République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université YAHIA FARES DE MEDEA



Faculté des sciences et de la technologie

Département de Génie des Procédée et Environnement

Mémoire de Fin d'Etude pour l'Obtention du Diplôme de Master en Génie des procédés

Option : Bioprocédés Pharmaceutique

Thème :

Etude de l'activité antimicrobienne de certains types de miel en association avec certains extraits de plantes

Etudié par :

CHEIKH TOUHAMI Selma

Dirigé par :

M^me^ TASSIST Amina

Promotion : *2012-2013*

Remerciement

Je remercie tout

D'abord, ALLAH le tout-puissant, de nous avoir donné le courage et la volonté pour terminer ce travail.

Je remercie ensuite ***Mme TASSIST Amina*** *pour avoir accepté de devenir directeur de cette thèse ainsi que pour ses conseils et sa confiance qu'elle m'a accordée mais aussi et surtout pour l'ensemble de son (excellent) enseignement au cours de mes études.*

Un grand merci à ***Mr ABOUSAOUD Mahmoud*** *d'avoir bien voulu faire partie de ce jury comme président, et ce, peu de temps avant son départ sous les cocotiers, ainsi que pour ses nombreuses astuces d'aromathérapie.*

Je remercie également Mme ZOUAMBIA Yamina et Mme MAACHOU Hamida pour avoir accepté de juger cette thèse

J'exprime également mes remerciements à ***Mr NEDJIOUI*** *Mohamed pour leur accueil, leur sympathie et leurs conseils que ce soit lors du années d'étude universitaire*

Je remercie aussi ***Mr DJEKOUNE Halim****, le responsable du laboratoire d'hygiène d'eau (DSP) pour tout ce qu'il a pu m'apporter pour la réalisation de ce travail qu'il trouve ici mon respect et reconnaissance*

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements à mes parents pour leur soutien moral et matériel, indispensables pour le bon déroulement de mes études. Sans leur aide, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui. Je leur en serai infiniment reconnaissante.

Je remercie également le reste de ma famille mais en particulier mes sœurs et mes frères pour leur soutien et pour l'attention qu'ils m'ont apporté tout au long de ces études. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

Merci à tous ceux qui m'ont apporté, à tous ceux que j'oublie

Dédicace

Je dédie ce mémoire à ma très chère et douce mère M. Zhor et mon cher père Abderrahmane qui mon aidé par leur amour et leur encouragement à réaliser mon travail qu'ALLAH vous protège et ne me prive jamais de vous

A mes chers frères : Abdellah, Marwene, Mohamed et Anes

A mes sœurs : Yamna et son fils Abdelmalek sans oublier son mari Kamel ; Rafia et sa fille Ibtihel et son mari Abdellah et Yasmine

A mon mari Nabil qui m'a aidé par son amour et son encouragement

A toutes mes amies surtout : B.Besma ; E.Fouzia ; M.Souhila ; D.Amel ; K.Hafidha ; A.Meriem ; F.Amina ; B.Fulla ; B. Hamida ; H.Imene ; S.Ilhem

A la ptomotion du Master 2012-2013 (LMD) du département du Génie des procédés Pharmaceutique et environnement surtout spécialité de Bioprocédés Pharmaceutique

Liste des figures

Partie bibliographique

Figure I.1: Palette des couleurs de différents miels……...**5**

Figure I.2 : Miel fermenté……..……**8**

Figure II.1 : photo de marrube…….**17**

Figure II-2 : photo de l'oléandre (Laurier rose)……..**20**

Figure II-3 : fleur d'oléandre……..…….**21**

Figure II- 4 : l'oléandrine……...…….**22**

Figure III-1 : les différentes formes de bactérie……**23**

Figure III-2 : Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000)…...……**24**

Figure III-3 : E coli en coloration de Gram et E colie grossissement × 10 000 au microscope électronique. ……**26**

Figure III-4 : Schéma de la méthode de détermination de la CMI en milieu liquide…….**31**

Figure III-5 : Photographie d'un antibiogramme réalisée par mesure des cercles d'inhibition……**32**

Partie expérimentale

Figure IV-1 : Présentation des échantillons de miels étudiés…….……**33**

Figure IV-2 :A :*E coli* isolé sur Hektoen, B *:Staphylococcus aureus* isolé sur Chapman…..**34**

Figure IV-3 : Les étapes de Coloration de Gram……**38**

Figure IV-4 : Bactérie catalase +…….**39**

Figure IV-5 : Bactérie oxydase +……**40**

Figure IV-6 : Résultats du test de Tryptophanase……...…**43**

Figure IV-7 : Résultat du test Uréase……..……**44**

Figure IV-8 : Résultat du test ONPG. ……**45**
Figure IV-9 :Résultat de test de citrate……...……**45**

Figure IV-10 :Résultat de test de Mannitol……..**47**

Figure IV-11 : Refractomètre……..……**51**

Figure IV-12 : Décoction dans un chauffe ballon……**54**

Figure IV-13 : Macération dans un bain marie……**55**

Figure V-1 : Résultats de API 20^{E} d'E coli……**59**

Figure V-2 : Zones d'inhibition (mm) de les deux souches obtenus pour les miels dilués à 75% et traités à des température différentes……..……**64**
Figure V-3 : Variation des zones d'inhibition (mm) de les deux souches obtenus pour le miel de Multi-fleurs en fonction de la température du traitement……**64**
Figure V-4 : Variation des zones d'inhibition (mm) de les deux souches obtenus pour le miel de Harmel en fonction de la température du traitement……**64**
Figure V-5 : Zones d'inhibition de *S aureus* obtenues pour les miels de Multi-fleurs et de Harmel (dilués à 75%) traités à des pH différents……**66**
Figure V-6 : Zones d'inhibition de *E coli* obtenues pour les miels de Multi-fleurs et de Harmel (dilués à 75%) traités à des pH différents……**66**
Figure V-7 : Influence du pH sur l'activité antibactérienne du miel Multi-fleurs sur les deux souches microbiens……...……**66**
Figure V-8 : Influence du pH sur l'activité antibactérienne du miel de Harmel sur les deux souches microbiennes…….……..**67**
Figure V-9 : Zones d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions de miel de Multi-fleurs sur les deux souches bactériens……..**68**
Figure V-10 : Zone d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions de miel de Harmel sur les deux souches bactériens……**68**

Figure V-11 : Effet inhibiteur de miel de Multi-fleurs sur les deux souche bactériens…..…..**69**

Figure V-12 : Effet inhibiteur de Harmel sur les deux souche bactériens……...**70**

Figure V-13 : Effet de les extraits des plantes préparés par macération à différents rapport (m/v) sur les deux souches microbiennes……...……..**75**

Listes des tableaux

Partie bibliographique

Tableau I-1 : Composition moyenne des miels ……6

Partie expérimentale

Tableau V-1 : Caractères macroscopiques des bactéries isolées sur leur milieux sélectifs….**58**

Tableau V-2 :Résultats d'identification biochimique d'E coli par API 20^{E} ……..…….**59**

Tableau V-3 : résultats de l'identification biochimique de S aureus……...**60**

Tableau V-4 : Valeurs de la densité des échantillons de miel…….……**61**

Tableau V-5 : pH des miels……**61**

Tableau V-6 : Pourcentages d'eau dans les deux types de miels……**62**

Tableau V-7 : Quantité des sucres réducteurs dans les miels…….……..**63**

Tableau V-8 : Diamètre d'inhibition (mm) de les deux souches obtenus pour les miels dilués à 75% et traités à des température différentes…….……**63**

Tableau V-9 : Diamètres des zones d'inhibition de les deux souches bactériennes obtenues pour les deux miels traités à des pH différents ……...**65**

Tableau V-10 : Diamètres d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions des miels……**69**

Tableau V-11 :CMI des miels sur les deux souches bactériennes……..…**70**

Tableau V-12 : Les zones d'inhibition (mm) des souches vis-à-vis des différents extraits…….…….**72**

Tableau V-13 : Taux d'humidité des feuilles sèches et fraiche des deux plantes. ……**73**

Tableau V-14 : Diamètre d'inhibition (mm) des deux souches vis-à-vis des extraits deux types de plantes (sèches et fraiches) préparés par macération……..**74**

Tableau V-15 : Les diamètres (mm) d'inhibition des souches microbiennes obtenus pour les extraits des plantes préparés par macération à différents rapport (m/v)……**75**

