République Algérienne Populaire et Démocratique

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique

Université Dr Yahia Fares-Médéa

Faculté Des Sciences Et De La Technologie

Mémoire De Fin D'études

En Vue d'obtention Du Diplôme de Master en Génie Des Procédés

Option : Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

Etude De L'effet Inhibiteur Naturel D'une Formule A Base De Miel Et D'extraits De Plantes A Usage Pharmaceutique

Réalisé par

Mlle Khelfi Djihad

Devant le jury :

Pr Abousseoud. M : Président

Dr Ahmadi. A : Examinatrice

Dr Tassist. A : Promotrice

2015-2016

REMERCIEMENTS

Je remercie Allah, le tout puissant, le miséricordieux, de m'avoir appris ce que j'ignorais, de m'avoir donné la santé et tout dont je nécessitais pour l'accomplissement de ce mémoire.

Je remercie, en deuxième position, ma promotrice Mme Tassist. A, qui m'a fait profiler de son savoir, de son expérience, pour ses conseils précieux et ses lectures enrichissantes de mon mémoire.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury , de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être membres du jury de ce mémoire et pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mon travail.

En outre, mes sincères remerciements s'adressent à tout les membres du laboratoire de L'EPSP de Médéa qui par leur disponibilité et leur aide m'ont permis de mener ce projet à bien.

Mes très spéciaux remerciements reviennent à ma famille et mes amies pour leurs encouragements et leur compréhension.

Enfin, toute ma gratitude, ma reconnaissance et mes très vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

A mes très chers parents

A mes très chères sœurs

A mon très cher frère

A mes très chères amies

A tous ceux qui me sont chers

ملخص

يتمحور العمل الذي أجريناه حول تقييم مفعول وصفة مكونة من خليط العسل ومستخلصات نباتات طبية (العينون (تاسلغة)، الخوخ، العرعر و خياط الجراح) كمضاد بكتيري طبيعي. في هذا السياق، قمنا بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لكل مكون على حدى ثم في المزيج إزاء كل من البكتيريا المعوية و المكورات العنقودية الذهبية. وهكذا، أبدى كل مستخلص تأثيرا معينا على نمو البكتيريا بإيقاف تكاثرها إما كليا أو جزئيا. أكبر مناطق التثبيط الكلي التي تم الحصول عليها سجلت الأقطار التالية : 17 ملم بالنسبة للعسل المخفف إلى 75 ٪ ، 28 مم عن العينون و 20 مم عن الخوخ و العرعر (تركيز كل نبتة هو 0.24 غرام / مل) فيما أظهرت كلتا السلالتين مقاومة لخياط الجراح. من جهة أخرى أظهر المزيج الثنائي "عسل- مستخلص نباتي" أكثر فعالية مقارنة مع المزيج المتعدد "عسل- مستخلصات نباتية" على كل السلالات.

Résumé

Notre étude porte sur la détermination de l'effet inhibiteur naturel d'une formule à base de miel de forêt couplé avec les extraits de plantes médicinales (la globulaire « Globularia alypum », le pêcher « *Prunus persica* », le genévrier « *Juniperus communis* » et la sauge de Jérusalem « *Phlomis fruticosa* »). Nous avons évalué l'activité antibactérienne de chaque constituant seul puis en association avec les autres vis-à-vis des de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Chaque constituant avait une action inhibitrice soit totale et/ou partielle vis-à-vis des souches testées. Ainsi, les diamètres maximaux des zones d'inhibition totale obtenus sont de 17 mm pour le miel dilué à 75 %, 28 mm pour la globulaire et 20 mm pour le pêcher et le genévrier pour une concentration de 0.24 g/ml. Les deux souches étaient résistantes pour la sauge de Jérusalem. L'association binaire « miel-Extrait de plante » était plus active par rapport aux associations multiples « miel-Extraits de plantes» sur les deux souches.

Mots clefs : Miel, Plantes médicinales, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli,* Effet inhibiteur.

Abstract

Our study focuses the determination of inhibitory effect of natural formula based on a forest honey coupled with herbal extracts (Globe Daisy « Globularia alypum », peach « *Prunus persica* », juniper « *Juniperus communis* » and Jerusalem sage « *Phlomis fruticosa* »). We evaluated the antibacterial activity of each component alone and in association with others against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Thus, each component had a complete or partial antibacterial action on tested strains. The maximum diameters of the complete inhibition zones obtained are 17 mm for the honey diluted to 75 %,

28 mm for the Globe Daisy and 20 mm for the peach and juniper for a concentration of 0.24 g/ml. The binary association "honey-extract plant" was more active compared to multiple associations "honey-Plant extracts" on both strains.

Keywords: honey, medicinal plants, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli,* Inhibitory effect

Liste Des Acronymes

ADH : Arginine Dihydrolase

AMY : Amygdaline

ARA : Arabinose

ATCC: American Type Culture Collection

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CTT : Citrate

Da: Dalton

DEUG: Diplôme d'Etudes Universitaires Générales

***E coli* :** *Escherichia coli*

Éd : Édition

FTLQ : Fondation de technologie laitière du Québec

GEL : Gélatine

GLU : Glucose

HMF: Hydroxyméthyl-furfural

IND: Indole

INO: Inositol

ITA : Institut Technique de L'Apiculture

LDC : Lysine Décarboxylase

LEAV : Laboratoire de l'Environnement et de l'Alimentation de la Vendée

M : Mélange

MAN: Mannitol

MEL: Melibiose

mm : Mellimètre

ODC: Ornithine Décarboxylase

OIDA : Office pour l'Information et la Documentation en Apiculture

ONPG : Ortho-Nitro –Phenyl- Béta – D- Galactopyranoside

***S aureus* :** *Staphylococcus aureus*

SAC : Saccharose

SOR : Sorbitol

T° : Température

TDA : Tryptophane Désaminase

URE : Urée

VP : Voges Proskauer

Liste Des Tableaux

Tableau I.1 : Composition moyenne du miel ……. ……**4**

Tableau I.2 : Principaux caractères du miel ……..**5**

Tableau II.1: Ensemble du matériel utilisé (Appareillage, Verreries et Petit matériel, Produits chimiques et milieux) ……...……**18**

Tableau III.1 : Récapitulatif des principaux caractères biochimiques des deux souches d'***Escherichia coli*** tests utilisées (ATCC11105 et isolée) ……..**32**

Tableau III.2 : Corrélation entre les pics obtenus et les fréquences de vibration caractéristiques en infrarouge ……..…**39**

Tableau III.3 : Diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction de la température de chauffage du miel dilué à 75 % ……..…**40**

Tableau III.4 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction du pH du miel dilué à 75 % ……**43**

Tableau III.5: Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées selon les dilutions de miel ……...**45**

Tableau III.6 : Zones d'inhibition obtenues pour les deux méthodes d'extraction ……**49**

Tableau III.7 : Résultats de l'optimisation du rapport (m/v) ……**51**

Tableau III.8 : Résultat de la détermination des CMI ……**53**

Tableau III.9 : Association miel-plante ……..**54**

Tableau III.10 : Comparaison entre l'effet de l'association (Extrait Globulaire-miel) avec les effets de chaque composant seul ……**57**

Tableau III.11: Comparaison entre l'effet de l'association (Extrait Genévrier-miel) avec les effets de chaque composant seul ……**57**

Tableau III.12 : Comparaison entre l'effet de l'association (Extrait Pêcher-miel) avec les effets de chaque composant seul ……**58**

Tableau III.13 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple d'extraits avec les effets de chaque composant seul ……**59**

Tableau III.14 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M1 –miel) avec les effets de chaque composant seul ……....**61**

Tableau III.15 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M2 –miel) avec les effets de chaque composant seul ……**61**

Tableau III.16 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M3 –miel) avec les effets de chaque composant seul ……**62**

Tableau III.17: Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M4 –miel) avec les effets de chaque composant seul ……**62**

Liste Des Figure

Figure I.1	La Globulaire **(*Globularia alypum*)**.....	**8**
Figure I.2	Le Pêcher **(*Prunus persica*)**.....	**9**
Figure I.3	Le Genévrier **(*Juniperus communis*)**.....	**9**
Figure I.4	La Sauge de Jérusalem **(*Phlomis fruticosa*)**.....	**11**
Figure I.5	A) *E.coli* en coloration de Gram B) *E.coli* sur le milieu de MacConkey	**15**
Figure I.6	A) *S.aureus* en coloration de Gram B) Staphylocoques en microscopie à balayage.....	**16**
Figure II.1	Photo du miel étudié.....	**17**
Figure II.2	Photo de la galerie API 20^{E}.....	**19**
Figure III.1	La souche ATCC 11105d' ***Escherichia coli*** sur Hektoen.....	**31**
Figure III.2	Galerie « API 20E » des deux souches d'***Escherichia coli*** ATCC11105 et isolée.....	**32**
Figure III.3	La souche ATCC6538 de ***Staphylococcus aureus*** sur Chapman.....	**33**
Figure III.4	Coloration de Gram : **(A)** *Staphylococcus aureus* ATCC6538 **(B)** *Staphylococcus aureus* isolée.....	**33**
Figure III.5	Test positif de la coagulase avec la souche ATCC6538 de ***Staphylococcus aureus***.....	**34**
Figure III.6	Spectre Infrarouge du miel.....	**38**
Figure III.7	Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction de la température de chauffage du miel dilué à 75 %.....	**40**
Figure III.8	Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75 % et traité aux différentes températures: cas du *Staphylococcus aureus* ATCC6538 et *Escherichia coli* isolée.....	**40**
Figure III.9	Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75 % aux différents pH : cas de *Staphylococcus aureus* isolée et *Escherichia coli* ATCC.....	**43**
Figure III.10	Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction de pH du miel dilué à 75 %.....	**43**
Figure III.11	Détermination de la CMI du miel pour *Staphylococcus aureus* ATCC et *Escherichia coli* isolée.....	**45**
Figure III.12	Variation des diamètres des zones d'inhibition bactéricides des souches	

testées selon les dilutions de miel..... **46**

Figure III.13 Photos des zones d'inhibition des deux souches de collection correspondantes aux deux méthodes d'extraction concernant le pêcher et *Phlomis.f*..... **49**

Figure III.14 Zones d'inhibitions des deux souches pour certains rapports (m/v) des quatre plantes testées..... **50**

Figure III.15 Résultat de la détermination des CMI des extraits des deux plantes : le genévrier avec les deux souches de *Staphylococcus aureus* et la globulaire pour les deux souches d'*Escherichia coli*..... **52**

Figure III.16 Résultats de l'antibiogramme pour la globulaire, le genévrier et le pêcher **55**

Figure III.17 Résultats de l'antibiogramme pour certaines dilutions de miel..... **63**

Figure IV.1 Feuilles sèches de ***Globularia alypum***

Figure IV.2 Feuilles sèches de ***Prunus persica***

Figure IV.3 Feuilles sèches de ***Juniperus communis***

Figure IV.4 Feuilles sèches de ***Phlomis fruticosa***

Table Des Matières

Introduction ……**1**

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le Miel ……**3**

I.2.Types de miel……**3**

I.3.Caractéristiques du miel ……...**4**

I.4. Vertus thérapeutiques du miel ……**6**

I.5. Le miel de forêt ……**6**

II. Les Plantes Médicinales ……**7**

II.1. Définition ……**7**

II.2. La Globulaire (*Globularia alypum*) (Tasselgha) ……**7**

II.3. Les feuilles de pêcher (*Prunus persica*) (ourek El khoukh) ……...**8**

II.4. Le Genévrier (*Juniperus communis*) (El Aaraar) ……..**9**

II.5. La Sauge de Jérusalem (*Phlomis fruticosa*) (Khiate lejrah) ……**10**

III. Méthodes d'extraction solide-liquide ……**11**

III.1. La Macération ……**12**

III.2. La Décoction ……..**12**

IV. Usage des molécules à effet antimicrobien ……...**12**

IV.1. Les antibiotiques ……**12**

IV.2. Le miel et les plantes : produits naturels à effet alternatif aux antibiotiques standards .**13**

IV.3. Estimation de l'effet inhibiteur d'une molécule à effet antimicrobien ……...**13**

1. Définitions de la CMI/ CMB ……...**13**

2. Principales méthodes de détermination de la CMI ……..**14**

2.1 La méthode par diffusion en gélose ou méthode de Kirby-Bauer ……**14**

IV.4 Principaux germes tests ……..**14**

Escherichia coli ……..**15**

Staphylococcus aureus ……...**16**

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel ……**17**

I.1. Matériel biologique ……...**17**

I.1. Matériel non biologique ……**17**

II. Méthodes ……**19**

II.1. Tests de confirmation des souches ……...**19**

II.1.1.*Escherichia coli*.....**19**

1) Isolement sur Hektoen ……**19**

2) Identification sur « Galerie API 20E » ……...**19**

II.1.2 *Staphylococcus aureus* **20**

1) Ré isolement sur Chapman ……..**20**

2) Coloration de Gram ……**21**

3) Test de la Coagulase (en tube) …….....**21**

II.2. Analyses physico-chimiques du miel……... **22**

1. Mesure de la densité .....……**22**

2. Détermination de l'indice de réfraction et de la teneur en eau……..…… **22**

3. pH ….....……**22**

4. Détermination de la conductivité électrique ....……**23**

5. Dosage des sucres réducteurs ……...……..**23**

6. Analyses polarimétriques …....……**25**

7. Etablissement des spectres infrarouge ……...……**25**

II.3 Etude de l'effet antibactérien du miel ……...**26**

1. Effet de la température ……**26**

2. Effet du pH ……...**26**

3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) ……**27**

II.4 Etude de l'effet antibactérien des plantes ……..**27**

II.4.1Choix de la méthode d'extraction ……**27**

1) La décoction ……..**27**

2) La macération à chaud……... **27**

II.4.2 Optimisation du rapport (masse/volume)……... **28**

II.4.3 Détermination de la CMI des extraits…….. **29**

II.5 Association miel-Extraits des plantes……... **29**

1. Etude de l'activité antibactérienne des associations binaires « miel-Extrait»……**29**

2. Etude de l'effet antibactérien des associations multiples « miel-Extraits»…….. **30**

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

I.1. Tests de confirmation des souches…… **31**

I.1. *Escherichia coli* ……..……**31**

1) Isolement sur Hektoen…….…… **31**

2) Identification sur « Galerie API 20E »…… **31**

I.2. *Staphylococcus aureus* ……..**32**

1) Ré isolement sur Chapman ……**32**

2) Coloration de Gram ……**33**

3) Test de la Coagulase (en tube) ……...**33**

II. Analyses physico-chimiques du miel…….. **34**

II.1Mesure de la densité……... **34**

II.2 Détermination de l'indice de réfraction et de la teneur en eau…… **34**

II.3 pH…….…… **35**

II.4 Détermination de la conductivité électrique…… **35**

II.5 Dosage des sucres réducteurs…… **35**

II.6 Analyses polarimétriques…….. **36**

II.7 Etablissement des spectres infrarouge ……...**37**

III. Etude de l'effet antibactérien du miel ……**40**

III.1Effet de la température ……..**40**

III.2 Effet du pH ……...**42**

III.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice……..…….**45**

IV. Etude de l'effet antibactérien des plantes ……..**48**

IV.1. Optimisation de la méthode d'extraction ……**48**

IV.2 Optimisation du rapport (masse/volume) ……**50**

IV.3 Détermination de la CMI des extraits ……..**52**

V. Association miel-Extraits des plantes ……..….**54**

V.1 Etude de l'activité antibactérienne des associations binaires « miel-Extrait» ……..**54**

V.2 Etude de l'effet antibactérien des associations multiples « miel-Extraits» ……...**59**

Conclusion ……...**64**

Références Bibliographiques

Annexe

Introduction

Les maladies infectieuses sont des risques collectifs qui posent des défis spécifiques. En effet, le nombre des maladies infectieuses émergentes et non émergentes a augmenté au cours du siècle dernier. Parallèlement, le nombre d'épidémies a également augmenté de façon beaucoup plus spectaculaire (Morand et Figuié, 2016). En Afrique, comme dans les autres zones en développement, la mortalité générale est due avant tout aux maladies infectieuses (Libbey, 2002).

Depuis l'introduction de la pénicilline dans les années quarante, les médicaments antimicrobiens, tels que les antibiotiques, occupent un rôle essentiel dans le traitement des maladies infectieuses. Toutefois, Soixante-dix ans plus tard, ces applications sont gravement menacées (Commission Européenne, 2011). Les antibiotiques, trop largement dispensés, ont engendré des résistances bactériennes les rendant inefficaces dans certaines maladies infectieuses (Scimeca et Tétau, 2005).

L'apithérapie – la thérapie par les abeilles – est un traitement à base d'abeilles et de leurs productions. Ses origines sont anciennes: la première ordonnance connue prescrivant du miel a été inscrite sur une tablette d'argile retrouvée dans la vallée de l'Euphrate et remonte à 2 100 et 2 000 av. J.-C. Traditionnellement, le miel est considéré comme un médicament ou un tonique, plutôt qu'une nourriture quotidienne. De nos jours, le miel est de plus en plus reconnu pour ses propriétés curatives (Bradbear, 2010). Les utilisations thérapeutiques du miel comprennent le traitement des blessures, les ulcères, les brûlures, la mycose orale, la chimioprévention, la dermatite et la gangrène. Il est de plus en plus utilisé comme agent antibactérien topique pour le traitement des infections de surfaces, qui comprennent les ulcères et escarres, et celles causées par des brûlures, des blessures et des plaies chirurgicales (Boukraâ, 2013). Dans de nombreux cas, il est utilisé avec succès sur les infections ne répondant pas à la thérapie antibiotique et antiseptique standard. Son efficacité dans l'élimination rapide des infections et la promotion de la guérison n'est pas surprenant compte tenu du grand nombre de résultats de recherche sur son activité antibactérienne (Molan, 2009). En plus de leurs propriétés thérapeutiques intrinsèques, les miels présentent également un intérêt comme vecteur d'autres agents thérapeutiques. Cela signifie que, grâce à leur pression osmotique favorable, ils constituent de bons véhicules permettant d'améliorer le degré d'assimilation par l'organisme d'autres produits à action thérapeutique (Bessas, 2008).

La phytothérapie (du grec phyton (plante) et thérapeuein (soigner)) est l'art de soigner à l'aide des plantes ou encore la thérapeutique par les plantes (Rwangabo, 1993). Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne. Peu d'espèces végétales sont connues et seule une minorité d'entre elles est explorée chimiquement. La rareté des maladies chez les plantes sauvages s'explique par l'élaboration d'un système de défense naturelle, qui leur permet de lutter efficacement contre les pathogènes. Pour se protéger contre les bactéries, les champignons et les virus, les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes. En fait, les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules (MM < 500 Da) dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites. Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives (Guinoiseau, 2011).

Notre objectif consiste à l'étude de l'effet inhibiteur naturel d'un miel de forêt couplé avec les extraits de plantes médicinales. Ces derniers sont obtenues à partir des feuilles sèches des plantes suivantes : la globulaire, le pêcher, la sauge de Jérusalem et le genévrier. Cette association a pour but de combiner le pouvoir antibactérien de ces antibiotiques naturel pour aboutir à une action synergique vis-à-vis des deux espèces *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Dans ce contexte, notre recherche peut être subdivisée en trois principales parties :

- La première partie est consacrée au miel qui subit une caractérisation physicochimique puis une étude de l'influence de deux paramètres physicochimiques (pH et température) sur son activité antibactérienne pour aboutir à la fin à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du miel.
- La deuxième est réservée à l'étude des plantes. Elle est amorcée par l'optimisation de la méthode d'extraction et du rapport masse/volume pour arriver à la détermination de la CMI de chaque extrait de plante.
- La dernière partie comporte l'étude de l'association du miel-extraits de plantes en s'appuyant sur les résultats des parties précédentes. Deux types d'association ont été testés : binaire « miel-Extrait de plante » et multiples « miel-Extraits des plantes».
- La clôture se fait par une conclusion générale.

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le Miel

I.1.Définition

La définition officielle du miel selon le décret du 30 juin 2003 et qui intègre les règles européennes est la suivante: « Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes ou des excrétions laissées sur celles-ci 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 ».Tout produit ne répondant pas à cette définition ne peut recevoir la dénomination de vente «miel » (Goût, 2008).

I.2.Types de miel

Le miel réalisé à partir d'une seule espèce de fleur est un miel mono floral (on dit encore unifloral). Dans cette catégorie, on trouve le miel de kapok, de banane ou de café. Quand le nectar est collecté sur plusieurs espèces de fleurs, on parle alors de miel toutes fleurs ou multifloral.

Le nectar contient une toute petite quantité de pollen que l'on retrouve dans le miel. Le pollen se trouve dans les anthères de toutes les plantes où les abeilles butinent. On peut identifier le pollen au moyen d'un microscope : famille végétale, genre ou espèce d'origine.

Les abeilles recueillent également du miellat. Ce sont les gouttes de rosée qui perlent des fleurs tôt le matin ou du nectar extrafloral provenant d'autres parties de la plante comme les sépales, la tige ou la feuille. Le miel du miellat contient de nombreuses autres substances provenant des pétales de fleur, de la tige ou des feuilles et à une forte teneur en ferments et microparticules; d'où une cristallisation rapide de ce miel qui est souvent trouble, aigrelet et qui se conserve moins longtemps.

Le miel centrifugé : miel « moderne » ne contient qu'une infime quantité de pollen. Le miel provenant de ruches traditionnelles, pressé ou écrasé peut contenir une grande quantité de pollen. Il est de moindre qualité et il se conserve moins longtemps que les sortes de miel modernes. En revanche, il est bien plus riche en matières nutritives (Mutsaer et *al*., 2005).

