R^2 = 0,927$ ) with the following linear regression of y (diastase number) against  $\tilde{A}_{620}$  yielded the following relation:

$$DN = 35.2 \tilde{A}_{620} - 0.46$$

where 35.2 and 0.46 are respectively the slope and the intercept of the best straight line obtained by linear regression of  $\tilde{A}_{620}$  (x axis) on DN (y axis).

This equation should be used for the determination of the activity of diastase up to 8 Diastase units.

## **Recherche de falsification** : méthode de Fiehe

### **Principe**

Déceler la présence de glucose synthétique dans le miel

### **Réactifs**

- Ether sulfurique
- Résorcine
- Acide chlorhydrique

### **Protocole**

On fait fondre 10 g de miel au bain-marie sans dépasser 35°C. Au moyen d'une pipette jaugée, on prélève 5 g de l'échantillon et on les introduit dans un tube à essai; on ajoute 5 cm<sup>3</sup> d'éther sulfurique et en le bouchant avec le doigt, on agite le tube pendant 1 ou 2 minutes.

On laisse ensuite reposer; puis on décante dans un autre tube à essai en ayant soin de ne pas faire écouler le miel. A l'aide d'une pipette, on prend 2 cm<sup>3</sup> d'une solution de résorcine dans 10 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique pur et on les fait glisser le long des parois du tube contenant l'extrait éthéré. L'éther se trouble et devient blanchâtre tandis que la résorcine se rassemble au fond du tube. Si le miel est falsifié par du glucose synthétique, le réactif se colore immédiatement en rose très pâle, teinte dont l'intensité augmente de seconde en seconde.

Au bout de 20 minutes, la coloration est d'autant plus foncée que la teneur en sucre interverti est plus grande.

**Milieu de culture (Bio Mark<sup>®</sup>)**

**Composition :g/l**

<b>-Peptone.....</b>	<b>5.00</b>
<b>-Extrait de bœuf.....</b>	<b>1.00</b>
<b>-Extrait de levure.....</b>	<b>2.00</b>
<b>-Chlorure de sodium.....</b>	<b>5.00</b>
<b>-Agar.....</b>	<b>15.00</b>

Tableau 23A.1  
Recommandations et exigences internationales

Caractéristique qualitative	Exigences	Recommandations
	UE <sup>1</sup>	Codex <sup>2</sup>
<i>Eau (g/100g)</i>		
Miel, en général	max. 21	max. 21
Miel de bruyère, miel de trèfle	max. 23	max. 23
<i>Teneur apparente en sucres réducteurs (g/100 g)</i>		
Miel de fleurs	min. 65	min. 65
Miel de miellat, ou mélanges avec miel de fleurs	min. 60	min. 60
<i>Teneur apparente en saccharose (g/100 g)</i>		
Miel en général	max. 5	max. 5
Miel de miellat, ou mélanges avec miel de fleurs (miel d'acacias, de lavande, de Banksia, d'Eucryphia)	max. 10	max. 10
<i>Substances non hydrosolubles (g/100 g)</i>	0,1	0,1
<i>Sels minéraux (g/100g)</i>		
Miel en général	max. 0,6	max. 1
Miel de miellat ou mélanges de miel de fleurs	max. 1	pas d'indication
<i>Acides libres (milliequivalent/kg)</i>	40	40
<i>Indice d'amylase (en unités de Schade)</i>		
Miel en général	min. 8	min. 3
Miels pauvres en enzymes, comme le miel d'acacias, de fleurs d'oranger	min. 3	pas d'indication
<i>Hydroxyméthylfurfuroï (mg/kg)</i>	max. 40	max. 80