Tableau V-16 : Diamètres d'inhibition (mm) des souches vis à vis des extraits des plantes à différents pH, dans les conditions optimisés……**77**

Tableau V-17 : Diamètres des zones d'inhibition des deux bactéries (mm) pour les différentes dilutions des extraits des plantes préparé dans les conditions optimisées……..**78**

Tableau V-18 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches obtenus pour les dilutions des miels dans les extraits des plantes préparé dans les conditions optimisées…….**80**

Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : degré Celsius

µg : microgramme

µl : microlitre

AA : acide aminé

C : Concentration (mole/l)

Cat : catalase

cm : centimètre

CMB : concentration minimale bactérienne

CMI : concentration minimale inhibitrice

D : diamètre

d: densité

E coli : Escherichia coli

F : frais

g : gramme

H : Harmel

h : heure

HE : huile essentielle

HMF : hydroxy-méthyl-furfural

Kg :kilogramme

l : litre

m : mètre/masse (g)

M : Multi-fleurs

mg :milligramme

min :minute

ml : millilitre

mm : millimètre

n :nombre de moles (moles)

pH :potential hydrogen

S aureus : Staphylococcus aureus

S : seconde

T : température / transmittance (%) / taux d'humidité (%)

V : volume (ml ;l)

P : la masse volumiques (g/ml)

الملخص :

يتناول هدا لعمل تقييم عينتين من العسل الطبيعي (الحرمل ومتعدد الازهار) و عينتين من النباتات الطبية (الدفلة و المريوت) و مستخلص النبات – العسل كمضادات المكروبات. و يتم اختبار هذه العينات على اثنين من السلالات الميكروبية الممرضة (المكورات العنقودية الذهبية و البكتيريا المعوية) و يستند عملنا على تقييم تأثير مضادات المكروبات بتقنية النشر على وسط النمو. و أظهرت النتائج بوضوح تأثير العسل و المستخلصات النباتية على حساسية الجراثيم. و قد لوحظ هذا التأثير المثبط لجميع العينات المختبرة. مع وجود احتلافات من عينة الى أخرى و من سلالة الجرثومية الى اخرى. وجدنا أن تقريبا جميع العينات تظهر نشاط معتدل ضد المكورات العنقودية الذهبية و البكتيريا المعوية

الكلمات الرئيسية : العسل ، النباتات الطبية ، المكورات العنقودية الذهبية و البكتيريا المعوية ،نشاط مضاد للبكتيريا ، تركيز الحد الأدنى للكبت

Résumé :

Le présent travail est une contribution à l'évaluation de l'effet antimicrobien de deux échantillons de miles naturels (Harmel et Multi-fleurs), deux échantillons de plantes médicinales (Oléandre et Marrube) et d'une association Miel-Extrait de plante. Ces échantillons sont testés sur deux souches microbiennes à caractère pathogène (Staphylococcus *aureus* et *Escherichia coli*). Notre travail est basé sur l'évaluation de l'effet antimicrobien par la technique de diffusion en gélose. Les résultats obtenus montrent clairement l'impact du miel et des extraits des plantes sur la sensibilité microbienne. Cet effet inhibiteur a été constaté pour tous les échantillons testés, avec des différences d'un échantillon à un autre et d'une souche microbienne à une autre. Nous avons constaté que presque tous les échantillons manifestent une activité modérée contre S aureus et E coli

Mots-clefs : Miel, Plantes médicinales, E coli, S aureus, Activité antimicrobienne, CMI

Abstract:

This work is a contribution to the evaluation of antimicrobial effect of two samples of natural honey (Harmel and multi-flowers), two samples of medicinal plant (Oleander and Marrube) and an association Honey-Herbal extract. These samples are tested on two microbial strains with pathogen character (Staphylococcus aureus and Escherichia coli) . Our work is based on the evaluation of antimicrobial effect by the agar diffusion technique. The result clearly shows the impact of honey and plant extracts on microbial sentivity. This inhibitory effect was observed for all samples tested ; with differences from one sample to another and from one microbial strain to another. We found that all samples show moderate activity against for two the strains

Keywords: Honey, Medicinal Plants, E coli, S aureus, Antibacter activity, CMI

Introduction

La connaissance et l'utilisation du miel par l'homme remonte aux temps les plus reculés de son histoire et il fait partie indubitablement des aliments les plus anciens de l'humanité. Le Saint Coran et le Hadith du prophète présentent le miel en tant que guérisseur des maladies (Sourate «**El-Nahl**» verset (68-69) et comme a dit le prophète (bénédiction et paix sur lui) : "Le miel est un remède pour chaque maladie et le Coran est un remède pour toutes les maladies d'esprit, c'est pourquoi je vous recommande les deux remèdes : le Coran et le miel" (RAPPORTE PAR L'IMAM BUKHARI).

L'impact des maladies infectieuses ne cesse de croître dans le monde. Cela est du généralement au phénomène de l'antibio-résistance. Pour cette raison, des études récentes s'intéressent aux vertus thérapeutiques de certains produits naturels, sachant que ces derniers ne présentent pas généralement des effets secondaires. Le miel compte parmi ces produits les plus convoités. En raison de ses propriétés inhibitrices et thérapeutiques, de nombreuses études se sont intéressées aux propriétés thérapeutiques du miel ***(Baltrusaityte. V et al, 2007 ; Badawy. O et al, 2004)***.

On peut classer les miels, selon l'origine locale, le mode d'obtention, le mode de traitement et la source alimentaire ***(Lambalais. C, 2000 ; Caillas. A, 2004)***. De ce fait, tous les miels ont des propriétés communes, mais chaque miel, se caractérise par des propriétés thérapeutiques propres à lui ***(Huchet. E et al, 2006 ; Gout. J, 2003)***.

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des

agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Marrubium vulgare* et *Oléandre nerium* très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen

L'objectif de notre étude se résume à une étude des propriétés antibactériennes de deux types de miels (**Multi-fleurs et Harmel**) et des extraits de deux plantes :(**Marrube et l'Oléandre**). Une association **« Miel-Extraits les plus actifs»** a été réalisée afin de détecter l'effet synergique des deux composants

Dans la première partie, notre travail nous avons résumé les principales données bibliographiques récentes relatives au thème abordé : des généralités sur le miel et les extraits de plantes ainsi les méthodes permettant d'évaluer leurs effets antimicrobiens.

Le premier volet de la partie expérimentale de ce travail, s'intéresse à:

- Une caractérisation physico-chimique de deux types de miel (**Multi-fleurs et Harmel**) pour les paramètres suivants : pH, densité, teneur en eau et taux des sucres réducteurs.
- Une étude de l'influence du pH et de la température sur l'activité des miels afin de pouvoir détecter leurs modes et leurs conditions d'action.
- Une évaluation de l'activité antibactérienne de ces deux types de miel en utilisant la méthode de diffusion sur gélose afin de déterminer leurs concentrations minimale d'inhibitrice CMI

Dans un deuxième volet de notre expérimentation, nous nous sommes intéressés à une étude détaillée des deux plantes (**Marrube et Oléandre**) en ciblant les objectifs suivant :

- Une évaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus par trois méthodes d'extraction les plus simples : infusion, décoction et macération. Ceci nous permet de trancher la méthode d'extraction optimale et de déterminer la plante la plus actif,
- Une optimisation de la nature et la concentration des extraits choisis.
- Une étude de l'influence du pH sur l'activité des extraits choisis.
- Une évaluation de l'activité antibactérienne des extraits les plus actifs en déterminant leurs CMI dans les conditions optimisées.

Dans une troisième partie, une évaluation de l'activité antibactérienne des dilutions des deux types de miel dans les extraits choisis a été réalisée afin de déterminer l'effet synergique entre les différents constituants de la plante et des miels testés.

Enfin, cette mise au point ne constitue qu'un début à des études plus détaillées visant des associations Miels-Plantes plus complexes qui trouveront des applications thérapeutiques.

I.1. Définition *(Site 9*) :

D'après l'annexe I de la directive européenne 2001/110/CE et du Décret n°2003-587 du 30 juin 2003**,** le miel est défini ainsi :

« Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce Apis mellifera à partir du nectar de plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des 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 » ***(Site 9)***.

I.2. Elaboration du miel :

Le miel est fabriqué à partir des récoltes végétales de l'abeille, principalement à partir du nectar, mais aussi à partir du miellat, qu'elle butine sur les fleurs et les plantes.