I.3.Caractéristiques du miel

Le miel est un produit naturel, complexe et complet qui contient un grand nombre de substances intervenant dans le bon équilibre de notre fonctionnement biologique. On comprend donc aisément que la parfaite synergie entre les 200 éléments présents est absolument impossible à recréer artificiellement. Le **tableau I.1** donne la composition moyenne du miel (Domerego et *al*., 2007). Les principaux caractères du miel sont résumés dans le **tableau I.2**.

Tableau I.1 : Composition moyenne du miel (Domerego et *al*., 2007).

	Proportion	**Origine**	**Précisions**
Eau	17.2 %	Nectar	-Pourcentage autour duquel les abeilles operculent les alvéoles -Eau riche en deutérium
Sucres	79 %	Nectar	Lévulose, glucose, saccharose, maltose, isomaltose, maltotriose
Acides	- (présents)	Abeille ou plante	Acide gluconique essentiellement
Matières minérales	0.2-1 %	Dépend du type du sol	Potassium, calcium, sodium, magnésium… Une trentaine d'oligoéléments
Protides	0.26 %	Abeille ou plante	- 1.7g/kg de miel - Peptones, albumines, globulines, nucléo-protéines
Enzymes	- (présentes)	Abeille	- Invertase, α et β- amylase, etc. - Enzymes thermolabiles dès 40 °C -Permettent la détection des fraudes
Lipides	- (Présents)	Microparticules de cire	Simples défaut de filtration sans gravité.
Vitamines	Peu nombreuses	Pollen	Vitamine B1 à B9.

Tableau I.2 : Principaux caractères du miel.

Caractère	Description	Référence
Coloration	La gamme des colories s'étend du clair, quasiment incolore, au plus foncé, presque noir.	(Domerego et *al*., 2007)
Goût	Les goûts sont très variés, du plus doux au plus fort.	(Domerego et *al*., 2007)
Arôme	Les méthodes de chromatographie ont permis d'isoler plus de cinquante substances aromatiques.	(Domerego et *al*., 2007)
Aspect	Le miel peut être fluide, épais ou cristallisé.	(Magalon et Vanwijck, 2003)
pH	Le miel est acide (pH ≈ 4)	(Magalon et Vanwijck, 2003)
Température	Dans la ruche, le miel est le plus souvent à une température voisine de 34°C. Son extraction va l'amener dans les régions tempérées aux environs de 20°C.	(Jacquot et *al*., 2011)
Densité	Environ 1.4	(ITA et OIDA, 2004)
Viscosité	Le miel est un corps plus ou moins visqueux, notamment au dessous de 20°C, peut devenir fluide dès qu'il atteint 30 à 35 °C.	(ITA et OIDA, 2004)
Hygroscopie	Le miel est hygroscopique ; si on le laisse au contact de l'air ambiant, il peut atteindre une hygrométrie de 55% en 3 mois et la fermentation est inéluctable.	(Magalon et Vanwijck, 2003)
Cristallisation	Presque tous les types de miel se cristallisent quand leur température est inférieure à 15-24°C.	(Bradbear, 2005)
Taux d'HMF	La valeur moyenne doit être 40 mg/kg au maximum. Plus ce taux est faible, plus le phénomène de vieillissement de miel sera retardé.	(Perrin et Cahé, 2009)
Absorption de la lumière	L'absorption de la lumière par le miel est toujours plus importante pour les faibles longueurs d'onde.	(Jacquot et *al*., 2011)

I.4. Vertus thérapeutiques du miel

Le miel présente de nombreux atouts pour la santé, de ses qualités nutritionnelles à son pouvoir antiseptique (Domerego et *al*., 2007). Ainsi, de manière générale et résumée, on peut dire que le miel (Lefief-Delcourt, 2010):

- Combat la fatigue et l'anémie, grâce à sa richesse en sucres et sa capacité à favoriser la fixation des sels minéraux.
- Empêche la prolifération des bactéries, virus et champignons.
- Facilite la digestion, le travail de l'estomac et améliore le métabolisme. Il a aussi un effet laxatif.
- Permet de prévenir l'apparition de certains cancers, maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives grâce à la présence d'antioxydants et notamment des flavonoïdes. A savoir : plus un miel est foncé, plus il est riche en flavonoïdes.
- Est un bon tonique cardiaque.
- Calme la toux et soulage les maux de gorge.
- Met en appétit.
- Permet de renforcer les défenses immunitaires.
- Est un bon remède contre la nervosité, le stress et les insomnies, grâce à son effet calmant.
- Lutte contre le vieillissement grâce à sa richesse en antioxydants.

I.5. Le miel de forêt

Parmi les produits forestiers d'importance, on trouve le miel de Forêt. En 2005, la valeur totale d'extraction de miel et de la cire d'abeille est de 1.8 milliard de dollars (Mille et Louppe, 2015). Le miel de forêt est caractérisé par une couleur sombre, un goût assez intense et boisé. L'origine botanique dominante est la ronce, le châtaigner, la bruyère, le tilleul et le chêne (Lefief-Delcourt, 2010).

La flore, très différente d'un terroir à un autre, engendre de grandes disparités de récoltes et des miels aux arômes forts différents les uns des autres et souvent d'une année à l'autre (Clément, 2013). Ceci dépend de plusieurs facteurs (Balleux et Van Lerberghe, 2001):

- La valeur apicole des espèces est égale à la somme de leurs potentiels nectarifère et pollinifère respectifs.

- Leur recouvrement spécifique : l'aptitude mellifère varie en fonction de la présence abondante ou rare de chaque espèce ligneuse.
- Leur date de floraison pour évaluer l'aptitude mellifère suivant les saisons.

II. Les Plantes Médicinales

II.1. Définition

Une plante dite « médicinale» est une plante qui a des propriétés thérapeutiques. Actuellement grâce aux progrès scientifiques, la thérapeutique a beaucoup évolué pour arriver à sa forme actuelle qui utilise certaines plantes comme matières premières. L'utilisation des plantes médicinales doit être envisagée sous deux aspects (Catier et Roux, 2007):

- L'utilisation de la plante comme médicament : c'est ce que l'on entend aujourd'hui sous le terme de phytothérapie et dans ce cas il ne peut s'agir que de plantes peu ou pas toxiques.
- L'extraction des substances actives contenues dans les végétaux qui entrent alors dans la formulation de préparations et de spécialités ; dans ce cas on manipule souvent des principes actifs particulièrement toxiques.

II.2. La Globulaire (*Globularia alypum*) *(Tasselgha)*

1. Description

C'est une plante aromatique et médicinale appartenant à la famille des *Globulariaceae* (Boutemak et al., 2014). Il s'agit d'un sous-arbrisseau de 30-60 cm, très rameux en buisson, ordinairement dressé. Les feuilles toutes éparses sur les rameaux, coriaces, persistantes, oblongues ou obovales, atténuées en court pétiole, entières ou bi-tridentées, mucronées et uninervées **(Figure I.4)**. Les fleurs sont d'un beau bleu, odorantes, en têtes subsessiles, terminales et latérales, larges de 15-20 mm - folioles de l'involucre ovales, ciliées au bord - réceptacle et paillettes hérissés - calice longuement barbu, à divisions profondes presque égales - corolle à lèvre supérieure presque nulle, l'inférieure à 3 lobes ovales-aigus (Site 1, 2011).



Figure I.1: La Globulaire **(*Globularia alypum*)**
(Site 2).

2. Propriétés médicinales

En Algérie, cette espèce connue sous le nom "Tasselgha" est largement utilisé dans la médecine populaire pour ces de nombreuses propriétés: anti-inflammatoires, antiulcéreux, antidiabétiques, antioxydant, pour les maladies cardio-vasculaires, rénales et diverses lésions cancéreuses de l'estomac, du côlon, du rectum et œsophage (Boutemak et al., 2014).

En outre, en décoction de 40g/L pendant 10min (une tasse par jour), la globulaire est indiquée pour le traitement :

- de la constipation,
- de la Pneumonie,
- des hémorragies gastriques et pulmonaires,
- des maladies des articulations, la goutte.

En décoction de 30g/L jusqu'à réduction du volume de moitié (une tasse à jeun), la globulaire est indiquée comme purificateur du sang (Cheref, 1987).

II.3. Les feuilles de pêcher (*Prunus persica) (ourek El khoukh)*

1. Description

Le Pêcher fait partie des arbres du genre *Prunus* de la famille des *Amygdalacées* (Ramade, 2008). C'est un arbre fruitier pouvant atteindre 6 m de haut. Ses branches portent des feuilles vertes, lisses, finement dentées, étroites et pointues **(Figure I.2)**. Au printemps, les branches se couvrent de fleurs solitaires de couleur rose, qui laissent ensuite la place à un fruit bien connu : la pêche. La graine contenue dans le noyau dur de la pêche est pressée pour obtenir l'huile de pêche, utilisée dans les cosmétiques et l'aromathérapie (Morigane, 2007).



Figure I.2: Le Pêcher **(*Prunus persica*)**
(Morigane, 2007)

2. Propriétés Médicinales (Morigane, 2007)

- En usage interne, le Pêcher est utilisé pour traiter la constipation des enfants, la coqueluche, l'arthritisme, la goutte, et la lithiase urinaire.
- En usage externe on utilise le Pêcher pour soigner les brûlures et les contusions.
- On l'utilise aussi pour soigner l'oxyure des enfants.
- les Japonais utilisent la Pêche pour accroître la fertilité.

L'usage médicinal du pêcher se fait principalement par une décoction purgative constituée de 60 g de feuilles fraîches par litre d'eau.

II.4. Le Genévrier (*Juniperus communis) (El Aaraar)*

1. Description

Le Genévrier est un arbuste conifère de la famille *Cupressacées*, à feuilles verticillées et effilées **(Figure I.1)**, à fleurs mâles jaunes et à fleurs femelles bleues groupées en chatons, et cônes fructifères sphériques de couleur bleu-noir (quelquefois 15 m de haut) (Iserin et al., 2001).



Figure I.1: Le Genévrier **(*Juniperus communis*)**
(Morigane, 2007)

2. Constituants

1 à 2 % d'huile essentielle renfermant plus de 60 composants, dont le myrcène, le sabinène, des alphapinènes et bêtapinènes et du cinéol, tanins, diterpènes, sucres, résine amer (junipérine) (Iserin et al., 2001).

3. Effets et usages médicinaux (Iserin et al., 2001).

- Tonique et diurétique, le genévrier est un puissant antiseptique des voies urinaires.
- Remède efficace contre les cystites, il facilite le drainage, mais ne doit pas être employé en cas d'insuffisance rénale.
- Le genévrier fortifie le système digestif, soulage les coliques et stimule l'activité de l'estomac. Par voie interne ou externe, il se révèle efficace dans le traitement des arthrites chroniques, de la goutte et des rhumatismes.
- En application, l'huile essentielle diluée calme les inflammations ; elle est censée favoriser le drainage des tissus sous-cutanés.
- Enfin, le genévrier stimule le flux menstruel.

Pour l'usage interne, le genévrier peut être utilisé sous forme de teinture mère de baies à raison de 15 gouttes dans une infusion après les repas, l'extrait aqueux à raison de 1 à 5 g par jour, sous forme de potion ou de pilules, ou l'essence à raison de 0,10 à 0,20 g par jour dans du miel (Morigane, 2007).

II.5. La Sauge de Jérusalem (*Phlomis fruticosa*) *(Khiate lejrah)*

1. Description :

C'est une plante qui fait partie de la famille des *Lamiaceae* (Zafran, 2012). Cette famille est représentée par environ 250 genres et 3000 espèces dans les plantes à fleurs (Ulukanli et Akkaya, 2011). Les feuilles des espèces de *Phlomis* sont ondulées et opposées, lancéolées, oblongues-ovales ou elliptiques et sont densément poilues et souvent coriaces (Mathiesen, 2006).

Phlomis fruticosa est un Sous-arbrisseau de 20-50 cm, tomenteuse-blanchâtre, à tiges terminées par des rameaux simples et dressés. Les feuilles sont assez larges, ovales ou oblongues, et sont à la base en forme de cœur, blanchâtres-tomenteuses surtout en dessous, fortement nervées- réticulées. Les fleurs sont jaunes, grandes, 20-30 par verticille disposées en spirales, 1-3 au sommet des rameaux. Les bractéoles sont ovales lancéolées, pluri-nervées, tomenteuses et velues. Le calice (ensemble des sépales) est tronqué à dents très courtes (1-2 mm), raides et recourbées. La corolle (ensemble des pétales) de 2-3 cm, velue-tomenteuse en dehors (Site 3, 2011 ; Malone, 2016) **(Figure I.3)**.



Figure I.4: La Sauge de Jérusalem **(*Phlomis fruticosa*)**
(Mathiesen, 2006)

Une étude portée sur l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Phlomis fruticosa* a identifié quarante composants dont β-caryophyllene (12%), (E) -méthyl isoeugénol (15,3%) et α-asarone (10,9%). Une autre étude sur l'activité antimicrobienne de *Phlomis fruticosa* a révélé l' α-pinène (39-57%) comme constituant majeur (Demirci et al., 2003).

2. Propriétés Médicinales

Les espèces de *Phlomis* sont employées pour traiter troubles des voies respiratoires ou la cicatrisation des plaies jusqu'à ce jour. Cependant, certains membres des espèces de *Phlomis* ont été consommés dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles gastro-intestinaux et aussi comme antitussif, tonique, sédatif, carminatif et astringent (Sarkhail et al., 2014).

Dans la médecine traditionnelle Turque, les fleurs et/ou les feuilles des espèces de *Phlomis* sont communément utilisées comme des tisanes, comme tonique, carminatif, apéritif et stimulant et anti douleur pour les maux d'estomac. D'autres applications de la médecine traditionnelle l'intègrent également dans le traitement des blessures et dans le traitement des désordres de l'estomac. L'extrait éthanoïque de *Phlomis fruticosa* (20 et 100µg par disque) possède une activité antimicrobienne (Ulukanli et Akkaya, 2011).

III. Méthodes d'extraction solide-liquide

Il s'agit d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant. Les cas les plus simples correspondent à la décoction, l'infusion et la macération. Les principes actifs d'une plante médicinale sont des agents chimiques capables d'une activité. La présence des ces composants souvent en quantité extrêmement faible dans la plante impose des séparations, généralement, délicates. La décoction, l'infusion et la macération sont les

méthodes de séparation les plus utilisées pour l'extraction globale des principes actifs et qui sont suivies par des série de séparation chromatographique pour atteindre une matière pure d'un principe actif (Kalla, 2012).

III.1. La Macération

On obtient une macération, en laissant une plante dans un solvant (eau, alcool ou huile) à froid pendant un temps assez long (de quelques heures à plusieurs jours, voire plusieurs semaines). La macération doit se faire dans un récipient à l'abri de l'air et de la lumière. Une fois le temps écoulé, il suffit de filtrer le mélange à travers un filtre papier, ou du coton hydrophile non tissé, et de stocker la macération obtenue dans un récipient bien bouché (Morigane, 2007).

La température et la durée de traitement des macérations sont des facteurs déterminants. La température affecte la perméabilité des cellules (Damijanić et al.,2011). Certaines matières végétales nécessitent une macération dans de l'eau chaude avant qu'ils libèrent leurs huiles essentielles, car leurs composants volatils sont glycosidiques liés. La qualité des extraits et le spectre des constituants obtenus par macération à haute température est influencée par le rapport du médicament à base de plantes au solvant (Sukhdev et al.,2008).

III.2. La Décoction

On obtient une décoction, en faisant bouillir de façon prolongée, et à feu doux, une plante (avec un couvercle sur la casserole). Il faut mettre la plante dans l'eau encore froide, puis la faire bouillir entre 2 à 15 minutes (sachant que les écorces et les racines doivent bouillir plus longtemps que les feuilles et les tiges). Passez ensuite la décoction au filtre, avant de l'utiliser (Morigane, 2007).

IV. Usage des molécules à effet antimicrobien

IV.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Les sources principales d'antibiotiques sont les champignons, mais parfois aussi les bactéries. Pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes (hôte). Un antibiotique devra donc idéalement affecter une voie métabolique absente ou peu active chez les eucaryotes mais essentielle aux procaryotes, ou atteindre une cible spécifique aux procaryotes (Van Bambeke et Tulkens, 2007).

IV.2. Le miel et les plantes : Produits naturels à effet alternatif aux antibiotiques

Aujourd'hui, les bactéries résistent à un nombre croissant d'antibiotiques à cause des prescriptions massives et abusives de ces médicaments, de leur mauvaise utilisation ainsi des mutations génétiques des bactéries, etc. Face à ce constat, les scientifiques s'intéressent de plus en plus aux produits naturels susceptibles d'agir comme des antibiotiques mais sans créer de résistance. C'est le cas des extraits des plantes (pépins de pamplemousse, par exemple), mais aussi du miel (Lefief-Delcourt, 2010).

Cette particularité du miel est due à une enzyme, appelée glucose oxydase, qui produit du peroxyde d'hydrogène, un antiseptique reconnu et plus connu sous le nom d'eau oxygénée. Le miel contient aussi de nombreuses autres substances antibiotiques naturelles regroupées sous le nom d'inhibines (Lefief-Delcourt, 2010).

Les plantes sont riches en une grande variété de métabolites secondaires tels que les tanins, les alcaloïdes et les flavonoïdes dont les propriétés antimicrobiennes ont été découvertes in vitro. Certains manuels de la phytothérapie ont mentionné diverses plantes médicinales pour traiter les maladies infectieuses en raison de leur disponibilité, moins d'effets secondaires et une toxicité réduite. De nombreuses plantes ont été trouvées pour le traitement des infections des voies urinaires, les troubles gastro-intestinaux, les maladies respiratoires et les infections cutanées (Khan et al.,2009).

IV.3. Estimation de l'effet inhibiteur d'une molécule à effet antimicrobien :

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il faut garder à l'esprit qu'en pratique, on étudie l'effet des antibiotiques in vitro le plus souvent et dans des conditions normalisées de culture. Ainsi, il faut déterminer des corrélations afin de présumer de l'efficacité in vivo de l'antibiotique et donc de la réussite (ou de l'échec) du traitement sur la base de données biologiques in vitro (Burnichon etTexier, 2003).

1. Définitions de la CMI/ CMB:

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI. Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24H (Burnichon et Texier, 2003).

La concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration de l'antibiotique qui ne laisse que 0.01 % des bactéries survivantes (0.1% dans les pays anglo-

saxons) de l'inoculum initial, après 18 heures de culture à 37 °C. Un antibiotique est dit bactéricide quand les CMI sont proches des CMB (Mouton et al., 2000).

2. Principales méthodes de détermination de la CMI

La CMI n'est pas, pour une bactérie donnée, une constante biologique. La méthode par dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Cette détermination exige une standardisation rigoureuse du protocole expérimental (influence de l'inoculum, du délai séparant ensemencement et observation, milieu de culture), toute modification des conditions expérimentales rendant l'interprétation difficile (Burnichon et Texier, 2003).

D'autres méthodes sont applicables : dilutions successives en milieu liquide (croissance bactérienne appréciée par l'apparition d'un trouble) ; E-Test (bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique) (Burnichon et Texier, 2003).

2.1 La méthode par diffusion en gélose ou méthode de Kirby-Bauer

C'est la méthode manuelle la plus couramment utilisée. Elle est fondée sur le fait qu'un disque imprégné d'antibiotique et «déposé» sur une gélose nutritive préalablement inoculée par la suspension bactérienne à tester, va diffuser suivant un gradient de concentration, et que la bactérie ne se développera pas en présence de concentrations égales ou supérieures à la concentration minimale inhibitrice. Le procédé emploie des disques de 6 millimètres de diamètre dont le papier a été imprégné d'un antibiotique à concentration connue (Hayette et al., 2011).

A partir d'une suspension de bactéries, on inocule de manière standardisée une gélose nutritive. On dépose ensuite sur cette gélose des disques imprégnés d'antibiotique, qui va libérer un gradient progressivement décroissant d'antibiotique au fur et à mesure de l'éloignement du disque (diffusion centrifuge). Après incubation et croissance, on peut observer une zone circulaire d'inhibition autour du disque dont le diamètre sera plus ou moins grand suivant la sensibilité de la souche à l'antibiotique (Hayette et al., 2011).

IV.4 Principaux germes tests

En raison de ses propriétés inhibitrices et thérapeutiques, de nombreuses études se sont intéressées aux propriétés thérapeutiques du miel (Merah et al.,2010). Et en raison de leur utilisation populaire comme remèdes pour de nombreuses maladies infectieuses, les recherches pour les plantes contenant des substances antimicrobiennes sont fréquentes (Khan

et al., 2009). Pour atteindre leurs objectifs, les chercheurs ont employé une variété de germes afin d'évaluer les spectres de ces antibiotiques naturels dont les plus communément utilisés sont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Molan, 2009 ; Cortopassi-Laurino et Gelli,1991 ; Rezzag Mohcen, 2010 ; Ulukanli et Akkaya, 2011 ; Hassane et al, 2011).

***Escherichia Coli* :**

E. coli est une bactérie Gram (-) qui fait partie des *Enterobacteriaceae* **(Figure I.5)**. Elle est le plus souvent mobile et se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux gélosés usuels en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose-positif **(Figure I.5)**. Sur gélose au sang elles peuvent être hémolytiques (Avril et *al*., 1992).