Le nectar est une exsudation sucrée produite par les glandes de la fleur, les nectaires, qui acheminent la sève dans les fleurs pour attirer les insectes pollinisateurs et assurer ainsi la survie de l'espèce. Il est composé d'une majorité de sucres, d'eau et de substances diverses.

Le miellat, substance sucrée constituée par les excréments liquides des Homoptères (psylles, cochenilles et pucerons), peut également être récolté par les abeilles en complément ou en remplacement du nectar pour produire un miel de composition différente. Cette récolte reste cependant aléatoire et dépend de facteurs divers, notamment climatiques.

L'élaboration du miel (de nectar) commence dans le jabot de la butineuse. Dès son passage dans le tube digestif, le nectar subit ses premières transformations sous l'action d'enzymes, dont l'invertase qui hydrolysent les polysaccharides du nectar en sucres simples (transformation du saccharose en glucose et fructose). De retour à la ruche, l'abeille butineuse transfert sa récolte à l'abeille ouvrière, qui l'absorbe puis la régurgite à son tour pour la transmettre à une autre ouvrière, et ainsi de suite. La circulation du nectar d'une abeille à une autre, par régurgitations successives, s'appelle la trophallaxie. Progressivement, le nectar se déshydrate, s'enrichit en sucs gastriques et en substances salivaires, et sa concentration en sucre augmente. C'est au terme de ces différentes étapes que le miel, nourriture principale des abeilles, est synthétisé ***(Bruneau. E, 2009; Rossant. A, 2011)***.

Il s'agit donc d'un composé complexe qui relève de l'interaction entre les fleurs, le sol, et les systèmes métaboliques liés à la spécificité génétique des abeilles ***(Bonté. F et al., 2011)***.

I.3. Caractère physico - chimique du miel :

Ces caractères sont importants pour bien différencier les miels les uns des autres mais également pour évaluer la qualité de ceux-ci.

- **La densité:** C'est-à-dire le rapport de la masse d'un miel avec le même volume d'eau, se détermine au pèse sirop ou au densimètre. La valeur moyenne de la densité du miel est de 1,4225 à 20°C.

- **La viscosité:** Importante pour la production du miel, dans la sensation perçue par le palais. Elle dépend de la teneur en eau, de la température et de la composition chimique ***(Arvanitoyannis. IS ; Chalhoub. C. et al. 2005)*.**

- **La solubilité :** Le miel est soluble dans l'eau et l'alcool dilué, mais insoluble dans l'alcool fort, l'éther, le chloroforme et le benzène **.**

- **La coloration (Fig. I-1):** La couleur du miel va du jaune très pâle (presque blanc) au brun très foncé en passant par toutes les gammes de jaunes, d'oranges, de marrons et même parfois de verts. Si le nectar ou le miellat n'ont pas de pigments, les miels liquides seront incolores et les miels cristallisés seront blancs (exemple du miel de colza). Dans le cas contraire, la palette de couleur est très large. Les miels de lavande, de rhododendron, et de tilleul sont ivoires, les miels de tournesol et de pissenlit sont jaune intense, les miels de châtaigner, de bruyère, et de miellat sont bruns. Comme mentionné ci-dessus, on peut même retrouver des pigments verts dans certains miels de saule ou de sapin ***(Bruneau. E, 2002)***.

- **La saveur:** plus ou moins sucrée et aromatique, d'odeur variable.

- **La conductibilité thermique:** elle permet de différencier les miels des miels de miellats mais en général, le miel n'est pas un bon conducteur ***(Clement. H, 2006)*.**

- **Le pH:** il est de 3.9 grâce a la présence d'acides organiques, notamment l'acide gluconique qui résulte de la transformation du glucose par 10 Alveo les remplies de miel par l'action d'une bactérie (*Gluconobacter*) lors de la maturation du miel. Le miel contient aussi de l'acide acétique, citrique, lactique, formique, succinique ***(Gout. J, 1991)***.

- **La conductibilité électrique:** Elle est intéressante, car elle permet de distinguer facilement les miels de miellats des miels de nectar, les premiers ayant une conductibilité bien plus élevée que les seconds. Mais il existe des variations importantes suivant la teneur en eau et en éléments minéraux ***(Site 6)* .**

- **L'indice de réfraction** : Il oscille entre 1,47 et 1,50 suivant sa teneur en eau à la température de 20°C. Il est souvent utilisé pour déterminer la teneur en eau ***(Site 4)***

- **L'hygroscopie du miel** : Le miel a tendance à absorber l'humidité de l'air qui permet d'apprécier la conservation du miel. En effet, le fructose a un grand pouvoir hygroscopique. Ainsi, un miel contenant 18% d'eau peut contenir au bout de trois mois 55% d'eau si on le laisse en atmosphère humide ***(Site 6)*** **(figure I-1)**



Figure I-1: Palette des couleurs des différents miels ***(Site 6)***

I.4. Composition moyenne du miel :

La composition chimique du miel est très complexe (**Tableau I.1)**. En effet, elle est influencée par les nombreuses étapes de transformation de celui-ci et par des facteurs très variables, comme la température et la ventilation de la ruche, la nature de la flore visitée et celle du sol sur lequel pousse ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles ou encore l'état physiologique de la colonie ***(Site 4)***

En résumé, le miel est grâce a sa constitution un élément intéressant pour certaines applications, les substances qui le composent agissant en synergie et est d'autant plus impossible a réaliser artificiellement.

I.5. Vieillissement du miel :

Le miel est un produit périssable qui subit au cours du temps un grand nombre de modifications aboutissant inévitablement à la perte de ses qualités essentielles. La rapidité de la dégradation dépend de la composition du produit ainsi que des conditions de sa conservation.

Tableau I.1 : Composition moyenne des miels européens

(Lobreau-Callen et Clément, 2000).

Composition	**Pourcentage total**	**Type de composés**	**Type de composés**
Hydrates de carbone	75 à 80 %	Monosaccharides	Fructose (38 %), Glucose (31 %)
		Disaccharides	Maltose (7,3 %), Saccharose (1,3 %), Isomaltose.
		Polysaccharides (1,5 à 8 %)	Erlose, Raffinose, (Mélézitose, Kojibiose, Dextrantriose, Mélibiose)...
Eau	15 à 20 % (moyenne 17 %)		
Substances diverses	1 à 5 % (moyenne de 3,5 %)	Acides organiques (0,1 à 0,5 %)	Gluconique (0,1 à 4 %), Formique (0,01 à 0,05 %), (Succinique), (Maléique), (Oxalique), (Citrique), (Glutamique), (Pyroglutamique), (Glucuronique),
		Protéines, peptides et acides aminés (0,2 à 2 %)	Matières albuminoïdes, matières azotées, la défensine-1, (Proline, Tyrosine, Leucine, Histidine, Alanine, Glycine, Méthionine, Acide aspartique).
		Vitamines	B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8 ou H, B9, C.
		Enzymes provenant des glandes hypopharyngiennes	Amylases α et β, Gluco-invertase, Glucose-oxydase
		Enzymes provenant du nectar	(Catalase, Amylases, Phosphatases acides).
		Minéraux	K, Ca, Na, Mg, Mn, Fe, Cu, Se, S, Cl, Zn, (Co, B, Si, Cr, Ni, Au, Ag, Ba, P, Cs).
		(Acétylcholine)	
Arômes		Esters	Méthylantranylate, Méthyléthylcétone, Acétates,
		Aldéhydes et acétones	Formaldéhyde, Acétaldéhyde…
		Alcools	Méthanol, Ethanol, Isobutanol, 2-Phényléthanol…
Pigments		Caroténoïdes et flavonoïdes	Flavanol, Catéchine, Quercétine, Pinocembrine, Pinobanksine, Lutéoline, Chrysine, Galangine, Kaempférol, Isorhamnétine, Méthylflavonol.
(Lipides)	Traces	Acides gras	(Acide palmitique, butyrique, caprique, caproïque, valérique, oléique, linoléique).
Les substances indiquées entre parenthèses sont à l'état de traces ; les pourcentages sont donnés par rapport au poids total du miel.			

I.5.1. La cristallisation:

Le miel est une solution sucrée sursaturée et, lorsqu'il est stocké dans les rayons de la ruche, il est généralement à l'état liquide. Mais c'est un état instable. Sous l'effet de la température et de la présence des germes de cristallisation (poussière, cristaux de glucose, grains de pollen), la cristallisation du miel s'amorce. Le processus de cristallisation des sucres est dépendant des rapports glucose/fructose et glucose/eau. La connaissance de ces rapports peut prédire l'aptitude des miels à cristalliser: elle sera faible pour un rapport glucose/eau inférieur à 1,7 mais très importante si cette valeur atteint 2,1 ***(Sablé. S, 1997)***. En effet, le glucose est peu soluble dans l'eau, il cristallise donc rapidement, alors que le fructose reste liquide. Un miel riche en glucose (teneur proche de 40%), cristallisera en deux à trois jours et pourra même cristalliser dans les hausses, comme c'est le cas pour les miels de colza ou de pissenlit. A l'opposé, les miels très riches en fructose (teneur supérieure à 42%), comme les miels d'acacia et de sapin, resteront liquides pendant plusieurs années. La plupart des miels se situent entre ces deux extrêmes et cristallisent naturellement en une à quatre semaines.

Pour que les cristaux se forment, il faut que les molécules de glucose rencontrent des germes de cristallisation, appelés aussi particules d'ensemencement, et s'y agglutinent. L'eau intervient également dans la vitesse de cristallisation ; en effet, trop d'eau perturbe ces rencontres ; au contraire, s'il n'y a pas assez d'eau, le miel sera tellement visqueux que les molécules ne pourront plus se déplacer et cristalliser. La température a un effet similaire, une température basse favorisant la viscosité du miel et une température élevée faisant vibrer les molécules de glucose et les empêchant de former des cristaux. Au delà de 30°C, la cristallisation d'un miel est arrêtée. Pour une humidité de 18%, la température optimale de cristallisation est de 14°C ***(Bruneau. E, 2002)***. La cristallisation n'altère pas les qualités du miel qui peut redevenir liquide par un simple chauffage modéré. Mais elle a des conséquences pour la conservation du miel, car la partie cristallisée a tendance à former un dépôt, tandis que la fraction restée liquide est exposée à une fermentation rapide. Pour favoriser une cristallisation rapide et homogène, l'apiculteur peut « ensemencer » son miel. Cela consiste à mélanger le miel que l'on souhaite cristalliser avec environ 10% d'un autre miel à cristallisation fine, qui introduira alors des cristaux qui serviront d'amorce à la cristallisation ***(Pham-Délègue. M, 1999)***.

I.5.2. La fermentation :

Tous les miels naturels contiennent des levures, responsables des fermentations alcooliques. Une teneur en eau trop importante (à partir de 18%) et une température excessive

leur permettent de se développer, ce qui provoque la fermentation du miel. D'autres micro-organismes présents dans le miel peuvent engendrer de différentes fermentations (lactique, butyrique, acétique, etc.). Toutes ces fermentations altèrent fortement les miels qui possèdent alors une acidité supérieure à la normale. Un miel fermenté présente généralement des bulles d'air dans sa masse et devient impropre à la consommation **(Fig. I-2)** ***(Pham-Délègue. M, 1999)***.



Figure I-2 : Miel fermenté ***(Bruneau. E, 2002)***.

I.5.3. Autres modifications liées au vieillissement du miel:

En vieillissant, le miel se transforme lentement en fonction de sa composition et de la température à laquelle il est conservé. On peut ainsi noter ***(Bruneau. E, 2002)***:

- Une intensification de la coloration et une augmentation de l'acidité ;

-Une diminution de la teneur en invertase et en amylase. Leurs activités dépendent de la température et de l'acidité du miel. Plus la température augmente (surtout au-delà de 40°C), plus elles se dégradent vite. C'est pourquoi il faut éviter les refontes à une température mal contrôlée, le stockage à haute température, la pasteurisation, etc. On peut donc mesurer l'activité des enzymes pour vérifier que le miel n'est pas dégradé;

- Une diminution de la concentration en glucose;

-Une augmentation de la teneur en l'hydroxyméthylfurfural (HMF) plus rapide dans les miels de miellats (plus riches en fructose et plus acides), et dans les miels acides (exemple du miel de ronce). Un chauffage excessif accélère également la production d'HMF;

- Une perte des propriétés antibactériennes du miel**.**

I.5.4. Conservation du miel :

En règle générale, la conservation du miel se fera à température constante, dans un récipient étanche, placé dans un endroit sec et à l'abri de la lumière. Grâce à sa haute teneur

en sucre, il se conserve très longtemps. Il se consomme idéalement dans les deux ans. Un miel cristallisé supporte mal les excès de température (plus de 25°C), qui risquent de provoquer l'effondrement de sa structure cristalline (déphasage). Il faudra donc le conserver dans un endroit où la température ne dépasse pas 20°C (deux ans au maximum). S'il est liquide, une température d'environ 25°C est souhaitable. Il faudra cependant le consommer rapidement, idéalement dans les 6 mois. Un miel trop humide sera conservé à 11°C, pour éviter qu'il ne fermente. Comme les miels absorbent l'eau, les pots seront fermés avec un couvercle hermétique et l'on évitera de les stocker dans un endroit trop humide. En hiver, des marbrures blanchâtres peuvent apparaître sur les parois du pot. Il s'agit la plupart du temps, de microscopiques bulles d'air qui demeurent prisonnières entre la paroi du pot et la masse de miel, et qui se rétractent en cristallisant. Regrettables sur le plan esthétique, elles n'altèrent en aucune manière la qualité du miel ***(Bruneau. E, 2002; Hakim. H, 2000)***.

I.6. Les propriétés du miel :

Le miel possèderait des « vertus » considérées comme « magiques » dans de nombreuses civilisations. Autrefois, on utilisait le miel, certes dans l'alimentation, mais aussi dans de nombreux rites. Pour beaucoup, le miel pouvait prolonger la vie. De tout temps, le miel a été considéré comme un agent de prévention de nombreuses maladies. Il est utilisé depuis l'Antiquité en médecine traditionnelle, on le retrouve également en médecine moderne dans le milieu chirurgical où il rend de très nombreux services. Le miel est souvent considéré comme un « alicament », c'est-à-dire un aliment à qui on prête des vertus médicales. En effet, il est crédité de nombreuses propriétés thérapeutiques et pharmacologiques que nous tenterons de découvrir.

I.6.1. Valeurs nutritionnelles et diététiques communes à tous les miels :

Le miel, aliment de tous les âges, est resté, jusqu'au siècle dernier, l'agent sucrant de choix pour l'alimentation, jusqu'à l'arrivée du sucre de canne. Le sucre de canne est pourtant loin de posséder les qualités organoleptiques ou la valeur diététique du miel. De par sa forte concentration en sucre, le miel est une source d'énergie par excellence. Le miel représente un apport énergétique de l'ordre de 300 kilocalories pour 100 gramme. Les sucres contenus dans le miel sont rapidement utilisés. De plus, le miel manifeste un pouvoir sucrant supérieur à celui du saccharose. En effet, le pouvoir sucrant du fructose et du glucose est en moyenne de 1,3 par rapport à une base de 1 pour le saccharose du sucre de canne ou de betterave. Ainsi, pour exercer un même pouvoir sucrant, il faudra seulement 7,5 g de miel contre 10 g de sucre

soit 22 calories pour le miel contre 40 calories pour le sucre, c'est-à-dire presque la moitié ***(Sablé. S, 1997; Site 4)***.

I.6.1.1. Le miel, un aliment pour les jeunes :

Pour les enfants dont le besoin en aliments énergétiques est bien connu, le miel apporte cette énergie disponible rapidement. On lui attribue également un effet bénéfique sur la croissance et sur la composition sanguine en favorisant une meilleure oxygénation. En effet, certains miels contiennent du fer et du cuivre ; le fer est présent dans l'hémoglobine au niveau de l'hème, et assure le transport de l'oxygène, alors que le cuivre est nécessaire à la synthèse et à la régénération de cette hémoglobine. Le miel favorise également l'assimilation du calcium et la rétention du magnésium par l'organisme contribuant ainsi à une meilleure calcification osseuse et dentaire. L'organisme humain a besoin d'une multitude de minéraux pour maintenir son équilibre métabolique. Bien qu'en concentrations très faibles, les oligo-éléments contenus dans le miel auraient une biodisponibilité et une absorption plus grande que ceux que l'on ingère sous forme isolée. Les enzymes, vitamines et oligo-éléments également présents dans le miel facilitent la digestion. En effet, les enzymes contenues dans le miel activent les processus de digestion, notamment des glucides. Les amylases favorisent la transformation des amidons en saccharides de poids moléculaires plus faibles. L'invertase catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et lévulose. La phosphatase joue un rôle dans la modulation du pH dans le milieu digestif. L'action des enzymes de la digestion est renforcée par la présence de vitamines et d'oligo-éléments (surtout minéraux). Ajouté au lait, le miel donne un aliment au goût très agréable, de haute valeur biologique et de valeur nutritive augmentée. De plus, par la qualité de ses sucres associés à des enzymes et en milieu acide, le miel assure une meilleure digestibilité du lait en permettant une floculation mieux adaptée à l'action des sucs digestifs. Enfin, les propriétés métaboliques des sucres contenus dans le miel suggèrent qu'ils pourraient contribuer au maintien de l'effort intellectuel et éviteraient une baisse d'attention notamment en fin de mâtinée ***(Sablé. S, 1997; Site 4)*** .