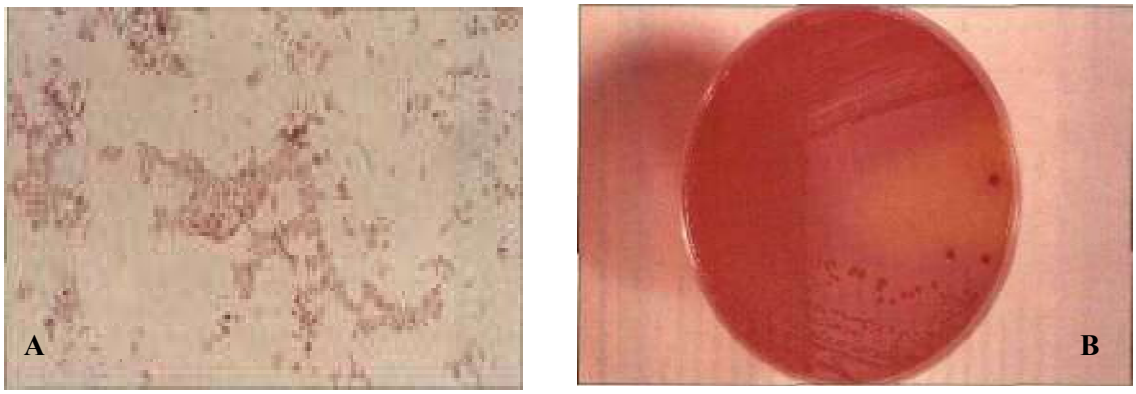


Figure I.5 : A) *E.coli* en coloration de Gram B) *E.coli* sur le milieu de MacConkey (Denis et *al*,.2008)

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10^9 corps bactériens par gramme de selles. La recherche d'*E. coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est faite pour apprécier sa potabilité. La présence d'*E. coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation (Avril et *al*., 1992). Enfin, *E coli* est une bactérie impliquée dans les infections urinaires, intestinales, néonatales et nosocomiales (Nauciel et Vildé, 2005).

Staphylococcus aureus

La famille des *Micrococcaceae* est composée de trois genres de cocci à Gram positif en amas **(Figure I.6)** dont *Staphylococcus* ayant (G + C) % de 30 - 39 %. Les espèces appartenant à ces trois genres possèdent une catalase et se développent en aérobiose (Avril et *al*., 1992).

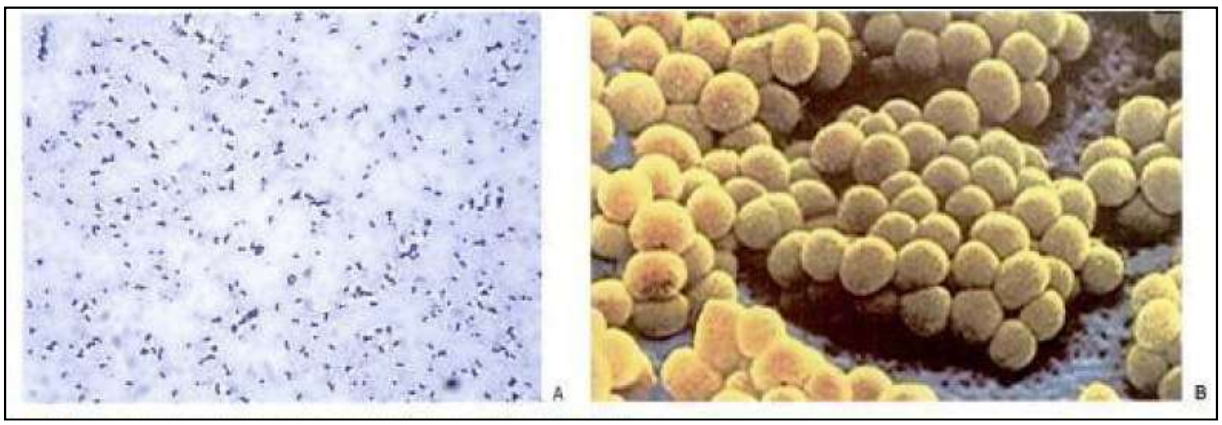


Figure I. 6: A) *S.aureus* en coloration de Gram B) Staphylocoques en microscopie à balayage (Denis et *al*,.2008)

Staphylococcus aureus se cultive facilement sur des milieux usuels et aussi sur des milieux riches en NaCl. Elle doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Elle possède une coagulase (enzyme provoquant la coagulation du plasma) et peut produire de nombreuses toxines (Nauciel et Vildé, 2005).

Les germes appartenant au genre *Staphylococcus* sont commensaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. *Staphylococcus aureus*, comme toute bactérie pyogène, est à l'origine d'infections suppuratives et nosocomiales. Les toxémies des staphylocoques sont associées à la production des toxines (Denis et *al*,.2008).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de Saidal, l'EPSP (Etablissement Public de Santé de Proximité), et le Hall technologique de l'université Yahia Farès de Médéa. Elle avait pour objectif l'étude de l'effet inhibiteur naturel d'un miel couplé avec les extraits de plantes médicinales.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

1. Le miel : C'est un miel des forêts de type multi floral provenant de la région de Ben Chicao. Il s'agit d'un liquide visqueux partiellement cristallin, brun sombre et ayant un goût indéfini **(Figure II.1)**.



Figure II.1: Photo du miel étudié

2. Les plantes : Nous avons étudiés quatre espèces à savoir la globulaire « *Globularia alypum* », le pêcher « *Prunus persica* », le genévrier « *Juniperus communis* » et la sauge de Jérusalem « *Phlomis fruticosa* ». Seule la partie foliacée était utilisée à l'état sec **(Annexe 1)**.

3. Les souches bactériennes : Deux espèces ont été utilisée

- *Escherichia coli* avec une souche ATCC11105 et une souche isolée.
- *Staphylococcus aureus* dont une souche ATCC6538 et une souche isolée.

I.2. Matériel non biologique : Le **tableau II.1** résume l'ensemble du matériel utilisé durant la partie expérimental.

Tableau II.1: Ensemble du matériel utilisé.

Verreries et Petit matériel	• Verreries (Pipettes+Poires, Burettes, Eprouvettes, Tubes à essai, Tubes stériles, Béchers, Ballon, Erlenmeyers, Entonnoirs, Flacons, ….) • Bec Bunsen, Anse de platine, Pipettes Pasteur, Lames et lamelles, Boîtes de Pétri, • Micropipettes, Embouts stériles • Papier buvard. • Papier filtre
Appareils	• Autoclave type *Ogawa seik 6500* • Poupinelle type *Jumo* • Microscope optique type *Motic* • Réfrigérateur type *ENIEM* • Une étuve type *Növe EN 500* • Agitateur type *Ovaw* • Balance type *Sartorius* • Bain Marie type *Jouan* • Réfractomètre type *Abbe 60* • pHmètre type *Hanna* • Polarimètre type *Laurent* • Conductimètre type *Orion 3 stars* • Thermomètre type *Checktemp Hanna* • Chauffe ballon type *Wisd* • Spectrophotomètre Infrarouge FTIR-800 type *IN FRARED*
Produits, Réactifs Solutions	Hydroxyde d'ammonium, Liqueur de Fehling, Sulfate ferrique, Acide sulfurique, Permanganate de Potassium, Violet de gentiane, Lugol, Fushine, L'huile d'immersion, HCl, NaOH, Eau distillée.
Milieux de culture	Milieu Mueller- Hinton, Milieu Hektoen, Milieu Chapman, Bouillon nutritif, Gélose nutritive. Galerie biochimique API20E + Réactifs correspondants.

II. Méthodes

II.1. Tests de confirmation des souches

II.1.1. ***Escherichia coli*** : Les deux souches ont été tout d'abord ré-isolées (à partir des milieux de conservations) sur le milieu d'Hektoen puis identifiée sur une galerie Api 20 E.

1) Isolement sur Hektoen

Principe : Le milieu Hektoen est utilisé pour l'isolement et la différenciation des Entérobactéries pathogènes. Il permet également la mise en évidence de la production d'H_2S et la dégradation du lactose (Chringel, 2011).

Technique : Une parcelle de la culture sur gélose inclinée a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur puis transférée stérilement sur un bouillon d'enrichissement. Après quelques heures d'incubation, nous avons réalisé un isolement sur le milieu Hektoen. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

2) Identification sur « Galerie API 20E »

C'est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés (BioMérieux, 2010).

Principe : La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés **(Figure II.2)**. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (BioMérieux, 2010).

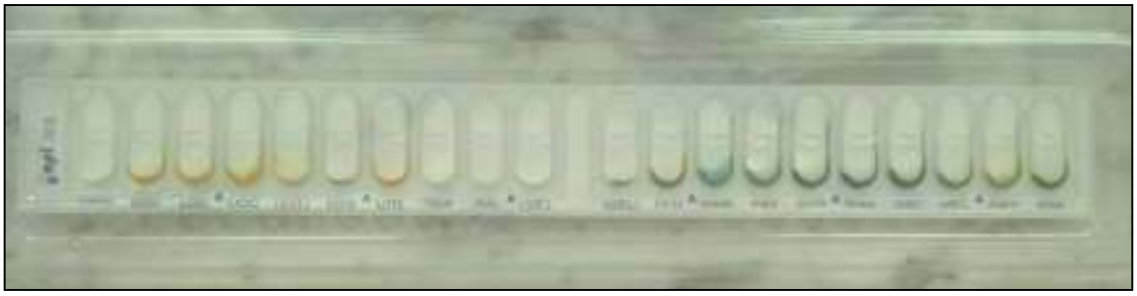


Figure II.2: Photo de la galerie API 20E

Préparation de la suspension bactérienne : Une colonie bien isolée est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et déchargée dans 1 ml d'eau physiologique puis incubée à 37°C pendant 15 mn.

Inoculation de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
    - pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,
    - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
    - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H_2S, URE, créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

Lecture de la Galerie :

• Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant aux tableaux de lecture **(Annexes 2, 3 et 4).** Noter toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive

. - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

II.1.2 ***Staphylococcus aureus*** : Les deux souches ont été tout d'abord ré-isolées (à partir des milieux de conservations) sur le milieu sélectif « Chapman ». L'identification est ensuite complétée par une coloration de Gram et le test « Coagulase».

1) Ré isolement sur Chapman

Principe : Le milieu de Chapman est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement des Staphylocoques pathogènes qui donnent des colonies jaunes par fermentation du mannitol

avec un virage du milieu vers le jaune (virage de la couleur du rouge de phénol du rouge vers le jaune). Sa forte teneur en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces (Indicia, 2012).

Technique : Une parcelle de la culture sur gélose a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur puis transférée stérilement sur un bouillon d'enrichissement. Après quelques heures d'incubation, nous avons réalisé un isolement sur le milieu Chapman. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

2) Coloration de Gram: C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés et la composition de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classifier. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme (Sordalab, 2013).

Technique (DEUG, 2006)

Etape 1: ***Réalisation d'un frottis :*** Une goutte d'eau est déposée au centre d'une lame de façon à faire une suspension homogène avec une seule colonie prélevée à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée. On laisse sécher en chauffant légèrement la lame au-dessus de la flamme.

Etape 2: ***Coloration au violet de Gentiane et d'un mordançage par une solution de Lugol :***

- Recouvrir toute la lame au Violet de Gentiane. Laisser 1 minute.
- Chasser le violet avec le Lugol. Laisser 1 minute.
- Rincer à l'eau. Egoutter la lame.

Etape 3 : ***Décoloration à l'alcool :***

- Recouvrir la lame d'alcool. Attendre 15 secondes.
- Rincer immédiatement à l'eau. Laisser un peu d'eau sur la lame.

Etape 4 : ***Recoloration à la fuchsine :***

- Mettre 2 gouttes de Fuchsine. Laisser 1 minute.
- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher délicatement la lame dans un papier jetable. Nettoyer au besoin le dessous de la lame avec un papier jetable. La lame doit être totalement sèche.
- Observer à l'objectif x 100 (objectif à immersion).

3) Test de la Coagulase (en tube) : *S. aureus* fabrique une exo enzyme capable de coaguler en quelques heures le plasma humain (ou de lapin) citraté ou hépariné (Angandza, 2012). Ce

test, mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma, est le principal test caractérisant *S. aureus*. Il permet donc de différencier le Staphylocoque doré des Staphylocoques- coagulase négative. Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma de lapin et de la souche à tester. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90° indique une Coagulase + (Hayette et al., 2011).

II.2. Analyses physico-chimiques du miel

1. Mesure de la densité

La masse volumique notée ρ est définie comme la masse par unité de volume et la densité d'une substance est égale à sa masse volumique divisée par la masse volumique du corps de référence à la même température. Pour les liquides et les solides, l'eau est utilisée comme référence. Elle est notée **(d)** et n'a pas d'unité (grandeur physique sans dimension) (Daoudi, 2015).

$$\boldsymbol{d = \frac{\rho_{substance}}{\rho_{eau}}} \text{ ..... (1)}$$

Alors, pour déterminer ce paramètre, il suffit de peser dans une éprouvette 5 ml de miel à l'aide d'une balance puis calculer la masse volumique et la densité du miel analysé.

2. Détermination de l'indice de réfraction et de la teneur en eau

L'indice de réfraction est une propriété optique qui caractérise toute substance transparente. L'indice de réfraction du miel est mesuré au moyen d'un réfractomètre. C'est la méthode qui sert de référence pour la détermination de la teneur en matière sèche d'un miel (ITA et OIDA, 1979). Pour cela une goutte de miel est déposée sur le prisme du réfractomètre qui sera fermé pour lire l'indice de réfraction. La température du prisme doit être notée, car si la mesure a été effectuée à une température différente de 20° C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20° C. La correction est additive, si la mesure est faite au-dessus de 20° C, soustractive dans le cas contraire. Le terme correctif est de 0,00023 par degré C (Arrêté n°80-367/CG, 2009). En se référant au tableau de Chataway, nous déduisons la teneur en eau **(Annexe 5)**.

3. pH

L'acidité est un critère de qualité important. La fermentation du miel provoque une augmentation de l'acidité dans le miel (LEAV, 2014). Le pH est mesuré sur une solution de miel à 10% dans l'eau distillée à l'aide d'un pH-mètre (Arrêté n°80-367/CG, 2009).

4. Détermination de la conductivité électrique

La conductivité représente un bon critère pour la détermination de l'origine botanique du miel et elle est désignée aujourd'hui lors des contrôles de routine du miel (Bogdanov et al.,2001)

C'est une mesure indirecte de la minéralisation des miels. En effet dans une solution, ce sont les particules chargées en ions qui transportent le courant électrique. Plus un miel est minéralisé plus y conduit le courant électrique donc plus sa conductivité électrique est élevée. Elle est déterminée directement à partir du conductimètre en microsiemens /cm (mS/cm) sur une solution à 20% de matière sèche du miel à 20°C. (CETAM, 2012, Arrêté n°80-367/CG, 2009, Achouri et al.,2015).

5. Dosage des sucres réducteurs

La détermination des teneurs en sucres donne des informations sur l'authenticité des origines du miel et permet de prévoir la vitesse de cristallisation, sa qualité de conservation. C'est aussi un témoin de falsification (LEAV, 2014).

Principe (Site 4)

En milieu alcalin et à chaud, les oses et osides réducteurs ont la propriété de réduire la liqueur de Fehling contenant l'ion cuivrique (Cu^{2+}) à l'état d'oxyde cuivreux Cu_2O (Cu^{+}) dont la quantité est proportionnelle à la quantité des sucres réducteurs selon l'équation générale :

$$RCHO + 2CuO + HOK \rightarrow RCOOK + \underset{\text{Rouge brique}}{\underbrace{Cu_2O}} + H_2O \quad \text{..... (2)}$$

La quantité de Cu_2O formée détermine la quantité des sucres réducteurs :

2] L'oxyde cuivreux Cu_2O est traité par du sulfate ferrique ($Fe_2(SO_4)_3$) qui est réduit à l'état de sulfate ferreux ($FeSO_4$) selon la réaction:

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 \rightarrow 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O \quad \text{..... (3)}$$

3] Le sulfate ferreux ($FeSO_4$) qui est proportionnel à la quantité de Cu_2O, est dosé par une solution de permanganate de potassium ($KMnO_4$) selon l'équation suivante:

$$2KMnO_4 + 10FeSO_4 + 8H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 5Fe_2(SO_4)_3 + 8H_2O \quad \text{.....(4)}$$

4] Afin de calculer la masse de cuivre isolé; on utilise la procédure suivante:

- Soient: n: le nombre de moles, C:la concentration, V: le volume.
- D'après l'équation (4) : $n_{Fe\,SO_4} = 5.\ n_{KMnO4}$
- D'après l'équation (3) : $n_{Cu_2O} = (1/2).\ n_{Fe\,SO_4}$
- Sachant que n=C*V Donc: $n_{Cu_2O} = (1/2).\ 5.\ n_{K\,MnO_4} = (1/2).\ 5.\ C_{K\,MnO_4}.V_{K\,MnO_4}$
- $n_{Cu} = 5.\ C_{K\,MnO_4}.V_{K\,MnO_4}$
- $m_{Cu} = 5.\ M_{cu}\ .\ C_{K\,MnO_4}.V_{K\,MnO_4}$ où M_{cu}=63,54g/mol.

5] En utilisant la table de Bertrand (annexe), nous pouvons déduire la masse de sucres réducteurs correspondant. Le pourcentage en sucre réducteur est calculé comme suit :

$$\frac{La\ masse\ des\ sucres\ réducteurs}{la\ masse\ de\ la\ prise\ d'essai}.100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots.(5)$$

Mode opératoire (Site 4)

1].Réduction de la liqueur de Fehling:

- Peser 0,5g de miel à l'aide d'une balance analytique.
- Mettre dans un ballon un excès de la liqueur de Fehling (entre 80 ml et 120ml), l'échantillon de miel pesé, 20ml d'eau distillée.
- Agiter le mélange jusqu'à la dissolution totale du miel.
- Porter à l'ébullition douce pendant exactement trois minutes.

2].Isolement du cuivre formé

- Transvaser le contenu du ballon dans un erlenmeyer et laisser décanter le liquide surnageant.
- Refroidir.
- Enlever le surnageant en entraînant le moins possible le précipité.
- Faire des lavages à l'eau distillée bouillante jusqu'à ce que le surnageant bleu devient clair. Eviter le contact du précipité avec l'air à cause du risque du réoxydation de Cu_2O.
- Placer le papier filtre sur l'entonnoir et poser ce dernier sur un erlenmeyer. Ensuite, filtrer afin d'obtenir tout le précipité sur le papier filtre.

3] Dosage du cuivre:

- Dissoudre le précipité dans 85 ml de solution de sulfate ferrique acide 0.1M.

- Titrer avec une solution de permanganate de potassium 0.1M jusqu'à l'obtention d'une coloration rose pâle stable 10 à 20 secondes et noter le volume de $KMnO_4$ correspondant.

6. Analyse polarimétrique

Selon la pharmacopée Européenne (2008), l'angle de rotation optique est déterminé en dissolvant une quantité de miel équivalant à 20 g de matière sèche dans 50 ml d'eau. A laquelle est ajoutée 0,2 ml d'ammoniaque concentrée et complété à 100 ml avec de l'eau. Et si nécessaire, le miel pourra être décoloré avec le charbon activé.

7. Etablissement des spectres infrarouge

Principe :

Le proche et le moyen infrarouge sont les régions les plus utilisées pour l'analyse quantitative et qualitative des constituants alimentaires. Les molécules organiques se composent d'atomes rattachés par des liens chimiques. Ces liens ont la propriété de vibrer lorsqu'ils absorbent de l'énergie provenant d'une source de radiation électromagnétique. L'énergie sera absorbée seulement si la fréquence de radiation correspond à la fréquence d'une des vibrations fondamentales de la molécule. L'énergie de vibration qui caractérise les groupements chimiques (par exemple, C-H, O-H, C=O) dépend de la force de liaison et de la masse des atomes concernés (Lapointe-Vignola et FTLQ, 2002). Les spectres d'absorption dans l'infrarouge fournissent «l'empreinte » d'une molécule comportant des liaisons covalentes, ce qui conduit, dans certains cas, à l'identification de celle-ci (Biémont ,2008).

Technique

Une quantité de 0,5 à 1,5 mg de la substance à analyser sont mélangés avec 100 mg de KBr dans un mortier. Le mélange est broyé très finement. La presse est assemblée : le cylindre est placé sur son socle et une pastille est introduite avec la face polie vers le haut. La pompe à vide est branchée et l'ensemble est mis sous une pression de 10 tonnes à l'aide d'une pompe hydraulique. Ensuite, la pastille est sortie de la presse et placée dans un support adapté au spectromètre. La pastille de KBr est placée dans le spectromètre, puis le spectre est enregistré en suivant les instructions sur l'appareil.

II.3 Etude de l'effet antibactérien du miel

Pour atteindre cet objectif, nous avons commencé par une étude de l'influence de deux paramètres sur l'effet inhibiteur du miel, à savoir : la température et le pH. Enfin, une détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel a été réalisée. L'effet antibactérien était testé sur les deux espèces bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec deux types de souches « de collection » et « isolée » pour chaque espèce.

1. Effet de la température

- Dans les conditions d'asepsie, 6 tubes stériles sont remplis chacun par 3 ml de miel.
-Un des échantillons de miel ne subit aucun traitement thermique, alors que les autres sont chauffés dans un bain Marie chacun à l'une des températures suivantes: 40°C, 55°C, 70°C, 85°C et 95°C. Après stabilisation de la température du bain marie, le tube est submergé dans l'eau pendant 15 minutes de façon à ce que le niveau d'eau soit supérieur au niveau du miel.
-Ajouter à chaque tube 1 ml d'eau distillée stériles a fin d'obtenir une concentration de 75 % $_{(V/V)}$, bien homogénéiser et laisser refroidir sous le jet du robinet.
-Pour chaque souche, une colonie bien isolée est prélevée aseptiquement de son milieu d'isolement pour inoculer 1 ml d'eau physiologique qui sera bien agité afin d'homogénéiser la suspension bactérienne.
- A l'aide d'écouvillons trempés dans les suspensions bactériennes, ensemencer les souches tests en nappe sur le milieu « Mueller et Hinton ».
-Des disques de papier de 9 mm de diamètre sont ainsi déposés sur les boites et imprégnés chacun par 50µl de la dilution chauffée à une température donnée.
-Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
-Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

2. Effet du pH

-Dans les conditions d'asepsie, préparer cinq dilutions de miel à 75% dans des tubes stériles.
-Mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre.
-Amener le pH de chaque préparation à l'une des valeurs suivantes : 2, 4, 5, 6, 8 et 9 en utilisant des solutions de NaOH ou de HCl.
-Préparer les suspensions bactériennes et ensemencer les en nappe sur Mueller-Hinton.
- Placer les disques de papier et déposer sur chacun d'entre eux 50 µl de chaque préparation.
-Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
-Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme étant la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi qui entraîne l'inhibition de toute croissance bactérienne visible. La méthode par dilution successive en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité bactérienne aux antibiotiques (Burnichon et Texier, 2003).