Note: Il existe un risque de botulisme chez les enfants de moins de 1 an, si le miel consommé est contaminé par des spores de *Clostridium botulinum* (les spores représentent la forme de résistance de cette bactérie qui est un bacille gram positif anaérobie, du genre *Clostridium*). Ce bacille sécrète une des toxines les plus puissantes du monde vivant. Active par ingestion, cette toxine diffuse ensuite dans l'organisme et agit en bloquant la transmission neuromusculaire, provoquant une paralysie généralisée flasque. Contrairement à la flore intestinale des enfants et des adultes, la flore intestinale des nourrissons n'est pas encore

mature et ne peut donc pas inhiber la germination des spores de ce bacille dans l'intestin, et la bactérie peut donc croître et se multiplier. Toutefois, les cas recensés sont très rares, et la contamination pourrait également être due au contact du bébé avec le sol, la poussière, ou à l'ingestion de la toxine préformée dans un aliment comme du jambon ou à la consommation d'une conserve contaminée. Il sera donc préférable d'éviter la consommation de miel avant 1 an ou alors, il sera conseillé de consommer un miel **pasteurisé** ***(King. L-A et al., 2010; Lefief-delcourt. A, 2010; Site 10)***.

I.6.1.2. Un aliment pour les personnes âgées:

Pour des raisons très diverses, mauvais appétit, digestion difficile, fonctionnement intestinal perturbé, perte d'énergie, fatigue, carences en vitamines et en oligo-éléments, etc., la consommation régulière de miel pourrait venir en aide aux personnes âgées pour pallier leurs déficits, en particulier en augmentant leur appétit. Les principes aromatiques et les acides présents dans le miel influencent favorablement la digestion en stimulant les glandes salivaires. De plus, le miel n'utilise pas les sucs gastriques, et cette surabondance de salive et de suc gastrique profite à la digestion des autres aliments ***(Site 5)***. On a également décrit pour le miel, un effet de protection contre certaines irritations des muqueuses digestives qui apparaissent avec l'âge. Le miel agirait en favorisant un repos relatif des intestins car la plupart des composants du miel sont absorbables sans transformation préalable. Par ailleurs, peu de composants alimentaires offrent une concentration naturelle en fructose aussi importante que le miel. Cette caractéristique explique en partie son pouvoir « laxatif » qui représente un avantage certain pour les individus dont l'inactivité physique perturbe le fonctionnement intestinal. De plus, le fructose est absorbé plus lentement que le glucose, et son séjour dans l'intestin grêle influence les échanges d'eau et de sels de façon non négligeable, produisant des effets bénéfiques au niveau du pH et de la flore intestinale. Le miel favoriserait aussi le sommeil par ses effets sur le système circulatoire, et l'effet calmant d'une cuillère de miel dans la tisane ou le lait chaud est bien connu. Enfin, pour prévenir les anémies, les miels foncés semblent plus efficaces car ils sont plus riches en fer, et les éléments minéraux présents dans ces miels foncés sont mieux assimilables que ceux apportés sous forme non associée ***(Sablé. S, 1997)***.

I.6.1.3. Un aliment pour les sportifs :

Par son apport énergétique relativement important, le miel est un aliment de choix pour les sportifs. A court terme, le glucose est un excellent carburant immédiatement

disponible; à plus long terme, le fructose prend le relais, car il est en effet capté par le foie (sans intervention de l'insuline) et mis en réserve sous forme de glycogène. Par la suite, cette réserve peut être libérée sous forme de glucose en fonction de l'effort à fournir. Ainsi, glucose et fructose apparaissent complémentaires dans leur utilisation. Par ailleurs, la nature des sucres du miel et la présence de certains oligo-éléments suggèrent la possibilité d'une meilleure récupération après l'effort ***(Sablé. S, 1997)***.

I.6.1.4. Un aliment pour les personnes diabétiques ?

Le miel qui contient en moyenne 38% de fructose, 31% de glucose et divers autres polysaccharides parmi lesquels, du saccharose, ne peut être considéré de prime abord, comme un aliment recommandable pour le diabétique. Toutefois, il n'est pas contre-indiqué, et peut être intégré dans la ration alimentaire d'un diabétique, mais uniquement dans le cadre strict de la ration de glucides qui lui est permise. Chez un sujet sain, les apports glucidiques doivent représenter environ 60% par jour ; chez un sujet diabétique, ils doivent représenter 50%. Le fructose est, parmi les sucres simples, celui qui induit la réponse glycémique la plus atténuée. Ainsi, l'index glycémique du miel est de 34,6 contre 100% pour l'index glycémique du glucose. Cela veut dire qu'une même dose de sucre apportée par du miel entraînera une élévation globale de la glycémie trois fois plus faible. De plus, le miel possède un index insulinogénique de 57% ; cela veut dire qu'une même dose de sucre apportée par du miel, va entraîner une diminution de 50% de la synthèse et de la sécrétion d'insuline par rapport à celle provoquée par le glucose. Ceci est important puisque l'on fait jouer à l'insuline, notamment dans les diabètes non insulinodépendants (c'est-à-dire de type II), un rôle de promoteur de l'artériosclérose (épaississement et durcissement des parois artérielles qui sont progressivement recouvertes par un dépôt de plaques riches en cholestérol induisant l'athérome). L'insuline pourrait donc être pour ce type de diabète, un facteur de risque. Il serait donc bénéfique pour un individu, notamment chez les personnes entre 40 et 50 ans, de ne pas avoir de pics d'insuline aussi prononcés que ceux que l'on obtient quand on prend du glucose. De plus, dans le cas d'un surdosage accidentel en insuline (traitement du diabète de type I), l'ingestion immédiate de miel peut apporter rapidement du glucose dans le sang et corriger les effets dramatiques de ce surdosage responsable d'hypoglycémie pouvant aller jusqu'au coma ***(Guiraud. J.P et all, 2000; Lecerf. J-M., 2009; Sablé. S, 1997 ; Site 4)***

I.6.2. Propriétés thérapeutique :

Outre leurs qualités énergétiques, tous les miels ont des vertus thérapeutiques communes, plus ou moins marquées selon leur origine florale. Dans un premier temps, nous aborderons les propriétés du miel reconnues en thérapeutique, puis des propriétés moins bien documentées mais communément admises ***(Assie. B, 2004)***.

I.6.2.1. Activité antibactérienne du miel :

Avec l'augmentation de la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques, le miel est de plus en plus apprécié pour son activité antibactérienne. La puissante activité *in vitro* du miel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel sur des plaies, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricide et bactériostatique du miel. On ne connaît pas encore précisément toutes les composantes antibactériennes du miel et ses vertus curatives constituent partiellement une énigme. Une étude récente a utilisé une nouvelle approche de neutralisation successive des différents facteurs bactéricides sur un miel de qualité médical, afin de les caractériser ***(Kwakman et al, 2010)***. Chacun des facteurs pris isolément a été testé sur plusieurs types de bactéries résistantes aux antibiotiques : *Baccillus subtilis*, *Staphyloccocus aureus* résistant à la méthicilline, *Escherichia coli* producteur de β-lactamase, *Pseudomonas aeruginosa* résistant à la ciprofloxacine et *Enterococcus faecium* resistant à la vancomycine. Tous les tests bactériens ont été sensibles à différentes combinaisons de facteurs bactéricides, indiquant la multiplicité des mécanismes mis en jeu.

I.6.2.2. Propriétés cicatrisantes :

Lors de la dégradation du glucose (du miel) en présence d'eau et d'oxygène par la gluco-oxydase, il y a formation d'acide gluconique et d'eau oxygénée (H_2O_2). L'eau oxygénée formée a un rôle très important dans le processus de cicatrisation. En effet, c'est un très bon antiseptique. Au contact des tissus et du sang, elle se décompose en eau et en oxygène ($H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$), ce qui crée une « microeffervescence » et un nettoyage mécanique de la plaie (détersion). De plus, le peroxyde d'hydrogène apparaît comme un véritable stimulus pour la multiplication cellulaire ainsi que pour la réponse à l'évolution de l'inflammation normale lors de la cicatrisation. Il stimule notamment la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales qui vont participer à la réparation tissulaire. Dans le même temps, il stimule également le développement d'une néovascularisation dans le tissu cicatriciel. (***Descottes. B, 2009)***. Le miel induit également la synthèse de collagène, active le

transforming growth factor-β1 (qui a un puissant pouvoir réparateur) ; à cela s'ajoute aussi des pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire. L'application du miel sur la plaie génère, grâce à ses propriétés hygroscopiques, un milieu humide favorable à l'ensemble des processus. La quantité d'eau libre du miel étant très faible, on pourrait s'attendre à un dessèchement des tissus. Au contraire, l'effet osmotique permet de drainer le plasma et la lymphe (qui peuvent contenir des éléments favorisant la reconstitution cutanée) ***(Goete. P, 2009)***. Ce milieu humide permet notamment une cicatrisation plus rapide qu'avec un pansement sec car on ne lèse pas les tissus épithéliaux nouvellement formés. De plus, l'osmolarité du miel favorise l'exsudation et donc la diminution de l'oedème au sein de la plaie **(*Descottes. B, 2009)***. Enfin, le changement du pansement s'effectue sans douleur. Cependant, les pansements créant un milieu humide peuvent favoriser la croissance des bactéries et sont donc contre-indiqués dans les plaies infectées. Mais le miel au contraire crée un milieu humide dans lequel la croissance des bactéries est évitée grâce à son activité antibactérienne. Le miel élimine également rapidement les mauvaises odeurs alors que des plaies malodorantes sont souvent rencontrées avec les pansements humides conventionnels. Cela peut s'expliquer par l'action antibactérienne du miel mais aussi par le fait que les glucides apportés par le miel sont utilisés par les bactéries à la place des acides aminés provenant du sérum ou des cellules mortes. Cela aboutit à la formation d'acide lactique à la place d'amines, d'ammoniac et de composés soufrés qui ont une odeur nauséabonde. Le maintien d'un environnement humide est également un avantage pour permettre le bon fonctionnement des enzymes protéolytiques et l'élimination des croûtes, du pu et des tissus morts. Tous ces mécanismes activent de façon très favorable la cicatrisation, et font du miel un pansement humide bio-actif d'une grande efficacité ***(Assie. B, 2004)***.

II.1. Les plantes médicinales :

La phytothérapie est le traitement des maladies par des plantes dites médicinales. Depuis la nuit des temps et à travers le monde les plantes sont utilisées à des fins thérapeutiques. La Pharmacopée française donne une définition claire des plantes médicinales ***(Site 5)***

«Les plantes médicinales sont des drogues végétales qui possèdent des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques».

Les plantes médicinales présentent pratiquement le seul arsenal thérapeutique à la disposition des guérisseurs traditionnels qui soignent dans certains pays du tiers monde (plus de 80% de la population). Dans les pays industrialisés de l'Europe, la consommation des plantes médicinales a doublé durant les deux dernières décennies ***(Hostettmann. K, 2007)***.

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. De tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments contre les bactéries a diminué ***(Pacha. H et al., 2002)***. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers les soins les moins agressifs pour l'organisme. Et on estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques ***(Iserin. P, 2001)***.

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. Ces derniers peuvent être analysés chimiquement afin de comprendre comment elles agissent sur l'organisme ***(Ticli. B, 2005 ; Verdrager. J, 2000)***.

II. 2. Récolte et conservation des plantes médicinales

II.2.1. Récolte des plantes médicinales :

La nature est une source très riche en plantes médicinales dont la récolte est à la fois utile et agréable. La récolte des plantes médicinales ne pose pas de gros problèmes. L'essentiel est de bien les connaître et de savoir les distinguer ***(Bardeau. F, 2003)***.

Identification des plantes:

Reconnaître les plantes sans se tromper est évidemment essentiel. Pour distinguer les espèces qui se ressemblent, il faut se procurer un guide des fleurs sauvages. Afin d'éviter toute intoxication, ne jamais cueillir une plante dont on n'est pas sur ***(Iserin P, 2001)***.

Pour les Anciens, de nombreuses plantes pouvaient être distinguées grâce à ce qu'ils appelaient la «signature » (signum: signe). Ils pensaient que la forme ou la couleur du végétal suffisait pour indiquer clairement son emploi et ses propriétés. Ainsi, les plantes à suc jaune, telles que la chélidoine, par exemple, guérissaient les maladies du foie, les plantes à suc rouge, telles que le millepertuis, guérissaient les maladies du sang, etc. Très souvent l'empirisme inspiré tombait juste, mais souvent, seule une solide confiance apportait les résultats exemptés. Quoi qu'il en soit, les indications fournies par la forme, la saveur, l'odeur et la couleur sont les seules caractéristiques qu'il est possible de retenir pour choisir les végétaux ***(Bardeau. F, 2003)***.

II.2.2. Conservation des plantes médicinales

Il existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four. Un endroit chaud et sec est l'idéal. Poser toujours les plantes sur du papier. Une fois séchées, les plantes se conserve plusieurs mois dans un sac ou un pot en verre teinté ou dans un sac en papier. Il faut vérifier toujours, au bout de quelques temps, que la condensation ne s'est pas formée sur les parois des récipients car cela constitue un symptôme de mauvais séchage ***(Iserin. P, 2001)***.

II. 3. Présentation de quelques plantes médicinales :

Le Marrube et l'oléandre ont fait l'objet de notre étude. Ces plantes ont été choisies en fonction de leur emploi très fréquent en Algérie. Pour cela, une revue bibliographique sur chaque plante est représentée en ci-dessous.

II. 3. 1. Marrube blanc

Le Marrube blanc **(Fig. II-1)** est une plante herbacée, vivace, du genre Marrubium et de la famille des Lamiaceae. Les botanistes la nomme "***Marrubium vulgare***", mais elle est connues sous des noms communs, tels que: marrube blanc, marrube commun, herbe à la Vierge, herbe aux crocs, marrube vulgaire, marrube des champs, bonhomme, bouenriblé, mariblé,.... En botanique on utilise les sommités fleuries ***(*RIZZO C; 2010*).***



Figure II.1 : Photo du Marrube *(*RIZZO. C, 2010*)*.

II.3.1.1.Etymologie :

Le nom de "Marrube" vient de l'ancien français "Marruge", "Marroge", "Maruje", c'est l'aboutissement phonétique normal du latin "Marrubium", rapprochée, par étymologie populaire, des mots de la famille de rouge. Car le mot "rouge" vient du latin "rubeus" qui signifie "roux".

Le nom botanique latin de la plante "Marrubium" proviendrait de "Maria urbs" une ancienne ville d'Italie. D'autres étymologistes avancent que son origine viendrait de "marrob" désignant un jus amer **(*Site 11)***

II.3.1.2. Histoire *(Jesus. RA et al, 2000)*:

En Égypte durant l'antiquité, le marrube était reconnu pour ses propriétés apaisantes contre la toux et pour soigner leurs infections respiratoires, sans doute, ils associaient la plante avec du miel. Dioscoride, médecin, pharmacologue et botaniste grec, préconisait le marrube blanc en décoction, pour soigner la toux. Antonius Castor (médecin romain qui vécut au Ier siècle) connaissait le marrube blanc comme le spécifique des affections de l'appareil respiratoire et Pline l'Ancien (écrivain et naturaliste romain du Ier siècle) indique de nombreuses préparations curatives utilisant le marrube.