Technique

- Dans les conditions d'asepsie, préparer les dilutions de miel suivantes: 75 %, 66.66 %, 50 %, 33.33 % 25 % et 16.66 % à l'aide de l'eau distillée stérile.
- Préparer les suspensions bactériennes et ensemencer les en nappe sur Mueller-Hinton.
- Placer les disques de papier et déposer sur chacun d'entre eux 50 µl de chaque dilution.
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

II.4 Etude de l'effet antibactérien des plantes

II.4.1 Choix de la méthode d'extraction :

Pour extraire les principes actifs d'une plante, il faut dissoudre ces principes actifs dans un solvant. Ainsi, les extraits des quatre plantes étudiées ont été obtenus en testant deux modes d'extraction sur les plantes réduites en poudre.

1) La décoction :

- Peser 4 g de chaque plante.
- Ajouter 40 ml d'eau distillée froide, porter à ébullition.
- Laisser décocter 10 minutes en couvrant le mélange afin d'éviter l'évaporation.
- Filtrer le décocté à travers le papier filtre.

2) La macération à chaud :

- Dans un flacon, mélanger 4 g du végétal avec 40 ml d'eau distillée. Fermer hermétiquement.
- Régler le bain marie à une température de 100°C. Attendre sa stabilisation.
- Plonger le flacon à l'intérieur. Laisser macérer 2 heures.
- Filtrer le macérât à travers le papier filtre.

Afin de choisir une méthode d'extraction adéquate à toutes les plantes, nous avons recours à l'étude de l'effet antibactérien de ces extraits vis-à-vis des deux souches de collection (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*).

Technique

- Préparer les suspensions bactériennes à partir des deux souches.
- Sur le milieu Mueller et Hinton, réaliser un ensemencement en nappe pour chaque suspension bactérienne.
- Déposer les disques de papier filtre sur les boites précédentes, injecter 50 µl de chaque extrait de plante à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile.
- Incuber à 37 °C pendant 12 à 24 heures.
- Mesurer les zones d'inhibition.

II.4.2 Optimisation du rapport (masse/volume)

Pour cela, nous avons étudié l'effet antibactérien en fonction de la fraction massique de chaque plante (le solvant est toujours l'eau distillée). Les teneurs testées (m/v) sont : 1g /50 ml (2%), 2g /50 ml (4%), 3g /50 ml (6%), 4 g /50 ml (8%), 5 g/50 ml (10%), 7.5 g/50 ml (15%), 10 g/50 ml (20%), 12g/50 ml (24%), 14 g/50 ml (28%), 15 g/50 ml (30%) et 18g/50 ml (36%) (Soit une teneur allant de 0,02 à 0.36 g/ml). La méthode d'extraction utilisée est la macération à chaud.

Technique

-Préparer les suspensions bactériennes à partir des deux souches de collection (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*).

- Sur le milieu Mueller et Hinton, réaliser un ensemencement en nappe pour chaque suspension bactérienne.
- Déposer les disques de papier filtre sur les boites précédentes.
- A laide d'une micropipette munie d'embouts stériles, imbiber les disques par 50 µl d'extraits correspondants aux différentes teneurs de chaque plante.
- Incuber à 37 °C pendant 12 à 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

II.4.3 Détermination de la CMI des extraits :

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour chaque extrait de plante obtenu pour un rapport (m/v) optimal (0.24 g/ml) selon les étapes suivantes :

- Diluer les macérâts de plantes afin d'obtenir les concentrations volumiques suivantes : 75 %, 50 %, 33.33 % et 25 %.
- Préparer les suspensions bactériennes à partir des quatre souches (souches de collection et souches isolées), puis ensemencer en nappe sur gélose nutritive coulée en boites. Ce milieu est utilisé comme alternatif au milieu Mueller et Hinton qui a fait déficit.
- Déposer 5 disques de papier filtre sur chaque boite. Imprégner les avec 50 µl de chaque dilution. Un disque sera à chaque fois réservé à l'extrait non dilué.
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

II.5 Association miel-Extraits des plantes

1. Etude de l'activité antibactérienne des associations binaires « miel-Extrait»

Dans le but d'augmenter la bactéricide, d'élargir le spectre antibactérien, voire de prévenir l'émergence de mutants résistants, les antibiotiques sont souvent utilisés en association (Auboyer et al., 1999) . De plus, La combinaison de plusieurs antibiotiques pour traiter une infection grave est une stratégie courante et souvent efficace. Elle se justifie par une série d'avantages (Van Bambeke et Tulkens, 2007) :

- elle peut conduire à une synergie entre les antibiotiques administrés.
- elle permet de minimiser les risques de voir émerger des souches résistantes car la probabilité de sélectionner une souche résistante simultanément à plusieurs classes d'antibiotiques est nettement plus faible qu'en utilisant un seul agent.
- elle se justifie dans le cas d'infections polymicrobiennes qui ne peuvent être traitées par un seul antibiotique.
- elle est parfois appliquée de façon empirique dans le traitement initial d'infections graves lorsque le germe n'a pas encore été identifié, notamment chez les patients immunodéprimés.

Dans ce contexte appliqué aux antibiotiques, nous avons testé l'effet synergique de nos antibiotiques naturels : miel et extraits de plantes.

Technique :

- Les plantes ayant montré une activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées sont macérés : La globulaire, le pêcher et le genévrier.

Chaque macérât aqueux est utilisé comme un solvant qui sert à diluer le miel dans des proportions bien définis : 75 %, 66.66 %, 50 %, 33.33 % et 25 %.

- Les suspensions bactériennes des deux souches isolées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sont ensemencées par écouvillonnage sur gélose nutritive.
- Les disques de papier filtre sont ensuite déposés sur les boites précédentes puis imprégnés par 50 µl de chaque dilution.
- L'incubation se fait à 37 °C pendant 18 à 24 heures.
- La lecture se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition.

2. Etude de l'effet antibactérien des associations multiples « miel-Extraits»

Dans le même objectif, nous avons testé l'effet des associations miel-mélange multiple d'extraits de plantes. Dans ce cas, le solvant est constitué d'un mélange d'extraits de deux ou de trois plantes à des proportions égales. On testera en parallèle l'effet de ces mélanges sans association avec le miel :

- ✓ Le premier mélange est constitué des macérâts de la globulaire et du pêcher.
- ✓ Le deuxième mélange est constitué des macérâts de la globulaire et du genévrier.
- ✓ Le troisième mélange est composé des macérâts du pêcher et du genévrier.
- ✓ Le dernier mélange est formé des extraits des trois plantes.

Technique :

On prépare les dilutions suivantes de miel : 75 %, 66.66 %, 50 %, 33.33 % et 25 % avec chacun des quatre mélanges de solvants.

- Les disques de papier filtre sont déposés sur les boites de Pétri ensemencées par les deux souches isolées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et sont imbibés par 50 µl de chaque dilution de miel par chacun des quatre mélanges.
- L'incubation se fait à 37 °C pendant 18 à 24 heures.
- La lecture se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition.

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

I. Tests de confirmation des souches

I.1 *Escherichia coli*

1) Ré isolement sur Hektoen

Ce ré isolement a donné pour les deux souches des colonies lisses, bombées, circulaires à contour régulier et de couleur saumon **(Figure III.1)**. Cette dernière est due à l'acidification du milieu suite à l'utilisation d'un ou plusieurs glucides parmi le lactose, le saccharose, la salicine. Ces colonies sont sans centre noir ce qui signifie une absence de production de sulfure de fer par réduction du thiosulfate en H_2S.



Figure III.1 : *Escherichia coli* ATCC 11105 sur Hektoen

2) Identification sur Galerie « API 20 E »

Les résultats des deux galeries sont représentés dans la **Figure III.2** et le **Tableau III.1**. Selon les tableaux de lecture et d'orientation la Galerie API20E **(Annexes 2, 3 et 4)** *E. coli* est :

- ✓ **ADH (-), LDC (+), ODC (+), TDA (-), Urée (-), Gel (-) ;**
- ✓ **CIT (-), IND (+), Ino (-), Sor (+);**
- ✓ **Glu (+), Man (+), Rha (+), Sac (-), Mel (+), Amy (-), Ara (+);**
- ✓ **ONPG (+);**
- ✓ **H_2S (-);**
- ✓ **VP (-).**

L'ensemble des caractères biochimiques trouvés pour nos souches coïncident à 85 % pour la souche de collection (différence dans les deux enzymes ADH, TDA et le saccharose) et 80% pour la souche isolée (différence dans les trois enzymes ADH, TDA, ODC et le saccharose).

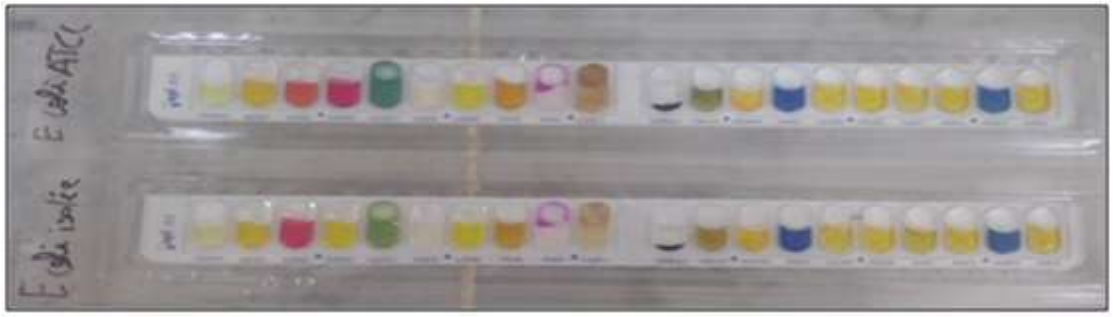


Figure III.2: Galerie « API 20E » des deux souches d'***Escherichia coli*** ATCC11105 et isolée.

Tableau III.1 : Récapitulatif des principaux caractères biochimiques des deux souches d'***Escherichia coli*** tests utilisées (ATCC11105 et isolée).

	ONPG	**ADH**	**LDC**	**ODC**	**CIT**	**H_2S**	**Urée**	**TDA**	**IND**	**VP**
Collection	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Isolée	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	Gel	**Glu**	**Man**	**Ino**	**Sor**	**Rha**	**Sac**	**Mel**	**Amy**	**Ara**
Collection	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Isolée	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

D'après les résultats de l'étude macroscopique des colonies après isolement sur Hektoen et la galerie API 20 E, on peut confirmer l'appartenance de ces deux souches testées à l'espèce d'*Escherichia coli,* car l'ensemble de ces caractères Coïncident avec ceux *d'E coli*.

I.2 *Staphylococcus aureus*

1) Ré isolement sur Chapman

Ce ré-isolement a donné pour les deux souches de petites colonies rondes, lisses, bombées, à contour régulier et de couleur jaune doré **(Figure III.3)**. En effet, *S. aureus* élabore un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange et l'acidification par fermentation du mannitol donne également cette couleur (virage de la couleur du rouge de phénol vers le jaune).



Figure III.3: ***Staphylococcus aureus*** **ATCC6538** sur Chapman

2) Coloration de Gram

Cette coloration a donné pour les deux souches des coques colorées en violet comme le montrent la **Figure III.4**. Cette couleur indique que ces souches ont résisté à la décoloration par l'alcool du fait de la présence du peptidoglycane. Ce sont des bactéries gram (+).

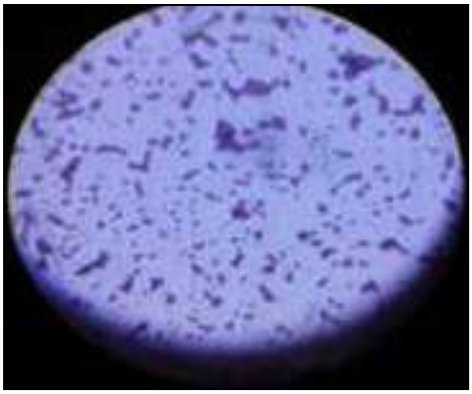
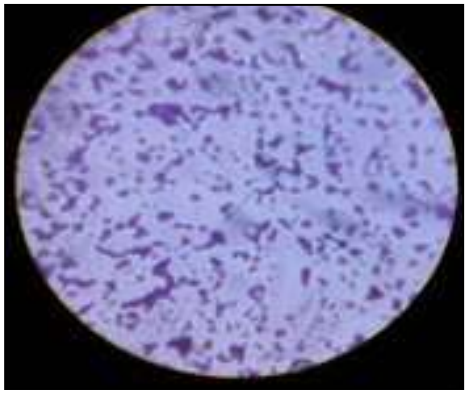
A   **B**

Figure III.4: Coloration de Gram : **(A)** *Staphylococcus aureus* ATCC6538

(B) *Staphylococcus aureus* isolée

3) Test de la coagulase

C'est une exoenzyme encore appelée coagulase libre. Elle catalyse la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Ce test est positif pour la souche ATCC6538 donnant un caillot qui apparait en inclinant le tube du plasma inoculé après 4heures d'incubation **(Figure III.5)**. Ceci confirme une fois de plus l'identité de la souche. Cependant il est négatif pour la souche isolée. En effet, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de la coagulase libre en raison d'une mutation. Chez d'autres souches de *S. aureus,* le facteur

d'affinité pour le fibrinogène peut être masqué par la présence d'une capsule polysaccharidique (Avril et al., 1992). De plus, parmi les *Staphylococcus*, pratiquement seul *Staphylococcus aureus* la possède, certaines souches de *S. aureus* peuvent en être dépourvues (10 à 15 % en milieu hospitalier), la perte de la coagulase étant souvent reliée à un traitement antibiotique (Bezzar, 2014).



Figure III.5: Test positif de la coagulase avec
***Staphylococcus aureus* ATCC6538**

II. Analyses physico-chimiques du miel

II.1 Densité

La densité de notre miel est de 1.41g/ml, elle appartient à l'intervalle des normes. En effet, la densité du miel est comprise entre 1,410 et 1,435. Un miel récolté trop tôt, extrait dans un bocal humide ou abandonné longtemps contient trop d'eau. Ce défaut se décèle au densitomètre ou au réfractomètre (Jean-Prost et Medori, 1972).

II.2 Détermination de l'indice de réfraction et de la teneur en eau

L'indice de réfraction mesuré à 16 °C est de 1.4999 et il vaut 1.49898 après correction. En se référant au tableau de Chataway **(Annexe 5)**, la teneur en eau est de 14.8 %. Cette valeur est acceptée selon la norme qui exige un seuil maximal de 21 % (Arrêté n°80-367/CG, 2009). En effet, le miel contient de l'eau avec un pourcentage optimum de 17 à 18%. Une teneur en eau plus importante affecterait la conservation du miel avec un risque de fermentation (Irlande, 2010).

La variation de la teneur en eau est due aux différentes conditions environnementales telles que : Les conditions météorologiques (le climat) lors de la production, l'humidité dans la ruche, l'origine florale des échantillons du miel, la teneur en eau des nectars, mais aussi des conditions de récolte, des techniques de traitement et les conditions de stockage (Doukani et *al.,* 2014 ; Irlande, 2010).

II.3 pH

Le pH de notre miel est de 4.02 mesuré à une température de 16.8°C. Généralement, les miels de nectar ont un pH faible (de 3,3 à 4,0) tandis que les miels de miellat ont un pH un peu plus élevé (Achouri et al., 2015). Notre miel pourrait être d'origine néctarique.

L'acidité du miel est due à un grand nombre d'acides organiques qu'il contient. L'acide principal est l'acide gluconique qui est en équilibre avec ses lactones ou ses esters et les ions inorganiques tels que les phosphates et les chlorures. On trouve aussi les acides formique, tartrique, maléique, citrique, succinique, butyrique, lactique et oxalique, de même que différents acides aromatiques. Le miel contient également les acides chlorhydriques et phosphoriques. D'autres composés tels que les lactones, dont la présence est constante, ont également une fonction acide (Mbogning et *al*., 2011).

La variation du pH serait due à la flore butinée, à la sécrétion salivaire de l'abeille et aux processus enzymatiques et fermentatifs pendant la transformation de la matière première (Doukani et al., 2014).

II.4 Conductivité électrique

La mesure de ce paramètre a donnée 0,714 mS/cm. Cette valeur ne dépasse pas les normes car le rapport de la commission internationale du miel (2001) propose que le miel de nectar, les mélanges de miel de nectar et de miel de miellat aient une conductivité inférieure à 0,8 mS/cm et que le miel de miellat et le miel de châtaignier, supérieure à 0,8 mS/cm. De plus, cette mesure dépend de la teneur en minéraux et de l'acidité du miel; plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée. Ainsi, la conductivité électrique est souvent utilisée pour différencier le miel de nectar du miel de miellat de même que pour la caractérisation des miels monofloraux.

II.5 Dosage des sucres réducteurs

Le volume de $KMNO_4$ 0,1M obtenu au point d'équivalence est de 15ml, ce qui donne selon l'**annexe 6** une masse en sucres réducteurs de 300,03mg et en équivalent glucose de 329,8mg. Ceci correspond selon l'équation 5 (chapitre II) à un taux en sucre réducteur de 60% et en équivalent glucose de 65,96%(≈ 66%).

Les normes indiquent une teneur apparente en sucres réducteurs (exprimé en sucre inverti) pour « le Miel de nectar » qui ne doit pas être inférieure à 65 p.100. (Arrêté n°80-367/CG, 2009).

En fait, le miel contient des glucides ou sucres, présents en grande quantité : 78 à 80% du poids frais du miel (Irlande, 2010). Et selon les miels, les glucides représentent 90 à 99% de la matière sèche. Certains sont d'origine purement végétale (ils entrent dans la composition du nectar ou du miellat) : le glucose, le fructose, le saccharose, le kestose, le mélézitose et le raffinose. D'autres, tels que le maltose, l'isomaltose, l'erlose et le dextrantriose, apparaissent seulement comme des produits secondaires après transformation par les enzymes de l'abeille (Lequet, 2010). Ces sucres sont d'importance très variable (LEAV, 2014):

- ✓ Fructose 32 à 42 %
- ✓ Glucose 26 à 36 %
- ✓ Saccharose 0 à 5 %
- ✓ Maltose 0 à 7 %
- ✓ Turanose 0 à 2 %.

Le taux de sucres réducteurs dans notre miel **(60%)** est dans la limite inférieure ce qui indique que son origine peut être mixte. Ceci nous montre que le taux en sucre non réducteurs est important (100%-15% (teneur en eau)- 60% (sucres réducteurs) = **25%**). Ce taux est approximatif, car il est calculé en négligeant les autres composés non glucidiques. Une réaction d'inversion sur le miel (en utilisant l'invertase) suivie d'un dosage des sucres invertis aurait été bénéfique pour déterminer la proportion des sucres non réducteurs (notamment le saccharose), en établissant la différence des pourcentages en sucre réducteurs avant et après inversion.

II.6 Analyses polarimétriques

En raison de la couleur sombre de notre miel, une concentration en matière sèche de 200g/l nous a été difficile à décolorer. Afin d'obtenir un pouvoir rotatoire mesurable, notre miel a été dilué à une concentration de 80g/l de matière sèche (ce qui correspond à 96g/l de miel) ; il a été additionné d'ammoniac et décoloré avec du charbon actif. Toutes les dilutions réalisées à partir de cette préparation ont été Lévogyres avec des déviations variant entre (-0,4° et -0,9°).

En raison de leur composition en sucres, tous les miels de nectar possèdent un pouvoir rotatoire négatif alors que c'est l'inverse pour les miellats. C'est un excellent moyen pour les différencier (CETAM, 2012). Selon son pouvoir rotatoire, notre miel est issu du nectar.

En effet, le miel a la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière polarisée. Cela dépend largement des types et des proportions relatives de sucres dans le miel.

Chaque sucre a un effet spécifique, et le total rotation optique est dépendante de la concentration. Miels floraux sont lévogyres et ceux du miellat sont généralement dextrogyres. Ceci est une conséquence de la prépondérance normale dans le miel de fructose, qui a une rotation négative particulière, ($[\alpha]^{20}_D$ = - 92,4 °) sur le glucose ($[\alpha]^{20}_D$ = + 52,7 °) (Dinkov, 2003).

II.7 Etablissement des spectres infrarouge

Le spectre Infrarouge du miel est représenté sur la **figure III.6**. Les résultats du **tableau III.2** montrent globalement la nature des composants du miel, on peut trouver parmi eux :

- Les bandes d'absorption correspondants aux liaisons (-OH, C-O et C-H) peuvent avoir une origine glucidique. En fait, les hydrates de carbone représentant près de 95 à 99% de la matière sèche (monosaccharides, disaccharides et des sucres supérieurs) (Koechler, 2015). Les liaisons (-OH) peuvent également être attribuées aux acides phénoliques. En effet, le miel présente une variété de composés phénoliques caractérisés par des activités biologique (antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante…) tell que acides phénoliques (cinnamique et benzoïque), coumarines, proanthocyanidines et les flavonoïdes (Rezzag Mohcen, 2010).
- Les bandes d'absorption caractéristiques des liaisons (C-H, C-O, C=C, C≡C) témoignent la présence probable des acides organiques. En fait, le miel contient des acides organiques dont l'acide gluconique est majoritaire (Koechler, 2015).
- Les liaisons ($C\text{-}NO_2$) peuvent appartenir aux protides En fait, ces derniers sont présents en très petites quantités dans le miel. Ces substances azotées peuvent provenir soit de la fleur (nectar, pollen) soit des sécrétions des abeilles. On y retrouve essentiellement des peptones, des albumines, des globulines, des nucléoprotéines ainsi que des acides aminés libres comme la proline, l'histidine, la leucine, ou encore la méthionine (Koechler, 2015).