Au Moyen Âge, on employait couramment le marrube blanc dans le traitement des mêmes maux que dans l'Antiquité, mais, la plante fut reconnue tonique, cholagogue et

diurétique. A cette époque, Hildegarde de Bingen (1098-1179) religieuse bénédictine mystique, compositrice et botaniste, en disait dans ses ouvrages:

«*Si on a les entrailles malades et en mauvais état, faire cuire du marrube avec du vin et une quantité suffisante de miel; une fois l'ensemble cuit, conserver dans un pot et boire froid: les entrailles retrouveront la santé*». Pour Jean-Emmanuel Gilibert (1741-1814) homme politique et botaniste français, le marrube blanc est considéré, dans son livre paru en 1798, "l'Histoire des plantes d'Europe", comme "*l'une des meilleures plantes médicinales*".

II.3.1.3. Habitat *(Ayoola. G.A et al, 2008)* :

On trouve le marrube blanc dans presque toute l'Europe, en dehors de l'Extrême Nord, mais il est surtout présent dans la région méditerranéenne. On le retrouve également en Afrique du nord et en Asie. Le marrube blanc apprécie les lieux incultes, décombres, en bordure de chemin, terrains vagues, prairies chaudes et sèches, garrigues. Tous les sols lui conviennent, mais on le trouve en général sur les sols calcaires.

II.3.1.4. Description botanique *(Ayoola. G.A et al, 2008)* :

- Le marrube blanc est une plante herbacée vivace à racines épineuses, ligneuses, blanchâtres. La plante à l'odeur du thym au froissement. C‘est une plante à reproduction entomophile.
- Origine de famille Lamiaceae /Labiatas (Labiées)
- Les tiges, de 40 à 70 cm, sont fermes, blanchâtres, cotonneuses (couverte d'un duvet blanc), dressées, un peu rameuse.
- Les feuilles, ovales et arrondies, sont souvent un peu cordées à la base, gaufrées et crénelées, feutrées à la face intérieure.
- Ses fleurs blanches sont très petites (12-15 mm de long), leur corolle a 2 lèvres, l'inférieure trilobée, la supérieure à 2 lobes. Le calice à dix dents courtes et crochues.
- Les fruits du marrube blanc sont 4 petits akènes cachés à la base du calice persistant.

II.3.1.5. Composition *(Site 11)*

Cette plante possède des lactones diterpéniques, tels que: la marrubiine, prémarrubiine, pérégrinol, vulgatol, marrubénol, marrubiol,... etc. Le marrube blanc contient, en outre, des minéraux tels que: le potassium et surtout beaucoup de fer. Elle présente également un certain taux de composés azotés caractéristiques de sa famille, tels que: la

choline, stachydrine, bétonicine,... . On retrouve également des saponosides, des flavonoïdes (Hétérosides flavoniques et flavonoliques, du quercétol, de la lutéoline et de l'apigénine, lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique), des mucilages, des résines, un peu d'huile essentielle (alpha-pinène, camphène, limonène, sabinène, para-cymène, para-fenchène,...) et des tannins.

II.3.1.6. Propriétés et vertus :

a/ <u>Propriétés principales</u>: *(Matuhe . L , 2001)*.

Les lactones diterpéniques sont mucolytiques et expectorantes, avec un tropisme respiratoire (saveur amère). D'ou leur action de fluidification des sécrétions bronchiques, de facilitation de l'expectoration, d'antitussif, et de dilatation des bronches.

La betonicine est un inhibiteur des molécules de signalisation des bactéries (quorum-sensing inhibitor), qui permettent la transmission de la résistance entre bactéries, c'est donc un excellent adjuvant aux traitements anti-infectieux

b/ <u>Propriétés secondaires</u> :

- Stomachique
- Diurétique
- Tonique
- Désinfectant
- Cholagogue
- Cardiotonique
- Emménagogue
- Fébrifuge

II.3.1.7. Indications thérapeutiques *(Ayoola. G.A et al, 2008)*:

Le Marrube blanc est traditionnellement conseillé en phytothérapie pour:

- Redonner de l'appétit,
- Traiter les troubles digestifs,
- Les gaz et les ballonnements,
- La toux,
- Le rhume,
- Traiter les gorges irritées,

De plus, il exerce un effet sédatif sur le cœur chez les personnes souffrant de troubles du rythme cardiaque (palpitations, extrasystoles).

II.3.2. Oléandre :

II.3.2.1. Présentation *(El Modafar. C et al, 2000):*

Le laurier **Rose** ou *Nerium oleander* **(Fig. II-2)** est un arbuste à la magnifique floraison estivale dont les **160 variétés** déclinent une large palette de couleurs. Il est généralement cultivé en véranda, sauf dans les régions du pourtour méditerranéen. Il ne doit pas être confondu avec le laurier cerise, le laurier tin et surtout avec le laurier sauce: en effet, toutes les parties de cette plante sont toxiques et ne doivent pas être utilisées en cuisine.



Figure II-2 : Photo de l'oléandre (Laurier rose) *(El Modafar. C et al, 2000).*

I.3.2.2. Étymologie et origine (*El Modafar. C et al, 2000):*

Le nom latin nerium vient du grec nerion signifiant « humide », indiquant la prédilection de cette plante pour les zones humides. Le laurier rose est originaire d'Afrique du Nord où des buissons fleuris se retrouvent sur le parcours des oueds. L'espèce est commune en Méditerranée où elle est cultivée.

II.3.2 3. Habitat et Répartition géographique (*Baba Aissa. F, 2001)*

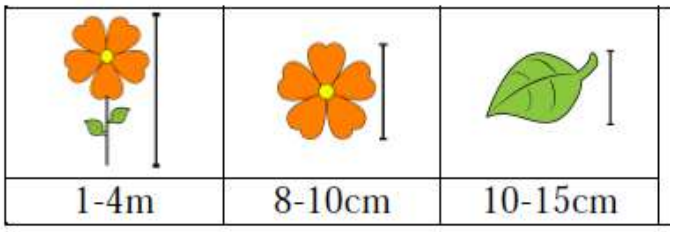
Originaire du Proche-Orient, on la retrouve dans le monde entier dans les régions à climat méditerranéen (Californie, Australie, etc.).

II.3.2.4. Description ***(Site 4)*** Cet arbuste de 2 à 5 m de haut, à feuillage persistant, présente de grandes touffes de feuillage vert. De juin à octobre, des fleurs en bouquet s'épanouissent à l'extrémité des branches. Ces fleurs possèdent de grandes corolles en tube, s'étalant en cinq lobes. Les capsules, très longues, s'ouvrent pour libérer des graines plumeuses **(Fig. II-3)**.



Figure II-3: Fleur de l'oléandre *(Dinesh. V, 2006).*

Principaux caractères d'identification (Baba Aissa Farid,2001):



Général	Arbrisseau à écorce grisâtre, rameaux dressés grêles à suc laiteux
Feuilles	- Feuilles longuement lancéolées, glabres, coriaces, persistantes, courtement pétiolées, - Le plus souvent verticillées par 3-4, parfois opposées, - Nervure principale très saillante, nervures secondaires fines, parallèles, serrées
Fleurs	- Fleurs roses, rarement blanches, grandes, odorantes, regroupées en corymbes terminaux, - Corolle en entonnoir terminée par 5 lobes étalés,
Fruits	- Follicules allongés, striés, soudés par deux, - Graines poilues surmontées d'une aigrette.

Remarques:

-Son nom «Oleander» provient de la ressemblance de ses feuilles avec celles de l'olivier «olea»

-Il existe de nombreux cultivars à fleurs simples ou doubles, et à pétales allant du blanc au rouge en passant par le jaune.

II.3.2.5. Principes actifs :

Les hétérosides du laurier rose sont des cardénolides. Le constituant majoritaire est l'oléandrine (3-0-α-L-oleandrosyl-16-acetylgitoxigénine) **(Fig. II-4)**.

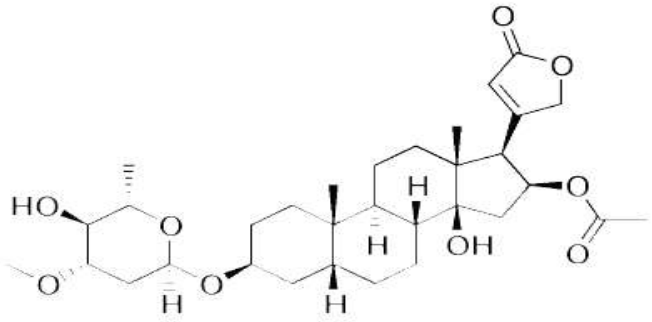


Figure II- 4 : L'oléandrine

Elle contient aussi d'autres hétérosides cardiotoniques, comme l'oléandroside, l'oléandrose, l'oleandrigénine, la glucosyloleandrine, le gentiobiosyl oleandrine, le nerigoside, etc.