- Les liaisons (C-H arômatique) sont dues aux composés arômatiques. En fait, environ 100 à 150 différentes substances aromatiques ont été isolées à partir du miel (Bogdanov et al., 2004).

- La présence probable d'iode peut être expliquée par le fait que le miel contient également des sels minéraux de 0,2% pour les miels de nectar et jusqu'à 1% pour les miels de miellat, et parmi ces sels on trouve l'iode (Irlande, 2010).

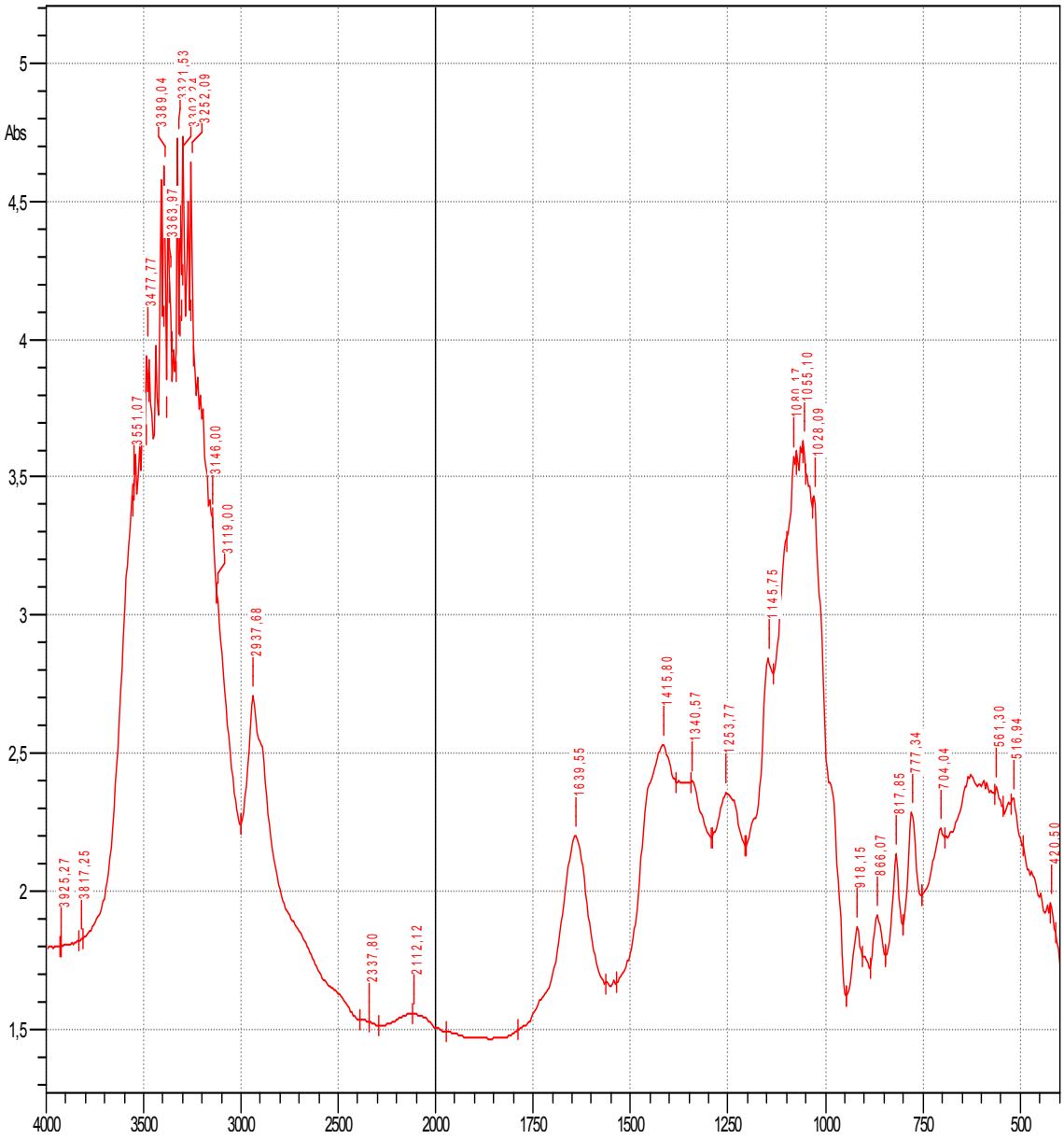


Figure III.6: Spectre Infrarouge du miel

Tableau III.2 : Corrélation entre les pics obtenus et les fréquences de vibration caractéristiques en infrarouge **(Silverstein, 1998; Soad, 2008; Site 5; Site 6).**

Pic (cm^{-1})	Liaisons	Domaine spectral (cm^{-1})	Origine Probable
3551.07 3477.77	O-H	3600-3400^{VE}	Alcools (Glucides), Phénols (Acides Phénoliques)
3252.09	O-H associé	3300-3250 ^{E}	Acides (acide gluconique)
3146.00 3119.00	N-H	3500-3100	Amines ou Amides
2937.68	C-H	2800-3000 →-CH2-2925^{VEA} →-CH2-2850^{VES} →-C-H 2890^{VE} 3080-3030^{VE} : C-H aromatique	Origine diverse: Glucides Protéines Vitamines Composés organiques : Exemple: acides phénoliques
2337.80	C-H	3000-2310	Alcanes
2112.12	C≡C	2150-2100^{V}	Alcynes
1639.55	C=C	1680-1625^{E}	Alcènes
1415.80 1253.77	C-O	1450-1050	Alcools ou Acides
1340.57	C-NO2	1370-1300^{E} 2 bandes	Groupements «nitro» (aromatiques)
1145.75	C-O	1200-1125^{E}	Alcools tertiaires
1080.17 1065.10	C-O	1085-1050^{E}	Alcools primaires (CH_2O glucides)
866.07 817.86 777.34 704.04	C-H arômatique	900-700 ^{VD} dans le plan. Les bandes sont caractéristiques du type de substitution	Composés aromatiques : -Acides phénoliques -Cycle benzène de : *l'acide syringique *méthyle syringate
561.30 516.94	C-I	500-600	Iodoalcane

VE : vibration d'élongation; **VD** : vibration de déformation ; **VEA** : vibration d'élongation asymétrique ; **VES** : vibration d'élongation symétrique

III. Etude de l'effet antibactérien du miel

III.1 Effet de la température

Les diamètres des zones d'inhibition des deux genres tests (en mm), obtenues pour le miel ayant une dilution de 75% traité aux différentes températures sont présentés au niveau du **Tableau III.3** et les **Figures III.7** et **III.8**.

Tableau III.3 : Diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction de la température de chauffage du miel dilué à 75 %.

	25° C	40° C	55° C	70° C	85° C	95° C
***Staphylococcus aureus* de collection**	14	14	14	-	-	-
***Staphylococcus aureus* isolée**	15	14	14	14	-	-
***Escherichia coli* de collection**	13	13	13	11	11	11
***Escherichia coli* isolée**	12	12	14	-	-	-

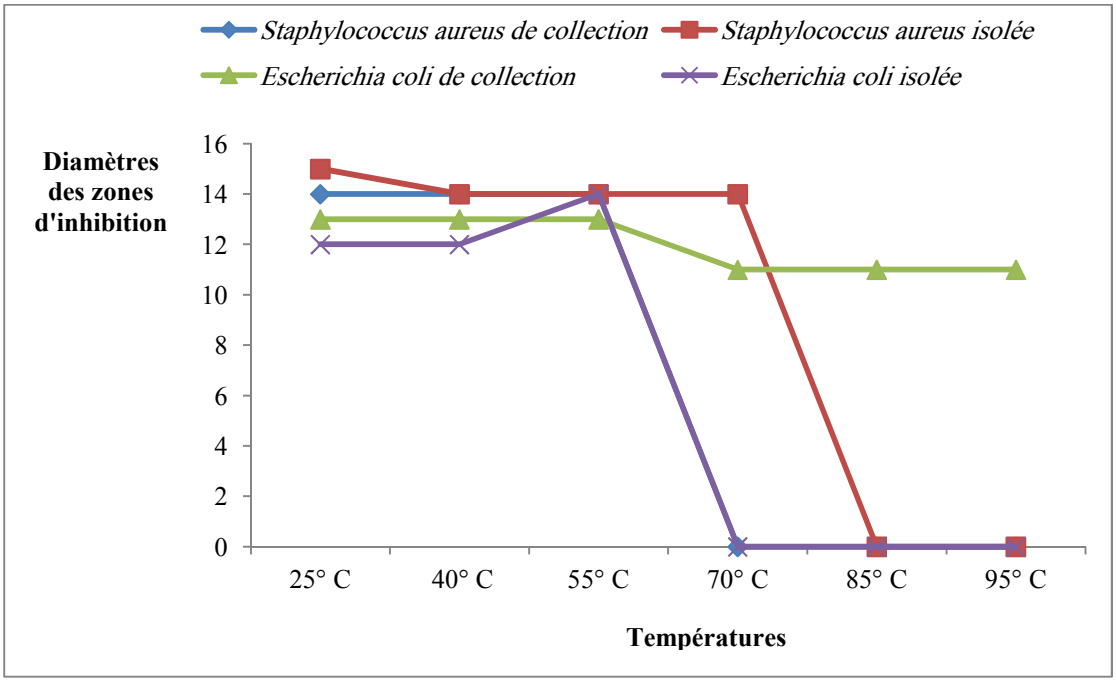


Figure III.7 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction de la température de chauffage du miel dilué à 75 %.



Figure III.8 : Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75% et traité aux différentes températures: cas du *Staphylococcus aureus* ATCC6538 et *Escherichia coli* isolée.

Ces résultats montrent d'abord que les souches utilisées présentent chacune une certaine sensibilité vis-à-vis le miel diluée à 75 %. En effet, Le miel est un antibactérien très efficace ; il contient une enzyme, la glucose oxydase, qui transforme le sucre en une substance très aseptique, le peroxyde d'hydrogène. L'avantage du miel, c'est que la fabrication de cette eau oxygénée se fait en continu et en petite quantité, ce qui permet de détruire les bactéries au long cours sans abîmer les cellules. De plus, les médecins sont souvent confrontés à des germes résistant à la plupart des antibiotiques, ce qui n'est pas le cas avec le miel (Lacoste, 2012). Par ailleurs, Plusieurs substances antiseptiques appelées inhibines ont été identifiés ces dernières années (Litschgi ,2012).

Les résultats montrent également la variation des zones d'inhibition en fonction de la température du miel :

✓ A la température ambiante, les souches étaient toutes sensibles à l'action du miel, ce qui peut être expliquée par le fait que dans la ruche, le miel est le plus souvent à une température similaire à celle du nid à couvain, c'est-à-dire voisine de 34 ° C. Son extraction va l'amener, sauf technologie particulière, à la température ambiante (Jacquot et *al*., 2011).

✓ A 40 °C, l'effet antibactérien du miel est pratiquement identique à celui de la température ambiante pour toutes les souches. En fait, selon Jacquot et *al* (2011), jusqu'à 40 °C l'augmentation de la température du miel favorise certaines réactions enzymatiques.

✓ A 55 °C, toutes les souches avaient des zones d'inhibition de même ordre de grandeur que les températures précédentes ce qui signifie que le chauffage du miel n'a pas encore altéré son pouvoir antibactérien.

✓ Au-delà de 55°C, les deux souches *Staphylococcus aureus* de collection et *Escherichia coli* isolée ne présentent aucune sensibilité vis-à-vis du miel chauffé alors que *Staphylococcus aureus* isolée garde la même sensibilité au miel chauffé à 70° C et résiste au miel chauffé à 85 et 95 °C. Il faut savoir que le réchauffement du miel au-delà de 40 °C n'est pas sans conséquences. Les propriétés antibactériennes ainsi détruites du miel (Goût, 2008). De plus, le miel contient des enzymes dont les principales sont les amylases alpha et bêta, la gluco-invertase et la gluco-oxydase. Ces enzymes sont détruites par un chauffage exagéré du miel (Irlande, 2010). En effet, Bogdanov et *al* (2004) supposent qu'il y a une relation entre la température de stockage et détérioration des enzymes du miel. En effet, la demi-vie de l'invertase décroit de 9600 jours à 10°C jusqu'à 8,6 minutes à 80° C et c'est le même cas pour l'amylase ayant une demi-vie de 12600 jours à 10° C qui diminue à 1,2 heures à 80° C.
De plus, La glucose oxydase est une enzyme thermolabile et photosensible (Hoyet, 2005). Et si la température s'élève, les réactions de Maillard sont alors favorisés ainsi que les phénomènes de caramélisation dont un des premiers intermédiaire est HMF qui est considéré comme indice de vieillissement du miel (Jacquot et al., 2011).

✓ *Escherichia coli* de collection fait une petite exception : elle présente une sensibilité au miel chauffé à 70, 85 et 95 % mais avec une zone d'inhibition constante et plus faible que les températures précédentes. Ceci peut être attribué au fait que l'activité peroxydasique n'est pas la seule responsable de l'effet antibactérien, car lorsque l'on chauffe un miel, on inactive la glucose oxydase sans pour autant inhiber totalement les propriétés antibactériennes de ce miel. D'autres facteurs contribuent à faire du miel un produit antibactérien, ceci est remarqué quand le pouvoir antibactérien du miel n'est pas affecté quand on le traite avec des catalases qui détruisent le peroxyde d'hydrogène (Hoyet, 2005).

III.2 Effet du pH

Les diamètres des zones d'inhibition des souches étudiées obtenues pour le miel ayant une dilution de 75% en variant le pH sont présentés sur le **Tableau III.4** et les **Figures III.9 et III.10**.

Tableau III.4 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction du pH du miel dilué à 75 %.

	2	**4**	**5**	**6**	**8**	**9**
***Staphylococcus aureus* de collection**	24	12	14	14	-	-
***Staphylococcus aureus* isolée**	22	15	16	16	-	-
***Escherichia coli* de collection**	23	12	16	16	-	-
***Escherichia coli* isolée**	19	12	12	12	11	10

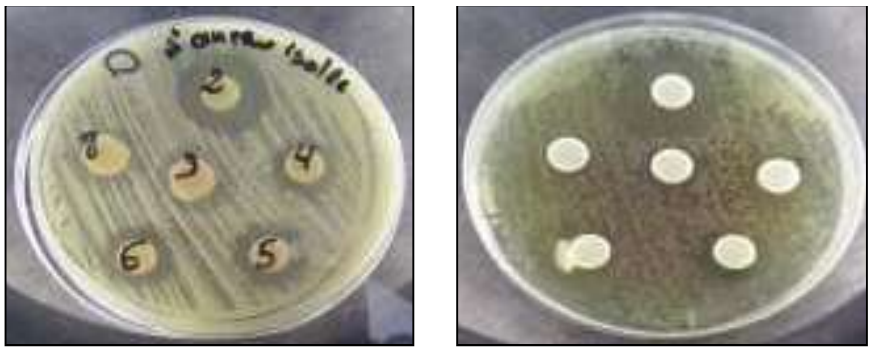


Figure III.9 : Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75% aux différents pH : cas de *Staphylococcus aureus* isolée et *Escherichia coli* ATCC

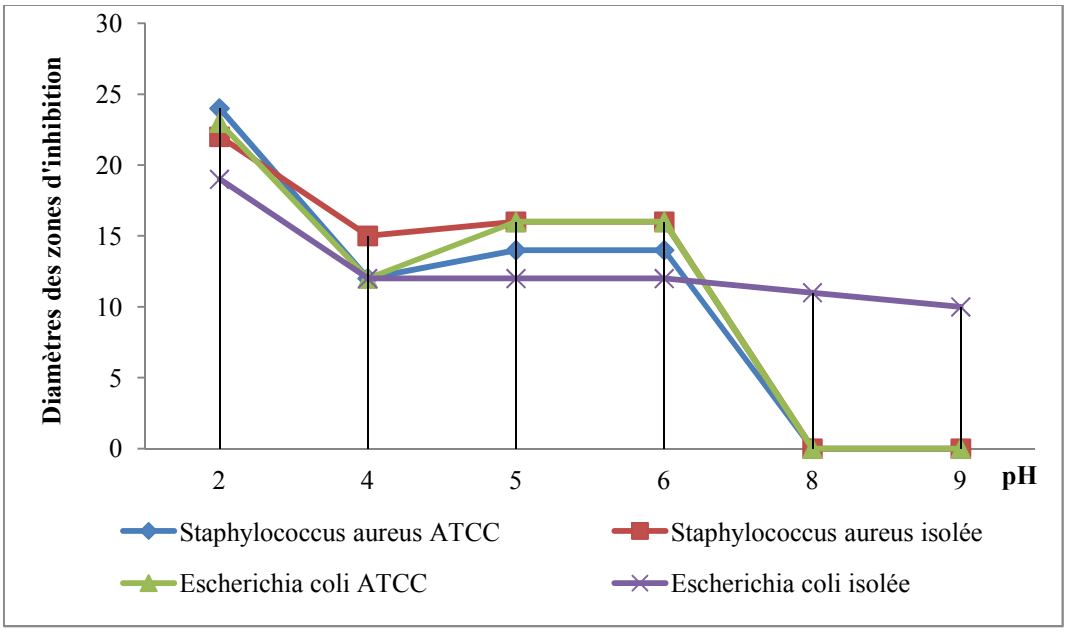


Figure III.10 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées en fonction de pH du miel dilué à 75 %

D'après Ces résultats, nous remarquons d'abord que les diamètres des zones d'inhibition au pH2 sont largement supérieurs à celles du pH natif du miel (diluée à 75 %) ayant un pH=5. Ceci peut être attribué à l'effet de l'acidité importante du miel à ce pH. En augmentant le pH à une valeur de 4 les zones d'inhibition diminuent de diamètre mais elles se rapprochent de celles du pH natif du miel : C'est l'effet antibactérien du miel. De la même façon, à un pH = 5, pH natif du miel dilué à 75%, il engendre des zones d'inhibition mais avec des diamètres supérieurs aux précédents. A un pH de 6 qui s'approche de la neutralité, le miel a gardé le même pouvoir antibiotique que précédemment en engendrant des zones d'inhibition ayant des diamètres égaux à ceux du pH natif de la dilution du miel. En effet, Le miel neutralisé et frais a la même valeur antibiotique que le miel naturel (Gonnet et Lavie, 1960). En s'éloignant de la neutralité, au pH de 8 et 9, les souches de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus aureus* isolée et *Escherichia coli* ATCC étaient toutes résistantes. Ceci indique que le miel a perdu son pouvoir antibactérien. En effet, un pH extrême de miel révèle une dégradation biochimique (Achouri et al., 2015).

Le pH d'un miel est fonction de la quantité d'acides ionisables qu'il renferme ainsi que de sa composition minérale (Lequet, 2010). Il résultant de sa teneur en acides organiques mais également des phénomènes tampons qui existent dans certains miels et de l'équilibre « acide gluconique-gluconolactone » (Jacquot et al., 2011). Le mécanisme d'action du miel peut être expliqué par le faible pH du miel (entre 3,4 et 5,5) (Irlande, 2010). De plus, La production de 5-HMF est beaucoup plus rapide pour les miels dont le pH est inferieur à 4,5, ce qui est le cas de la grande majorité des miels de nectar (Jacquot et al., 2011). L'activité inhibitrice de notre miel dilué à 75% peut être attribuée en partie à son pH légèrement acide (pH5).

De nombreuses études ont mis en évidence le fait que la glucose oxydase n'est opérationnelle que lorsque le miel est dilué. En effet, son pH optimal est beaucoup plus basique que celui mesuré dans le miel non dilué (Hoyet, 2005). La variation du pH pourrait donc nous tracer un schéma complet de l'activité enzymatique de « la glucose oxydase » du miel qui présente un maximum d'activité entre le pH5 et le pH6 et dont l'activité enzymatique diminue au pH acide (pH4) et elle est complètement dénaturée aux pH basique (pH8, pH9).

La souche *Escherichia coli* isolée a fait l'exception en restant sensible au miel aux pH basiques : les zones d'inhibition enregistrée pour cette souche ont des diamètres inférieurs à ceux du pH6. Ceci peut être expliqué par la sensibilité de cette souche à l'effet osmotique du miel ou à d'autres constituants (inhibines) non altérés aux pH basiques. En effet, le miel est une solution concentrée de sucre. Il agit ainsi d'une manière osmotique et absorbe l'eau vitale

des agents pathogènes. D'autre part, On a déjà décelé différentes inhibines dites « non peroxydes » telles que des lysozymes, flavonoïdes, acides aromatiques et autres composants indéterminés du miel. Il s'est révélé que des substances volatiles et aromatiques du miel possédaient également une propriété antibactérienne (Bogdanov et Blumer, 2001).

3) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Les diamètres des zones d'inhibition des deux souches (en mm) obtenues pour les différentes dilutions du miel sont présentés sur le **Tableau III.5** et les deux **Figures III.11, III.12**.

Tableau III.5: Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées selon les dilutions de miel

	75%	**66.66%**	**50 %**	**33.33%**	**25 %**	**16.66 %**
***Staphylococcus aureus* de collection** **(D Inhibition partielle)**	16 (42)	16 (42)	14 (40)	13 (15)	- (15)	- (15)
***Staphylococcus aureus* isolée**	17	17	14	14	12	-
***Escherichia coli* de collection**	15	12	12	-	-	-
***Escherichia coli* isolée** **(D Inhibition partielle)**	14 (28)	14 (28)	12 (22)	-	-	-



Figure III.11: Détermination de la CMI du miel pour *Staphylococcus aureus* ATCC et *Escherichia coli* isolée.

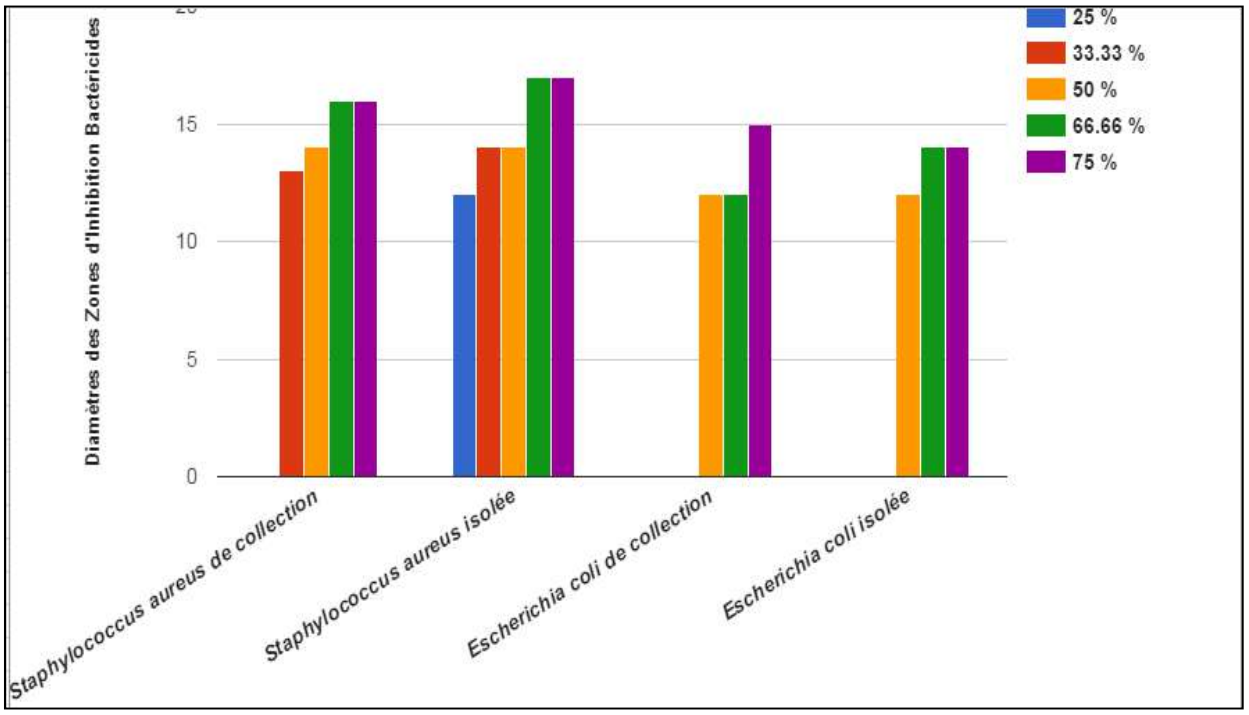


Figure III.12 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des souches testées selon les dilutions de miel

D'après ces résultats, nous remarquons que le miel dilué à 75%, 66.66% et 50 % engendre des zones d'inhibition pour toutes les souches bactériennes testées. En effet, les miels dilués possèdent un effet anti-germinatif. Par conséquent, il doit y avoir encore d'autres substances antibactériennes en plus du taux de sucre élevé et du pH bas. Ces dernières années plusieurs de ces substances, appelées inhibines, ont été identifiés. Aujourd'hui, l'eau oxygénée (H_2O_2), aussi appelée peroxyde d'hydrogène est considérée comme la principale inhibine contenue dans le miel. L'eau oxygénée et l'acide gluconique résultent de l'oxydation de l'eau et de glucose. Cette oxydation est provoquée par la glucose-oxydase. La glucose-oxydase est une enzyme du miel sécrétée par la glande nourricière de l'abeille. La catalase représente l'antagoniste de la glucose-oxydase. Cette enzyme également présente dans de nombreux miels réduit l'eau oxygénée. La concentration en peroxyde dépend donc directement de l'activité de ces deux enzymes (Bogdanov et Blumer, 2001). Selon ce mécanisme, que ce soit *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* ou d'autres germes, le miel lutte contre toutes sortes de micro-organismes (Irlande, 2010).

$$Glucose - oxydase + glucose + H2O = H2O2 + acide\ gluconique \ldots\ldots\ldots (6)$$

$$2H2O2 + catalase = 2H2O2 + O2 \ldots\ldots\ldots(7)$$

Ainsi, Dold et Witzenhausen ont inventé le terme «numéro inhibine» en 1955 pour décrire le degré de dilution auquel un miel conservera son activité antibactérienne. Ceci est un terme qui a été largement utilisée depuis en tant que mesure de l'activité antibactérienne du miel. Le nombre inhibine implique une échelle de 1 à 5 représentant des dilutions séquentielles de miel dans 5% des mesures, de 25% à 5%. Il y a eu depuis diverses modifications mineures à cette méthode de sorte que la concentration réelle correspondant au nombre inhibine peut varier (Molan, 2009).

Ces résultats montrent également que l'espèce *Escherichia coli* est moins sensible au miel par rapport à *Staphylococcus aureus*. En fait, cette dernière montre une inhibition totale jusqu'à 25 % chez la souche isolée et jusqu'à 33.33 % chez la souche de collection. De plus, le miel a présenté une action similaire avec les dilutions de 75 et 66.66 % pour toutes les souches à l'exception de la souche de collection d'*Escherichia coli*, mais pour le reste des dilutions, les zones d'inhibition diminuent de diamètre avec la diminution de la concentration du miel.

Ainsi, on peut conclure que pour l'espèce *Staphylococcus aureus*, la concentration minimale inhibitrice du miel est entre 33.33 et 25 % pour la souche de collection et entre 25 et 16.67 % pour la souche isolée. Alors que pour *Escherichia coli*, la concentration minimale inhibitrice du miel est entre 33.33 et 50% pour les deux souches. En fait, les souches d'*Escherichia coli* sont sensibles pour certaines doses à l'action d'un facteur de croissance présent dans le miel ce qui rend la lecture des résultats très difficile ou impossible. Ce facteur de croissance est présent dans le miel et le miellat. Son activité s'exerce principalement sur les souches d'*Escherichia coli* (Gonnet et Lavie, 1960).

Ces résultats montrent également en parallèle un effet « **d'inhibition totale** » sur les zones les plus proches des disques imprégnés de miel, un effet **« d'inhibition partielle »** sur les zones relativement loin des disques. Dans le premier cas, la croissance est inhibée définitivement, alors que dans le deuxième cas, un tapis bactérien réapparait après inhibition (Ceci a été noté même pour *Staphylococcus aureus* isolée et *Escherichia coli* de collection mais qui n'était pas quantifié à cause de l'élargissement de ces zones jusqu'aux bords des boites et l'en chevauchement des dilutions). Cette remarque a été enregistrée au cours de toutes les expériences précédentes (Effet de la température, effet du pH). Il faut noter que les zones d**'inhibition partielle** sont de diamètres importants (allant jusqu'à 42 mm de diamètre). Ces derniers diminuent avec les dilutions mais ne s'annulent pas, mêmes aux dilutions les

plus importantes. Ce caractère est très intéressent du faite que le miel garde toujours son activité antibactérienne même aux plus faibles concentrations. En effet, en fonction de sa concentration et de son origine botanique, un miel peut être bactéricide (c'est-à-dire qu'il peut totalement tuer les bactéries) ou être bactériostatique (les bactéries ne sont pas tuées, mais leur développement est stoppé) (Hoyet, 2005).

Enfin, il faut noter que la souche de collection de *Staphylococcus aureus* a donné une zone d**'inhibition partielle** avec une concentration de miel égale à 16.66 % et qui est inférieure à la CMI. Ceci est expliqué par l'effet sub-inhibiteur de cet antibiotique naturel. Cet effet décrit une diminution de croissance et/ou une perte de viabilité de bactéries exposées à une concentration en antibiotique inférieure à sa CMI. Les bactéries traitées dans ces conditions montrent fréquemment des altérations morphologiques indiquant des perturbations de leur métabolisme, ainsi qu'une sensibilisation aux mécanismes de défenses immunitaires de l'hôte. Ces modifications s'accompagnent souvent d'une diminution d'adhérence et de pathogénicité, mais ceci n'est pas constant (Van Bambeke et al., 1999).

IV. Etude de l'effet antibactérien des plantes

L'évaluation de l'activité antibactérienne des plantes médicinales étudiées a été réalisée in vitro en se basant sur leur influence sur la croissance des souches étudiées. Cependant, cette activité est régit par de nombreux facteurs. En effet, la partie de la plante utilisée (feuille, écorce de tige, racines, fruit, etc.), la période de récolte (floraison, maturité, etc.), son état (frais ou sec), les techniques de séchage ou de conservation (température), le solvant (eau, éthanol, mélange hydro-alcoolique), le mode de préparation de l'extrait (macération, décoction, infusion, expression à froid), le temps d'extraction, la dose administrée, sont autant de facteurs qu'il convient de définir pour chaque plante car pour une même espèce ils modifient considérablement l'activité pharmacologique (Fleurentin, 1991).

IV.1. Optimisation de la méthode d'extraction

L'étude de l'effet antibactérien des plantes (la globulaire, le genévrier, le pêcher et la sauge de Jérusalem) a été réalisée grâce à un antibiogramme effectuée sur les deux souches de collection *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en testant deux modes d'extraction des plantes à savoir la macération à chaud et la décoction dont le but est de déterminer la meilleure méthode d'extraction en termes d'activités antibactériennes. En fait, en tout premier lieu l'efficacité d'une drogue végétale est liée à l'extraction (Fleurentin, 1991).

Les résultats de cette optimisation sont représentés sur le **Tableau III.6**. La **figure III.13** représente les résultats de l'antibiogramme sur les deux souches pour les macérâts et les décoctés du pêcher et la sauge de Jérusalem (*Phlomis. f*).

Tableau III.6 : Zones d'inhibition obtenues pour les deux méthodes d'extraction.

	Staphylococcus aureus (collection)		*Escherichia coli (collection)*	
	Macération	Décoction	Macération	Décoction
Globulaire	10	9.5	10	-
Pêcher	10	-	12	-
Genévrier	24	-	14	-
Sauge de Jérusalem (*Phlomis)*	9.5	11	9.5	10

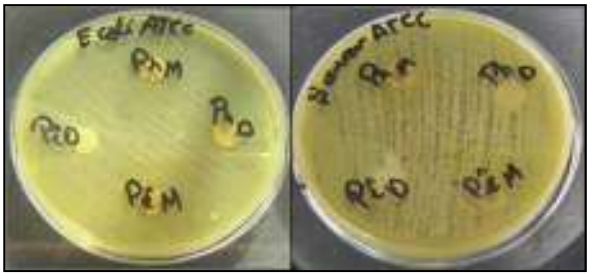


Figure III.13 : Photos des zones d'inhibition des deux souches de collection correspondantes aux deux méthodes d'extraction concernant le pêcher et *Phlomis.f* .

D'après ces résultats, il y apparaît que chacune des quatre plantes a une activité sur la croissance d'au moins une des bactéries testées. Ceci peut être expliqué par le pouvoir antibactérien des plantes. En effet, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire de composés appelés métabolites secondaires. De nombreux métabolites secondaires sont des antibiotiques au sens large, car ils protègent la plante contre les champignons, les bactéries, les animaux et même autres plantes. Les plantes ont été une riche source de médicaments parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives, dont la plupart jouent probablement le rôle de défense chimique contre des prédateurs ou des agents infectieux (Small et Catling, 2000). Cette activité antibactérienne peut être également attribuée à l'organe utilisé. En fait, les organes de la partie aérienne (tige, feuille, fleur, fruit) sont exposées au soleil ce qui leur procure vertus et bienfaits grâce au phénomène de photosynthèse qui favorise la biosynthèse et le stockage des métabolites (Fleurentin et *al*., 2014).

Le mode de préparation des extraits végétaux diffère en général selon:

- ✓ les plantes et surtout les parties de plantes que l'on utilise (Lacoste, 2012).
- ✓ la nature de la plante que l'on utilise, c'est-à-dire sa texture, ou suivant les composés qu'elle renferme (Bardeau, 2009).

Nos résultats montrent une variation des diamètres des zones d'inhibition selon le mode d'extraction pour une même plante (cas de la globulaire par exemple). D'une façon générale, la macération a donné des zones d'inhibition supérieures à celles de la décoction. Selon Bardeau, 2009, les végétaux aux textures denses sont susceptibles d'un tel traitement (bois, tiges, feuilles, racines, écorces, orge, chiendent, etc.).

Afin d'uniformiser le mode de traitement pour toutes les plantes, nous optons pour la macération pour la suite de notre étude.

IV.2. Optimisation du rapport masse/volume :

Pour optimiser le rapport masse/volume, nous avons réalisé l'antibiogramme en milieu solide sur les deux souches de collection *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en augmentant à chaque fois la concentration massique de chaque plante lors de la macération à chaud. Notre objectif est de déterminer la fraction massique donnant la meilleure activité antibactérienne. Selon la nature de la plante étudiée, et en tenant compte des zones d'inhibition obtenues lors de l'étape précédente. Ainsi, pour les plante ayant donné de faible zones d'inhibitions et qui peuvent supporter des teneurs plus élevées que celle utilisée lors de la partie précédente (4g/40ml soit 0,1g/ml), nous avons testé des concentrations allant de 0.1 à 0.3g/ml (cas de la globulaire et le pêcher). Ce même intervalle était testé également pour le genévrier en ajoutant une concentration de 0.36 g/ml. Pour la sauge de Jérusalem (*Phlomis*), ayant un aspect gras et cotonneux, la gamme de concentration s'étale de 0.02 à 0.1 g/ml (<0,1g/ml), car les feuille de cette plante absorbent l'eau d'extraction, ce qui rend impossible de tester des teneurs supérieurs à 0,1g/ml. Les résultats sont représentés sur le **Tableau III.7** et la **Figure III.14**.



Figure III.14 : Zones d'inhibitions des deux souches pour certains rapports (m/v) des quatre plantes testées.

Tableau III.7 : Résultats de l'optimisation du rapport (m/v).

		m/v (g/ml)										
		0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.15	0.2	0.24	0.28	0.3	0.36
Staphylococcus aureus	Globulaire	-	-	-	-	15	17	19	22	22	24	-
	Pêcher	-	-	-	-	13	18	19	20	20	24	-
	Genévrier	-	-	-	-	24	23	28	25	25	25	30
	Phlomis	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli	Globulaire	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	-
	Pêcher	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	-
	Genévrier	-	-	-	-	14	13	13	19	15	15	20
	Phlomis	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Les macérâts aqueux qui ont permis l'obtention des zones d'inhibition sont ceux des trois plantes suivantes : la globulaire, le pêcher et le genévrier. Les diamètres de ces zones oscillent entre 13 et 30 mm. Ceci est dû à l'effet antibactérien de ces plantes.

La souche d'*Escherichia coli* ATCC a marqué une sensibilité exclusive vis-à-vis du genévrier alors que la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC était sensible en plus à la globulaire et au pêcher. Pour les deux souches les diamètres des zones d'inhibition augmentent généralement avec l'augmentation du rapport m/v jusqu'à ce qu'ils atteignent un plateau où l'addition de la masse de la plante ne varie pas le diamètre de la zone d'inhibition. Théoriquement, l'activité biologique devrait augmenter (avec la concentration croissante du principe actif) au fur et à mesure que la pureté augmente (Abayomi, 2010). Cependant, les plus grandes teneures testées donnent des zones d'inhibition qui sont supérieure à celles des plateaux.

Ces résultats montrent également que le genévrier présente la plus grande activité antibactérienne avec des zones allant de 24 à 30 mm de diamètre pour la souche de *Staphylococcus aureus* et de 14 à 20 mm pour *Escherichia coli*. En effet, le genévrier est un antiseptique pulmonaire, digestif, urinaire et sanguin (Lacoste, 2012). Cependant, les deux extraits de la pêche et de la globulaire ont donné une bonne activité antibactérienne qu'on ne trouve pas mentionné par les auteurs qui indiquent la pêche comme tonifiant de la peau, resserrant des pore et elle lutte contre le relâchement (Lacoste, 2012) et ils associent le genre

Globularia au traitement du diabète, la jaunisse, l'obésité, l'œdème, le goitre et l'hypercholestéromie (Fleurentin et *al*., 2014).

Le résultat de l'antibiogramme de la sauge de Jérusalem (*Phlomis*) montre l'absence des zones d'inhibition pour les deux souches. Ceci ne témoigne pas exclusivement l'inactivité de cette plante. En fait, selon Fleurentin, 1991, les produits présents dans une plante sont :

-soit actifs sans être métabolisé et auront ainsi une activité in vitro et in vivo ;

-soit actifs après métabolisation et dans ce cas ils seront inactifs in vitro et actifs in vivo.

Les produits entrant dans la deuxième catégorie sont des prodrugs ; ils sont nombreux chez les végétaux notamment dans le groupe des hétérosides (Fleurentin, 1991). De plus, la médecine traditionnelle algérienne applique cette plante comme cicatrisant des plaies superficielle (Peau) et internes (ulcères).

En conclusion, un rapport m/v optimal de 0,24g/ml pour toutes les plantes a été choisi, il permet d'avoir une activité inhibitrice maximale toute en assurant la facilité technique de l'opération d'extraction (en évitant la surcharge massique du solvant (eau)) et en respectant le rendement économique de la méthode d'extraction.

IV.3. Détermination de la CMI des extraits

Dans le but de déterminer la plus faible concentration de nos extraits qui entraîne l'inhibition visible de toute croissance bactérienne, nous avons testé plusieurs dilutions de nos extraits obtenues par macération à chaud d'un rapport optimale m/v=0,24g/ml. Ainsi, nous avons obtenu les résultats représentés sur le **Tableau III.8** et la **Figure III.15**.



Figure III.15 : Résultat de la détermination des CMI des extraits des deux plantes : le genévrier avec les deux souches de *Staphylococcus aureus* et la globulaire pour les deux souches d'*Escherichia coli.*

Tableau III.8 : Résultat de la détermination des CMI.

		Dilutions					
Souche	Plante	100 %	75 %	50 %	33.33 %	25 %	CMI
***S. aureus* Collection**	Globulaire	25	22	17	15	0	[25-33.33]%
	Pêcher	20	18	16	11	11	≤ 25 %
	Genévrier	20	13	13	12	12	< 25 %
***E. coli* collection**	Globulaire	/	/	/	/	/	**
	Pêcher	/	/	/	/	/	**
	Genévrier	14	10	10	9.5	9.5	≈25 %
***S. aureus* isolée**	Globulaire	28	24	20	19	19	< 25 %
	Pêcher	14	14	10	10	11	≤ 25 %
	Genévrier	13	12	12	11	11	≤ 25 %
***E. coli* isolée**	Globulaire	15	14	12	12	13	< 25 %
	Pêcher		11	11	11	11	≤ 25 %
	Genévrier	11	11	11	11	11	≤ 25 %

** : ne sont pas testés, car les extraits de ces plantes sont inactifs sur *E. coli* de collection (C.f Rapport m/v)

Ces résultats ont permis de révéler globalement une activité antibactérienne des souches testées envers les trois macérâts étudiées. Même dilués les extraits de plante ont donné des zones d'inhibition claires témoignant une bonne activité inhibitrice de leurs plantes.

Les deux souches de *Staphylococcus aureus* ont été plus sensibles à l'action des extraits par rapport à *Escherichia coli* : pour toutes les plantes, les zones d'inhibition enregistrées pour *Staphylococcus aureus* sont plus grandes que celle notées pour *E coli*. Cette dernière est résistante à l'action de certaines plantes (Cas de *E coli* de collection vis-à-vis de la globulaire et du pêcher). En dernier lieu, on remarque que la souche isolée d'*Escherichia coli* est plus sensible que celle de collection.

La résistance d'*Escherichia coli* peut être due au fait que les bactéries disposent d'un large éventail de défenses contre les antibiotiques, telles que : leur inactivation par une modification enzymatique simple, leur rejet hors du cytoplasme par des transporteurs qui maintiennent leur concentration en dessous du seuil de toxicité, la modification de leur cible, qui devient insensible à leur action (Callen, 2005).

Ainsi, une CMI inférieure à 25% pourrait être utile quand à l'information qu'elle porte concernant l'usage bénéfique de ces extraits surtout lorsqu'ils sont impliqués dans des mélanges.

V. Association miel-Extraits des plantes

V.1. Activité antibactérienne de l'association binaire « miel-Extrait » : Détermination des concentrations inhibitrices synergiques.

L'activité antibactérienne du miel dilué dans des proportions croissantes de macérâts de plantes vis-à-vis des deux souches isolées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* a été étudiée. Les résultats obtenus sont représentés sur le **Tableau III.9** et **la Figure III.16**.

Tableau III.9 : Association miel-plante.

Concentration des extraits de plantes			75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
Concentration du miel			25%	33,33%	50%	66,66%	75%
S. aureus isolée		Globulaire	14	18	18	22	23
		Pêcher	-	-	18	17	19
		Genévrier	12	14	13	14	11
E. coli isolée	**Zones d'inhibition totale**	Globulaire	-	-	12	14	12
		Pêcher	-	-	-	11	15
		Genévrier	-	-	-	-	13
	Zones d'inhibition partielle	Globulaire	14	22	28	26	28
		Pêcher	15	15	24	22	26
		Genévrier	16	16	26	24	28



Figure III.16: Résultats de l'antibiogramme pour la globulaire, le genévrier et le pêcher

Ces résultats montrent un effet antibactérien avec la majorité des dilutions. Cet effet est de deux types : une inhibition franche pour la plupart des dilutions de miel et avec les deux souches et un effet d'inhibition partielle avec la souche d'*Escherichia coli* seulement et avec toutes les dilutions de miel. Dans le premier cas, la croissance apparente est inhibée définitivement, alors que dans le deuxième cas, un léger tapis bactérien réapparait après inhibition. En effet, le miel contient plusieurs facteurs antibiotiques naturels, regroupés sous le nom générique d'inhibine, qui sont en fait de puissants bactériostatiques, c'est-à-dire qu'ils empêchent le développement des bactéries mais ne les tuent pas (Irlande, 2010). Une étude a également montré une action bactéricide du miel qui dépend de sa concentration et de l'espèce bactérienne: *Escherichia coli* avec 50% de miel a poussé pendant 2 h, puis le nombre de cellules viables a commencé à diminuer; *Staphylococcus aureus* a montré une baisse en 1 h, avec mise à mort complète après 4 h avec 50% de miel, mais une mort partielle est observée avec un miel dilué à 25 %. De plus, la présence de certains dérivés végétaux bactéricides dans certains miels, aidé par la faible activité de l'eau peut également tenir compte de certains miels étant bactéricide (Molan, 2009).

Pour la souche *Staphylococcus aureus* isolée, toutes les dilutions de miel dans la globulaire et le genévrier ont donnée des halos clairs autour des disques d'antibiotique ce qui est dû à une bonne activité inhibitrice des dilutions testées alors que pour le pêcher seules les concentrations en miel supérieures ou égales à 50 % ont donné un effet inhibiteur. En parallèle, ces zones augmentent généralement de diamètres avec l'augmentation de la concentration du miel. En fait, le miel est l'édulcorant naturel idéal pour les tisanes. Il contribue à l'élimination des microbes grâce à ces propres principes actifs (Festy, 2013).

Selon Burnichon et Texier, 2003, L'interaction de deux antibiotiques peut produire quatre effets principaux :

- ✓ Indifférence : l'activité d'un antibiotique n'a aucune influence sur l'activité de l'autre ;
- ✓ Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- ✓ Synergie : l'effet de l'association est supérieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément ;
- ✓ Antagonisme : l'effet de l'association est inférieur à la somme des effets produits par chacun des antibiotiques pris isolément.

Cependant, selon Page, 1999, il est possible de catégoriser au laboratoire la relation entre deux antibiotiques, ou plus, contre une bactérie, comme synergique, antagoniste ou indifférente. Cela dépend de l'effet de l'association sur la croissance bactérienne, par comparaison avec l'effet de chaque médicament pris isolément :

- ✓ Si l'association des médicaments augmente nettement l'effet antibactérien au-delà de celui du **médicament le plus actif**, l'association est synergique ;
- ✓ Si l'association aboutit à une inhibition de la croissance bactérienne, inférieure à celle due au médicament le plus actif, l'association est antagoniste ;
- ✓ Si l'association n'est ni synergique ni antagonisme, elle est indifférente.

En adoptant le principe de Page, 1999, l'effet de la combinaison des deux antibiotiques naturels (miel et extraits des plantes) comparé aux effets de chacun d'eux seuls a donné les remarques suivantes :

✓ Pour la globulaire, le **Tableau III.10** montre que l'effet synergique sur *S. aureus* n'apparait qu'aux fortes concentrations en miel (66.66% et 75%). Pour une gamme similaire de concentrations en miel (>50%), l'association sur *E. coli* est généralement indifférente. Aux dessous de ces concentrations l'association Extrait (globulaire)-miel a un effet antagoniste sur les deux souches.

✓ Pour le genévrier **(Tableau III.11)**, l'association montre un cas différent. Elle est indifférente sur *S. aureus* aux faibles concentrations en miel (25% et 33%), presque indifférente à 50% et antagoniste aux fortes concentrations (66.66% et 75%). L'association est antagoniste sur *E. coli* pour toutes les concentrations en miel.

Tableau III.10 : Comparaison entre l'effet de l'association (Extrait Globulaire-miel) avec les effets de chaque composant seul.

	Concentration des extraits de plantes	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
Globulaire-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	14	18	18	22	23
	Diamètre miel seul	12	14	14	17	17
	Diamètre Extrait seul	24	/	20	19	19
Globulaire-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***(D inhibition partielle)***	- (14)	- (22)	12 (28)	14 (26)	12 (28)
	Diamètre miel seul ***(D inhibition partielle)***	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre Extrait seul	14	/	12	12	13

Tableau III.11: Comparaison entre l'effet de l'association (Extrait Genévrier-miel) avec les effets de chaque composant seul.

	Concentration des extraits de plantes	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
Genévrier-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	12	14	13	14	11
	Diamètre miel seul	12	14	14	17	17
	Diamètre Extrait seul	12	/	12	11	11
Genévrier-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***(D inhibition partielle)***	- (16)	- (16)	- (26)	- (24)	13 (28)
	Diamètre miel seul ***(D inhibition partielle)***	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre Extrait seul	11	/	11	11	11

✓ Pour le pêcher, le **Tableau III.12** montre un effet synergique sur *S. aureus* à partir d'une concentration en miel de 50%. Au dessous de cette concentration l'association est antagoniste. Le couplage est antagoniste sur *E. coli* pour toutes les concentrations en miel excepté celle de 75% ou apparait une indifférence à un léger effet synergique.

Une remarque importante est à signaler concernant l'effet « d'inhibition partielle » de toutes les associations :

- ✓ Lorsque le miel est utilisé seul, il présente une inhibition partielle aux grandes concentrations (50%, 66.66%, 75%). Les faibles concentrations (<50%) du miel n'ont pas d'effet.
- ✓ L'association des extraits des plantes avec le miel augmente l'effet d'inhibition partielle de ce dernier aux faibles concentrations (<50%).
- ✓ D'une façon générale, l'association aux fortes concentrations (≥ 50%) n'a aucun retentissement sur l'inhibition partielle du miel, car les zones d'inhibition correspondantes pour la majorité des associations sont du même ordre que celles notée en présence du miel seul.

Tableau III.12 : Comparaison entre l'effet de l'association (Extrait Pêcher-miel) avec les effets de chaque composant seul.

	Concentration des extraits de plantes	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
Pêcher-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	-	-	18	17	19
	Diamètre miel seul	12	14	14	17	17
	Diamètre Extrait seul	14	/	10	10	11
Pêcher-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***($D_{inhibition\ partielle}$)***	- (15)	- (15)	- (24)	11 (22)	15 (26)
	Diamètre miel seul ***($D_{inhibition\ partielle}$)***	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre Extrait seul	11	-	11	11	11

V.2. Etude de l'effet antibactérien des associations multiples « miel-Extraits»

Avant d'explorer l'association miel-mélange multiple d'extraits de plante, nous avons commencé par l'étude de l'effet des associations d'extraits en absence du miel à des concentrations bien définies. Nous rappelons que :

- ✓ Le premier mélange est constitué des macérâts de la globulaire et du pêcher à parts égales (50% chacun).
- ✓ Le deuxième mélange est constitué des macérâts de la globulaire et du genévrier à 50% chacun.
- ✓ Le troisième mélange est composé des macérâts du pêcher et du genévrier à même proportions (50% chacun).
- ✓ Le dernier mélange est formé d'extraits des trois plantes à 33,33% chacun.

L'effet de la combinaison de nos extraits mélangés comparé aux effets de chacun d'eux seuls aux mêmes concentrations nous donne les résultats représentés sur le **Tableau III.13**.

Tableau III.13 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple d'extraits avec les effets de chaque composant seul.

	S. aureus		*E. coli*	
	50%	33,33%	50%	33,33%
Diamètre Extrait-Globulaire	20	19	12	12
Diamètre Extrait-Genévrier	12	11	11	11
Diamètre Extrait-pêcher	10	10	11	11
Diamètre M1 seul	12	/	12	/
Diamètre M2 seul	15	/	12	/
Diamètre M3 seul	-	/	12	/
Diamètre M4 seul	/	12		13

M1=$E_{Globulaire}$+$E_{Pêcher}$ (50% chacun) M2= $E_{Globulaire}$+ $E_{Genévrier}$ (50% chacun)

M3=$E_{Pêcher}$+ $E_{Genévrier}$ (50% chacun) M4= $E_{Globulaire}$ + $E_{Pêcher}$ + $E_{Genévrier}$ (33,33% chacun)

Il apparait que toutes les associations ont un effet antagoniste sur l'inhibition de *S. aureus*, car :

- Le mélange M1 ($E_{Globulaire}$+$E_{Pêcher}$ (50% chacun)) donne une zone d'inhibition de 12mm, inférieure à celle de l'extrait de la globulaire seul à la même concentration (Extrait le plus actif, D=20mm), l'association est donc antagoniste.
- Le mélange M2 ($E_{Globulaire}$+ $E_{Genévrier}$ (50% chacun)) donne une zone d'inhibition de 15mm, inférieure à celle de l'extrait de la globulaire seul à la même concentration (Extrait le plus actif, D=20mm), l'association est donc antagoniste,
- Le mélange M3 ($E_{Pêcher}$+ $E_{Genévrier}$ (50% chacun)) ne donne aucune zone d'inhibition, l'association est donc antagoniste,
- Le mélange M4 ($E_{Globulaire}$ + $E_{Pêcher}$ + $E_{Genévrier}$ (33,33% chacun)) donne une zone d'inhibition de 12mm, inférieure à celle de l'extrait de la globulaire seul à la même concentration (Extrait le plus actif, D=19mm), l'association est donc antagoniste.

En suivant le même résonnement, ces associations ont un léger effet synergique (cas de M3 et M4) à indifférent (cas de M1 et M2) sur l'inhibition d'*E. coli.*

L'effet des associations miel-mélange multiple d'extraits de plantes vis-à-vis des deux souches isolées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* est représenté sur les **Tableaux III. 14, 15, 16, 17** et La **Figure III.14**.

Du **Tableau III.14**, il apparait que :

- ✓ Pour *S aureus*, l'association M1-miel est généralement indifférente à partir d'une concentration en miel de 50% et antagoniste au dessous de cette concentration.
- ✓ Pour *E coli*, cette association est généralement antagoniste pour toutes les dilutions. (parfois indifférente - à 50%)

Du **Tableau III.15**, il apparait que l'association M2-miel a un effet antagoniste sur l'inhibition des deux souches (*S. aureus* et *E. coli*) pour toutes les concentrations en miel.

Du **Tableau III.16**, il apparait que :

- ✓ Pour *S aureus*, l'association M3-miel est antagoniste au dessous d'une concentration en miel de 66,66% et indifférente à 75%.
- ✓ Pour *E coli*, cette association a un effet antagoniste pour toutes les concentrations en miel.

Du **Tableau III.17**, il apparait que l'association M4-miel a un effet antagoniste sur l'inhibition des deux souches (*S. aureus* et *E. coli*) pour toutes les concentrations en miel.

Tableau III.14 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M1 – miel) avec les effets de chaque composant seul.

M1 : E Globulaire + E Pêcher	**Concentration du mélange M1**	100%	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	0%	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
M1-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	/	-	12	17	14	16
	Diamètre miel seul	/	12	14	14	17	17
	Diamètre M1 seul	12	……..Inférieure à 12……				
M1-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***(D inhibition partielle)***	/	-	-	12 (22)	11 (24)	12 (24)
	Diamètre miel seul ***(D inhibition partielle)***	/	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre M1 seul	12	……..Inférieure à 12……				

Tableau III.15 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M2 – miel) avec les effets de chaque composant seul.

M2 : Globulaire + Genévrier	**Concentration du mélange M1**	100%	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	0%	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
M2-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	/	-	-	-	12	15
	Diamètre miel seul	/	12	14	14	17	17
	Diamètre M2 seul	15	……..Inférieure à 15……				
M2-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***(D inhibition partielle)***	/	-	-	10 (22)	10 (24)	12 (26)
	Diamètre miel seul ***(D inhibition partielle)***	/	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre M2 seul	12	……..Inférieure à 12……				

Tableau III.16 : Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M3 – miel) avec les effets de chaque composant seul.

M3=Pêcher+ Genévrier	**Concentration du mélange M1**	100%	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	0%	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
M3-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	/	-	-	-	12	17
	Diamètre miel seul	/	12	14	14	17	17
	Diamètre M3 seul	-	- -				
M3-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***(D** inhibition partielle)*	/	-	-	10 (22)	12 (28)	12 (28)
	Diamètre miel seul ***(D** inhibition partielle)*	/	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre M3 seul	12	……………….Inférieure à 12………………				

Tableau III.17: Comparaison entre l'effet de l'association multiple (Mélange M4 – miel) avec les effets de chaque composant seul.

M4= Globulaire + Pêcher + Genévrier	**Concentration du mélange M1**	100%	75 %	66.66%	50 %	33.33 %	25 %
	Concentration du miel	0%	25%	33,33%	50%	66,66%	75%
M4-miel / *S. aureus* isolé	***Diamètres association***	/	-	-	-	13	12
	Diamètre miel seul	/	12	14	14	17	17
	Diamètre M4 seul	12	……………….Inférieure à 12…………..				
M4-miel / *E. coli* isolé	***Diamètres association*** ***(D** inhibition partielle)*	/	-	-	11 (22)	12 (24)	11 (24)
	Diamètre miel seul ***(D** inhibition partielle)*	/	-	-	12 (22)	14 (28)	14 (28)
	Diamètre M4 seul	13	……………….Inférieure à 13………………				



Figure III.17: Résultats de l'antibiogramme pour certaines dilutions de miel dans certains mélanges multiples de macérât.

L'effet d'inhibition partielle est noté chez *Escherichia coli* seulement en présence du miel. Les mélanges de macérâts couplés au miel donnent des zones inférieures ou égales à celle enregistrées en présence du miel seul.

Les plantes offrent dans certains cas une synergie d'action qui exerce un pouvoir curatif ou sédatif beaucoup plus prononcé que si la plante avait été utilisée seule (Bardeau, 2009). Cependant, dans notre cas, nos associations « mélange macérâts-miel » présentent un effet antagoniste chez *S aureus et E coli.*

Conclusion

Le développement de pratiques médicales non conventionnelles, que l'on appelle également médecines « douces », « alternatives » ou « naturelles », connaît actuellement un véritable essor (vilariño et al., 2006). En fait, cette médecine permet le diagnostic, le traitement et/ou la prévention (Ernst et Pittler, 2005). Mais la recherche et l'éducation sont des éléments fondamentaux à prendre en compte dans la gestion de cette médecine (Maddalena, 2005).

Notre travail vise à faire une étude de l'effet inhibiteur naturel d'un miel de forêt associé aux extraits de quatre plantes : la globulaire, le pêcher, le genévrier et la sauge de Jérusalem. Ainsi, la caractérisation physicochimique du miel a révélé sa conformité en termes de sa densité (1,41), de son pH (4,02), de sa teneur en eau (14,8%) et de sa conductivité (0,714 mS/cm) témoignant l'appartenance probable à une origine néctarique. Cette dernière a été également confirmée par son pouvoir rotatoire Levogyre et sa richesse en sucres réducteurs (aux environs de 60%) ce qui confie au miel une osmolarité participant à son pouvoir antimicrobien. L'étude de l'influence de la température sur l'activité antibactérienne du miel a montré que ce dernier dilué à 75 % et chauffé au-delà de 55°C perd une partie de ses propriétés antibactériennes suite à la destruction de ces enzymes thermolabiles. Le pH, optimal de la glucose oxydase du miel est situé entre 5 et 6. Les souches d'*Escherichia coli* étaient résistantes par rapport à *Staphylococcus aureus* à l'action antibactérienne du miel. La CMI enregistrée pour *Staphylococcus aureus* de collection est située entre 33.33 et 25 % et entre 25 et 16.67 % pour la souche isolée. Alors que pour *Escherichia coli*, la concentration minimale inhibitrice du miel est entre 50 et 33.33%. Le miel de Forêt possède donc des propriétés antibactériennes caractéristiques conférant un spectre qui s'étend sur les bactéries Gram (-) ou Gram (+) dont l'effet inhibiteur est soit total ou partiel enregistré généralement à des concentrations supérieurs à 50%.

L'optimisation de la méthode d'extraction des feuilles sèches et broyées des plantes nous a permis d'opter pour la macération aqueuse à chaud comme mode d'extraction pour les quatre plantes avec un rapport (m/v) adéquat de 0,24g/ml. Les macérâts présentaient globalement un effet antibactérien même aux faibles concentrations pour toutes les plantes à

l'exception de la sauge de Jérusalem. Ceci n'exclue pas l'effet antibactérien de cette plante qui pourra être exploité en utilisant d'autres méthodes d'extraction ou autres parties de la plante.

Au terme de notre étude, l'effet inhibiteur de la formule miel- plante nous a permis de déduire que :

- ✓ L'association binaire « miel-Extrait » donne pour *Staphylococcus aureus* un effet synergique obtenu avec **la globulaire** et **le pêcher** en présence d'une grande concentration de miel. Cet effet apparaît légèrement pour *Escherichia coli* avec le **pêcher** employé à 25 % additionné de miel à 75%.
- ✓ L'association binaire « miel-Extrait de **la globulaire ou du Pêcher** » est indifférente pour *E coli* en présence d'une grande concentration de miel.
- ✓ L'association binaire « miel-Extrait » est antagoniste sur *Staphylococcus aureus et Escherichia coli* avec **la globulaire** et **le pêcher** aux faibles concentrations.
- ✓ L'extrait **du genévrier** associé au miel a généralement soit un effet antagoniste (pour *s aureus* aux fortes concentrations et pour *E coli*) ou indifférent pour *s aureus* aux faibles concentrations.
- ✓ L'association binaire « miel-Extrait » augmente l'effet d'inhibition partielle du miel sur *E coli* aux faibles concentrations (<50%).
- ✓ Les associations multiples « miel-Extraits» présentent tous un effet antagoniste chez *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus.*

Notre étude ne constitue qu'une première étape, plusieurs recherches doivent être menées pour exploiter l'effet inhibiteur de chacun de ces antibiotiques seul afin de déterminer leurs modes d'action sur les autres microorganismes, leurs pharmacocinétiques, leurs applications thérapeutiques, car ces principes actifs peuvent être associées à d'autres excipients dont le but est d'améliorer l'action in vivo.... D'autres méthodes d'extraction peuvent être également employées en utilisant d'autres solvants notamment l'huile qui peut extraire une autre variété de principes actifs à effet synergique avec le miel.

Références Bibliographiques

Achouri. I, Aboussaleh. Y, Sbaibil. R, Chemissi. H, et Bengueddour. R,(2015). Comparaison de la qualité physicochimique du miel de *Ziziphus sp* (Sider) et d'*Acacia sp* (Samar) consommés aux Émirats Arabes Unis (UAE), International Journal of Innovation and Applied Studies, 8 p.

Angandza. G, (2012). Recherche des souches de *Staphylococcus aureus* et *pseudintermedius* résistant à la méticilline dans les muqueuses anale et nasale de chiens consultés dans les cabinets vétérinaires de Dakar (Sénégal), Thèse de doctorat en Médecine, Universite Cheikh Anta Diop De Dakar, 104 p.

Arrêté n°80-367/CG, (2009). Réglementant la commercialisation du miel en Nouvelle Calédonie, JONC, 30 p.

Auboyer. C, Beaucaire. G, Drugeon. H, Gouin. F, (1999). Associations d'antibiotiques ou monothérapie en réanimation chirurgicale et en chirurgie, Conférence d'experts, Texte court, 8p.

Avril. J, Dabernat. H, Denis. F et Monteil. H, (1992). Bactériologie clinique. 2ème Édition, (Éd) ellipses, Paris, 522 p.

Balleux. P et Van Lerberghe. P, (2001). Boisement des terres agricoles: guide technique, Édition Forêt privée française, 128 p.

Bessas. A, (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien, Thèse d'ingéniorat en Biologie, Université Djillali Liabes –Sidi Bel Abbes.

Bezzar. N, (2014). Caractérisation génétique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalière, Thèse de master en Biologie, Universite Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, 63 p.

Biémont. E , (2008). Spectroscopie moléculaire: Structures moléculaires et analyse spectrale, Édition De Boeck Supérieur, 428 p.

BioMérieux, (2010). Fiche technique API 20 E, Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, France, 13 p.

Bogdanov. S, Lüllmann. C et Martin. P, (2001). Qualité du miel et normes internationales relatives au mie, Rapport de la commission internationale du miel, 16 p.

Bogdanov. S, Station fédérale de recherches en production animale et laitière, Liebefeld-Berne. Bieri. K, Gremaud. G, (2004). Produits apicoles : 23A miel, Directives pour l'analyse et l'appréciation, 37 p.

Boukraâ. L, (2013). Honey in Traditional and Modern Medicine, CRC Press Edition, 470 p.

Boutemak. K, Safta. B et Ayachi. N, (2014). Study of the anti-inflammatory activity of flavonic extract of *Globularia alypum* L, special issue of the international conference on computational and experimental science and engineering, pp 239-240.

Bradbear. N, (2005). Apiculture et moyens d'existence durables, Édition Food & Agriculture Org, Vol.01, 64 p.

Bradbear. N, (2010). Le rôle des abeilles dans le développement rural Manuel sur la récolte, la transformation et la commercialisation des produits et services dérivés des abeilles, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, 248 p.

Burnichon. N et Texier. A, (2003). L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques, DES bactériologie, 23 p.

Catier. O et Roux. D, (2007). Botanique Pharmacognosie Phytothérapie, collection porphyre, 3ème Édition, (Éd) Wolters Kluer, France, 148 p.

Centre d'Etudes Techniques Apicoles de Moselle, (2012). Technologie et qualité du miel, Lorraine, France, 35 p.

Cheref. Y, (1987). La santé au naturel, les nouvelles éditions algériennes, Nouvelles éditions algériennes, 174 p.

Chringel, (2011). Les milieux de culture en bactériologie, BIO303, 12 p.

Clément. H, (2013). Les bons gestes de l'apiculteur: Tout le savoir-faire apicole en photos-gestes, Édition Rustica, 96 p.

Commission Européenne, (2011). Plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antimicrobiens, Communication de la Commission au Parlement Européen et au Conseil, Bruxelles, 19 p.

Cortopassi-Laurino. M et Gelli. D, (1991). Analyse pollinique, propriétés physico chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. Apidologie, Elsiever, pp 61-73.

Damijanić. K, Staver. M, Ganić. k, Gracin. L, (2011). Effects of maceration temperature on the anthocyanins composition of cv. Teran wine, 10 p.

Daoudi. S, (2015). Mécanique des fluides, Manuel des cours, Université de Bordj Bou arréridj, 52 p.

Demirci. B, Dadandi. M, Franz. G, Dietrich. H, Husnu. K, (2003). Chemical composition of essential oil of Phlomis linearis Boiss and Bal., and biological effects on the Cam-Assay : a safety evalution, pp826-830.

Denis. F, Ploy. M, Martin. C, Bingen. E, (2008). Bactériologie médicale, Techniques usuelles, Édition Elsevier Masson, 594 p.

Dinkov. D, (2003). A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgaria, Springer Verlag, 320p.

Diplôme d'Etudes Universitaires Générales, (2006). Fiche technique des travaux pratiques de microbiologie, science de la vie, France, 2 p.

Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, (2008). Pharmacopée Européenne, 6e_Edition_6, Strasbourg, France,Tome 2, 2384 p.

Domerego. R, Imbert. G et Blanchard. C, (2007). Les remèdes de la ruche, Édition Alpen, Monaco, 94 p.

Doukani. K, Tabak. S, Derrriche. A, Hacini Z, (2014). Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens, Revue Ecologie-Environnement, pp37-49.

Ernst. E et Pittler. M, (2005). Médecines alternatives : le guide critique, Kraus Biomédical, Édition Elsevier Masson, 504 p.

Goût. J, (2008). 250 réponses aux questions d'un ami des abeilles, Édition Le gerfaut, 215 p.

Guinoiseau. E, (2011). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action, HAL, France, 149 p.

Hassane. S, Satrani. B, Ghanmi. M, Mansouri. N, Mohamed. H et Chaouch. A,(2011). Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de *Plectranthus aromaticus Roxb*. de l'Ile de la Grande Comore, université de Liège.

Hayette. M, Huynen. P et Meex. C, (2011). Travaux pratiques de Microbiologie générale, Université de Liège, 62 p.

Indicia, (2012). Milieu de Chapman, Laboratoires Humeau, France, 2 p.

Institut Technique de L'Apiculture et l'Office pour l'Information et la Documentation en Apiculture, (2004). Édition Office pour l'information et la documentation en apiculture, Université de Cornell, Vol 31-33,

Irlande. D, (2010). Le miel et ses propriétés thérapeutiques : Utilisation dans les plaies cutanées, 25 p.

Iserin. P, Masson. M et Restellini. J, (2001). Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2ème Édition, (Éd) VUEF, Paris, 335 p.

Jacquot. M, Fagot. P et Voilley. A, (2011). La couleur des aliments: De la théorie à la pratique, Collection Sciences & techniques agroalimentaires, Édition Lavoisier, 472 p.

Jean-Prost. P et Medori.M, (1972). L'Apiculture: connaître l'abeille, conduire le rucher, Édition J.-B. Bailliere, Université du Wisconsin – Madison, 446 p.

Kalla. A, (2012). Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum*. Thèse de Doctorat en Sciences. L'universite Mentouri , Constantine, 155p.

Khan. R, Islam. B, Akram. A, Shakil. S, Ahmad. A, Ali. M, Siddiqu. M et Khan. A, (2009). Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin, journal molecules, 12 p.

Koechler. S, (2015). Le miel dans la cicatrisation des plaies : Un nouveau médicament ?, Thèse de doctorat en pharmacie, Université de LORRAINE, 127 p.

Lapointe-Vignola. C et Fondation de technologie laitière du Québec, (2002). Science et technologie du lait: transformation du lait, Édition Presses inter Polytechnique, 600 p.

Le Laboratoire de l'Environnement et de l'Alimentation de la Vendée, (2014). Analyses de Miels, Conseil général de la Vendée, France, 4 p.

Lefief-Delcourt. A, (2010). Le miel malin, Édition Leduc, 192 p.

Lequet. L, (2010). Du nectar a un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur, école nationale vétérinaire de Lyon. Thèse de doctorat en Médecine, 195 p.

Leyral. G, Joffin. J, Boineau. F, (1998). Microbiologie technique, 2ème Édition, (d) scérén, France, 304 p.

Libbey. J, (2002). MalinTrop Afrique: manuel de maladies infectieuses pour l'Afrique, Édition John Libbey Eurotext, 589 p.

Maddalena. S, (2005). Alternative Medicines: On the Way Towards Integration? : a Comparative Legal Analysis in Western Countries, Peter Lang Edition, 624 p.

Magalon. G et Vanwijck. R, (2003). Guide des plaies: du pansement à la chirurgie, Édition John Libbey Eurotext, 253 p.

Malone. S, (2016). Phlomis Fruticosa - Jerusalem Sage, Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, 2p.

Mathiesen. C, (2006). Phylogeny and biogeography of the lamioid mint genus Phlomis L, University of Oslo, Toyen, 41 p.

Mbogning. E, Tchoumboue. J, Damesse. F, Sanou. M , Canini. A, (2011). Caractéristiques physico-chimiques des miels de la zone Soudano-guinéenne de l'Ouest et de l'Adamaoua Cameroun, Tropicultura, pp 168-175.

Merah. M, Bensaci Bachagha. M, Bouderhem. A, (2010). Etude de l'effet antimicrobien de trois échantillons du miel naturel récoltés du territoire Algérien, AST Annales des Sciences et Technologie, Vol 02, 12 p.

Mille.G et Louppe. D, (2015). Mémento du forestier tropical, Édition Editions Quae, 1200 p.

Molan. P, (2009). The antibacterial activity of honey Variation in the potency of the antibacterial activity, Department of Biological Sciences, University of Waikato, Private Bag 3105, Hamilton, New Zealand, 59-76 pp.

Morand. S et Figuié. M, (2016). Emergence de maladies infectieuses: Risques et enjeux de société, Édition Quae, 136 p.

Morigane, (2007). Grimoire des Plantes.2dition Jeremy, 194 p.

Mouton. Y, Bingen. E et Deboscker. Y, (2000). Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux, Édition John Libbey Eurotext, 288 p.

Mutsaer. M, Blitterswijk. H, Leven. L, Kerkvliet. J et Waerdt. J, (2005). Produits de l'apiculture, (Éd) Agromisa Foundation, 100 p.

Nauciel. C et Vildé. J, (2005). Bactériologie médicale, 2ème Édition, (Éd) Masson, Paris, 259 p.

Perrin. N et Cahé. P, (2009). Conduire ses ruches, Métiers et activités en milieu rural, Édition Educagri, 156 p.

Ramade. F, (2008). Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité, Édition Dunod, Paris, 737 p.

Rezzag Mohcen. O, (2010). Extraction de certains composés du miel naturel ayant effet antimicrobien, Thèse pour l'obtention du diplôme d'études supérieures en Biologie, Algérie

Rwangabo. P, (1993). La médecine traditionnelle au Rwanda Economie et développement, Édition Karthala, 258 p.

Sarkhail. P, Nikhan. M, Sarkheil. P, Gohari. A, (2014). Quantification of verbascoside in medicinal species of *Phlomis* and their genetic relationship, DARU journal of pharmaceutical sciences, 9 p.

Scimeca. D et Tétau. M, (2005). Votre santé par les plantes: Le guide phyto utile pour toute la famille, Édition Alpen, 135 p.

Silverstein.R.M., Basler Morill .G.C, (1998). Identification spectrométrique de composés organiques, 5ème Ed. DeBoeck Université. Paris.

Site 1 :Tela Botanica 2, (2011). *Globularia alypum* L, 8p : http//www.tela-botanica.org.

Site 2 : Floracatalana.net (2015)

Site 3 :Tela Botanica 1, (2011). *Phlomis fruticosa* L, 6p : http//www.tela-botanica.org.

Site 4 : http://stl-bjb.ac-dijon.fr/bioch/bbertand.htm

Site 5: https:// cahierdetextets.free.fr/Data Tronc commun/Cours/Cours6-spectres-IR-RMN2-2016.PDF

Site 6: www.science-en- ligne.com/lic/chimie/chi_exp/spectro/ir.htm

Site7 :https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=M%C3%A9thode_de_Bertrand&oldid=123304924

Soad, (2008). Première approche d'analyse d'un spectre infrarouge, 4 p.

Sordalab, (2013). Kit de coloration rapide Gram hucker, Colgram, 5 p.

Ulukanli. Z et Akkaya. A, (2011). Antibacterial activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens*. Var. Hirta grown wild in eastern Anatolia. Turkey, International journal of culture and biology, 5 p.

Van Bambeke. F et Tulkens. P, (2007). Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse, Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université catholique de Louvain, Bruxelles, 212 p.

Vilariño. R, Bach S, Piotton. S, Waelti. F, (2006). Les médecines parallèles, immersion en communauté, 111 p.

Zafran. J, (2012). Session botanique Crète orientale, Société linnéenne de Lyon, France, 22 p.

ANNEXES

Annexe 1 : Photos des Plantes Etudiés



Figure N° IV.1 : Feuilles sèches de ***Globularia alypum***



Figure N° IV.2 : Feuilles sèches de ***Prunus persica***



Figure N° IV.3 : Feuilles sèches de ***Juniperus communis***



Figure N° IV.4 : Feuilles sèches de ***Phlomis fruticosa***

Annexe 2 : Tableau de Lecture de la Galerie API 20E **(Leyral et al., 1998)**

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	ortho-nitro-phenyl-galactoside	beta-galactosidase	incolore	jaune (1)
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge/ orangé (2)
LDC	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé
ODC	ornithine	ornithine décarboxylase	jaune	rouge/ orangé (2)
CIT	citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle/ jaune	bleu-vert / bleu (3)
H_2S	thiosulfate de sodium	production d'H_2S	incolore/ grisâtre	dépôt noir/ fin liseré
URE	urée	uréase	jaune	rouge/ orangé
TDA	tryptophane	tryptophane desaminase	**TDA** / immédiat	
			jaune	marron foncé
IND	tryptophane	production d'indole	**JAMES**/ immédiat ou **IND**/ 2 mn	
			JAMES incolore Vert pâle-jaune **IND** jaune	**JAMES** rose **IND** Anneau Rouge
VP	pyruvate de sodium	production d'acétoine	**VP 1** + **VP 2** / 10 mn	
			incolore	rosé-rouge
GEL	gélatine de Kohn	gélatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	glucose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
MAN	mannitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
INO	inositol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
SOR	sorbitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
RHA	rhamnose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
SAC	saccharose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
MEL	melibiose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
AMY	amygdaline	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
ARA	arabinose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
OX	sur papier filtre	cytochrome-oxydase	**OX** / 1-2 mn	
			incolore	violet
NO_3-NO_2	tube GLU	production de NO_2	**NIT 1** + **NIT 2** / 2-3 mn	
			jaune	rouge
		réduction au stade N_2	**Zn**	
			rouge	jaune
MOB	(**API M**) (microscope)	mobilité	immobile	mobile
MAC	milieu de MacConkey	culture sur	absence	présence
OF	glucose (**API OF**)	fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert vert	jaune jaune

Annexe 3: Préorientation Rapide de l'Identification des Entérobactéries
(Leyral et al., 1998)

ONPG	H_2S	Uréase	Indole	
+	+	+	+	*Citrobacter freundii* (souches très exceptionnelles)
+	+	+	–	*Citrobacter freundii* (souches exceptionnelles)
+	+	–	+	*Citrobacter freundii* (souches exceptionnelles)
+	+	–	–	lactose+ en général *Citrobacter freundii* lactose– en général *Salmonella arizonae*
+	–	+	+	lactose+ en général *Klebsiella oxytoca* lactose– en général *Yersinia* spp
+	–	–	+	lactose+ *Escherichia coli, Klebsiella oxytoca* lactose– gélatinase+, LDC + *Serratia odorifera* gélatinase–, LDC – *Shigella, Yersinia*
+	–	+	–	lactose+ *Klebsiella pneumoniae* lactose– gélatinase + *Serratia* gélatinase – *Yersinia* spp
+	–	–	–	lactose+ *Enterobacter* lactose– *Serratia, Hafnia, Shigella*
–	+	+	+	*Proteus vulgaris*
–	+	+	–	*Proteus mirabilis*
–	+	–	+	lactose+ *Citrobacter* lactose– *Edwarsiella*
–	+	–	–	lactose+ *Citrobacter* lactose– *Salmonella* spp
–	–	+	+	TDA+ *Morganella, Providencia* TDA– *Yersinia*
–	–	+	–	TDA+ *Proteus penneri, Providencia, Morganella* TDA– *Yersinia*
–	–	–	+	TDA+ *Providencia* TDA– gélatinase+ *Serratia* gélatinase– *Escherichia coli, Shigella, Edwarsiella*
–	–	–	–	de très nombreux taxons sont possibles

Annexe 4 : Tableau d'identification de quelques espèces d'*Escherichia coli*
(BioMérieux, 2010)

API 20 E V4.1	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Edwardsiella ageratis	100	0	0	85	25	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	99	0	92	99	100
Cedecea davisae	99	89	0	99	75	0	0	0	0	89	0	100	100	10	0	0	100	0	100	1
Cedecea lapagei	99	99	0	0	75	0	0	0	0	90	0	100	99	0	0	0	0	1	100	1
Citrobacter braakii	50	45	0	99	75	81	1	0	4	0	0	100	100	1	100	100	1	91	99	99
Citrobacter freundii	90	24	0	0	75	75	1	0	1	0	0	100	99	25	99	99	99	82	40	99
Citrobacter koseri amalonaticus	99	75	0	100	97	0	1	0	99	0	0	100	100	25	99	99	1	1	98	99
Citrobacter koseri koseri	99	2	0	100	25	0	1	0	99	0	0	100	100	1	99	99	99	80	99	99
Citrobacter youngae	100	50	0	1	80	80	0	0	1	0	0	100	100	0	95	100	1	0	25	100
Edwardsiella hoshinae	0	0	100	99	50	94	0	0	99	0	0	100	100	0	0	1	100	0	0	1
Edwardsiella tarda	0	0	100	99	1	75	0	0	99	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterobacter aerogenes	99	0	99	98	82	0	1	0	0	65	0	99	99	99	99	99	99	99	99	99
Enterobacter amnigenus 1	99	25	0	99	40	0	0	0	0	75	0	100	100	0	1	100	99	99	99	99
Enterobacter amnigenus 2	99	80	0	99	80	0	0	0	0	75	0	100	100	0	99	100	1	99	99	99
Enterobacter asburiae	100	25	0	99	80	0	0	0	0	10	0	100	99	25	100	0	99	0	100	100
Enterobacter cancerogenus	100	75	0	99	99	0	0	0	0	89	0	100	100	0	1	100	1	1	100	100
Enterobacter cloacae	98	82	1	92	90	0	1	0	0	85	0	99	99	12	90	85	95	90	99	99
Enterobacter gergoviae	99	0	92	100	75	0	99	0	0	90	0	100	99	23	1	100	99	100	99	100
Enterobacter intermedius	99	0	0	99	1	0	0	0	0	2	0	100	97	0	88	99	40	100	99	99
Enterobacter sakazakii	100	96	0	91	94	0	1	0	25	91	10	100	100	75	8	99	99	99	99	99
Escherichia coli 1	90	1	74	70	0	1	3	0	89	0	0	99	98	1	91	82	95	75	3	99
Escherichia coli 2	25	1	45	20	0	1	1	0	50	0	0	99	90	1	42	90	3	3	1	70

Annexe 5 : Table de Chataway **(Arrêté n°80-367/CG, 2009)**

Indice de réfraction à 20° C	Pourcentage réel d'eau	Indice de réfraction à 20° C	Pourcentage réel d'eau
1,5041	13,0	1,4910	18,2
1,5035	13,2	1,4905	18,4
1,5030	13,4	1,4900	18,6
1,5025	13,6		
1,5020	13,8	1,4895	18,8
1,5015	14,0	1,4890	19,0
1,5010	14,2	1,4885	19,2
1,5005	14,4	1,4880	19,4
1,5000	14,6	1,4876	19,6
		1,4871	19,8
1,4995	14,8	1,4866	20,0
1,4990	15,0	1,4862	20,2
1,4985	15,2	1,4858	20,4
1,4980	15,4	1,4853	20,6
1,4975	15,6	1,4849	20,8
1,4970	15,8	1,4844	21,0
1,4965	16,0	1,4828	21,5
1,4960	16,2	1,4815	22,0
1,4955	16,4	1,4802	22,5
1,4950	16,6	1,4789	23,0
1,4945	16,8	1,4777	23,5
1,4940	17,0	1,4764	24,0
1,4935	17,2	1,4752	24,5
1,4930	17,4	1,4739	25,0
1,4925	17,6	1,4726	25,5
1,4920	17,8	1,4714	26,0
1,4915	18,0	1,4702	26,5

Annexe 6 (Site 7)

Table de Bertrand 1: Conversion des masses du cuivre en quantités des sucres réducteurs exprimées en Equivalent glucose.

Glucose en mg	cuivre en mg	Glucose en mg	cuivre en mg	Glucose en mg	cuivre en mg
10	20,4	40	77,5	70	129,8
11	22,4	41	79,3	71	131,4
12	24,3	42	81,1	72	133,1
13	26,3	43	82,9	73	134,7
14	28,3	44	84,7	74	136,3
15	30,2	45	86,4	75	137,9
16	32,2	46	88,2	76	139,6
17	34,2	47	90,0	77	141,2
18	36,2	48	91,8	78	142,8
19	38,1	49	93,6	79	144,5
20	40,1	50	95,4	80	146,1
21	42,0	51	97,1	81	147,7
22	43,9	52	98,9	82	149,3
23	45,8	53	100,6	83	150,9
24	47,7	54	102,3	84	152,5
25	49,6	55	104,1	85	154,0
26	51,5	56	105,8	86	155,6
27	53,4	57	107,6	87	157,2
28	55,5	58	109,3	88	158,8
29	57,2	59	111,1	89	160,4
30	59,1	60	112,8	90	162,0
31	60,9	61	114,5	91	163,6
32	62,8	62	116,2	92	165,2
33	64,6	63	117,9	93	166,7
34	66,5	64	119,6	94	168,3
35	68,3	65	121,3	95	169,9
36	70,1	66	123,0	96	171,5
37	72,0	67	124,7	97	173,1
38	73,8	68	126,4	98	174,6
39	75,7	69	128,1	99	176,2
				100	177,8

Annexe 6 (suite) (Site 7)

Table de Bertrand 2: Conversion des masses du cuivre en quantités des sucres réducteurs.

Sucre en mg	cuivre en mg	Sucre en mg	cuivre en mg	Sucre en mg	cuivre en mg
10	20,6	40	77,7	70	129,2
11	22,6	41	79,5	71	130,8
12	24,6	42	81,2	72	132,4
13	26,5	43	83,0	73	134,0
14	28,5	44	84,8	74	135,6
15	30,5	45	86,5	75	137,2
16	32,5	46	88,3	76	138,9
17	34,5	47	90,1	77	140,5
18	36,4	48	91,9	78	142,5
19	38,4	49	93,6	79	143,7
20	40,4	50	95,4	80	145,3
21	42,3	51	97,1	81	146,9
22	44,2	52	98,8	82	148,5
23	46,1	53	100,6	83	150,0
24	48,0	54	102,5	84	151,6
25	49,8	55	104,0	85	153,2
26	51,7	56	105,7	86	154,8
27	53,6	57	107,4	87	156,4
28	55,5	58	109,2	88	157,9
29	57,4	59	110,9	89	159,5
30	59,3	60	112,6	90	161,1
31	61,1	61	114,3	91	162,6
32	63,0	62	115,9	92	164,2
33	64,8	63	117,6	93	165,7
34	66,7	64	119,2	94	167,3
35	68,5	65	120,9	95	168,8
36	70,3	66	122,6	96	170,3
37	72,2	67	124,2	97	171,9
38	74,0	68	125,9	98	173,4
39	75,0	69	127,5	99	175,0
				100	176,5

Annexe 6 (suite) (Site 7)

Utilisation des tables de Bertrand

Il n'y a pas de proportionnalité entre les masses de cuivre formé et le glucose (ou les sucres). De plus, on trouve rarement une masse de cuivre qui est écrite dans le tableau. Une Interpolation Linéaire est donc envisageable selon l'exemple suivant ou on trouve une masse de cuivre de 22 mg.

Sucre en mg	cuivre en mg
10 A	20,6 D
x B	**22,0** E
11 C	22,6 F

La quantité de sucre correspondante à 22mg de cuivre est 10,7mg :

$$\frac{AB}{AC} = \frac{DE}{DF} \rightarrow \frac{X-10}{11-10} = \frac{22-20,6}{22,6-20,6} \rightarrow X = 10,7mg$$

Application de notre cas :

$V_{(KMNO4)}$= 15ml, ce qui correspond à une masse de cuivre m= 5. 15. 10^{-3}. 0,1. 63,5 =0,47655g= 476,55mg ce qui est une valeur qui n'existe pas sur la table 2 :

Sucre en mg	cuivre en mg
99 A	175 D
100 B	176,5 E
X C	476,55 F

La quantité de sucre correspondante à 476,55mg de cuivre est 300,03 mg :

$$\frac{AB}{AC} = \frac{DE}{DF} \rightarrow \frac{100-99}{X-99} = \frac{176,5-175}{476,55-175} \rightarrow X = 300,03mg$$

De la même façon et en utilisant la table 1 : La quantité équivalente en glucose correspondante à 476,55mg de cuivre est mg :

$$\frac{AB}{AC} = \frac{DE}{DF} \rightarrow \frac{100-99}{X-99} = \frac{177,8-176,5}{476,55-176,5} \rightarrow X = 329,8mg$$