II.3.2.6. Toxicité d'oléandre :

Toutes les parties de cette plante sont toxiques. Elle contient des substances cardiotoxiques proches de celles de la digitale. Même ingérée en faible quantité, l'ingestion de cette plante peut être mortelle. Une seule feuille peut tuer un homme.

Il ne faut jamais utiliser le bois de cet arbuste pour faire cuire des aliments ou faire un feu de cheminée. Certains accidents mortels sont intervenus à cause de l'utilisation de branches pour un barbecue. Ces dernières ont empoisonné les aliments. L'eau des pots est également toxique. Attention si vous possédez un animal domestique.

Très rapidement après ingestion, la victime ressent des nausées, des douleurs abdominales, des diarrhées, des vertiges et des troubles du rythme cardiaque. Des frissons, de l'hyperthermie et des convulsions précèdent l'asphyxie et la mort ***(Roux. D et al, 2007)***.

II.3.2.7. Quantité toxique:

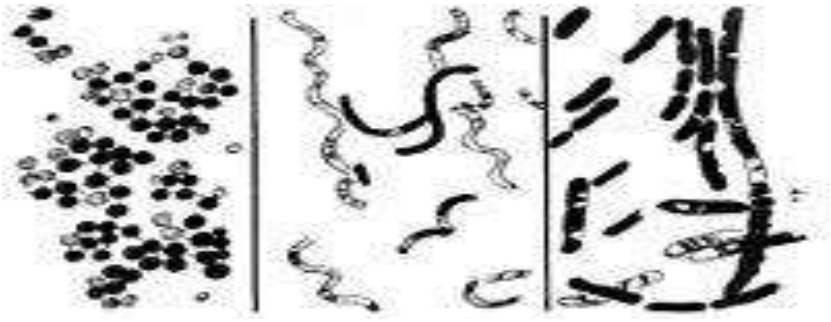
Elle est difficile à définir, car les données rarement complètes sont d'interprétation délicate. D'après Mack (2004) « One leaf can kill an adult **» *(Mack. RB, 2004)*** ; cependant 1 seul cas soutient cette thèse, et il s'agit seulement d'une suspicion. Le peu de données fiables rapportent des symptômes pour l'absorption d'une ou deux feuilles ; des symptômes sévères pour 6 ou 7 feuilles ***(Safadi. R et al, 2005)*** et un cas mortel pour l'équivalent d'une quinzaine de feuilles ***(Barceloux. DG et al, 2008)***.

III. 1. Bactérie *(Hahn. M et al, 2003)*:

Les bactéries (*Bacteria*) sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes (caractérisées par une absence de noyau et d'organites). La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2 µm, les plus petites mesurent 0,2 µm

Elles présentent de nombreuses formes **(Fig. III-1)** : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées.

.



Coques Spirillum bacilles

Figure III-1: Les différentes formes de bactérie *(Hahn. M et al, 2003)*.

Chez l'Homme, il a été calculé que 10^{12} bactéries colonisent la peau, 10^{10} bactéries colonisent la bouche et 10^{14} bactéries habitent dans l'intestin, ce qui fait qu'il y a dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines dans le corps humain. La plupart de ces bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme ***(Kenneth. T, 2007)***. Les bactéries peuvent être aussi très utiles à l'Homme lors des processus de traitement des eaux usées, dans l'agroalimentaire lors de la fabrication des yaourts ou du fromage et dans la production industrielle de nombreux composés chimiques ***(Ishige. T, et al, 2005)***.

Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose. Le plus souvent, les maladies bactériennes mortelles sont les infections respiratoires: la tuberculose à elle seule tue environ 2 millions de personnes par an, principalement en Afrique subsaharienne ***(Site 12)***. D'autres bactéries peuvent être responsables de l'infection d'une blessure (infections cutanés). Les infections bactériennes

peuvent être traitées grâce aux antibiotiques, qui le plus souvent inhibent une de leurs fonctions vitales (par exemple, la pénicilline bloque la synthèse de la paroi cellulaire).

Dans notre étude, nous avons utilisé deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) afin d'évaluer l'effet inhibiteur du miel et des extraits des plantes.

III.1.1. *Staphylococcus aureus:*

***a/* Nom commun:** Staphylocoque doré (Staph = grappe de raisin, aureus= doré).

b/ Caractères bactériologiques:

Le genre *Staphylococcus*, découvert en 1880 par Pasteur, appartient à la famille des *Micrococcaceae* et se compose de 36 espèces et 18 sous-espèces. *Staphylococcus aureus* en est l'espèce la plus fréquente et la plus connue ***(Larpent. J.P, 2007)***.

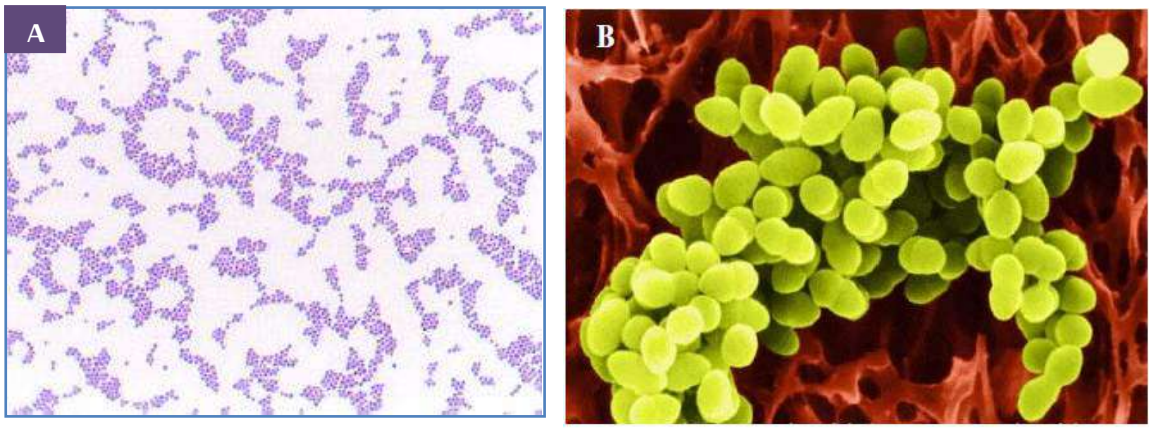


Figure III-2 : Aspect de *Staphylococcus aureus* en microscopie optique (X1000) (A) et en microscopie électronique (X15000) (B) *(Larpent. J.P, 2007)*.

La coloration Gram-positif (A) ainsi que la microscopie électronique (B) révèlent une croissance de *S. aureus* en amas **(Fig. III-2)**. C'est une coque à Gram+ de 0,5 à 1 micromètre de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaerobie facultatif, catalase+, fermentant le glucose, T° optimale de croissance: 37°C, pH optimum de croissance: 6-7 ***(Delarras. C, 2007)***.

c/ Habitat et pouvoir pathogènes :

C'est une bactérie ubiquitaire, présente dans tous les milieux naturels (air, poussière, sol, eau, égouts, vêtements), mais également ce germe est le plus régulièrement pathogène,

d'origine humaine, animale (volaille, bovin, ovin, caprin...), environnementale ou non spécifique ***(Delarras. C, 2007)***. C'est une bactérie présente chez les humains, lesquels sont à 95% responsables des contaminations alimentaires. 50% des humains sont porteurs de ce germe (cavité nasale), ceci même chez un individu en santé. On peut le retrouver en particulier dans les préparations alimentaires à cause d'un manque d'hygiène du personnel (porteurs sains ou blessures) ***(Larpent. J.P, 2007)***.

Les intoxications à ***S. aureus*** (la plus fréquente) sont plus répandues que celles des ***Clostridium botulinum***. Les entérotoxines de ***S. aureus*** (protéines globulaires de poids moléculaire 25000-28000 Dalton), sont très résistantes aux variations de pH (entre 4 - 11), aux enzymes protéolytiques (papaïnes, trypsine) et à la chaleur (30 mn/120°C), malgré que ***S. aureus*** est détruite par un traitement de pasteurisation. Même les traitements par Ultra Hight Temperature (U.H.T.) (143°C/10½) n'inactivent pas les toxines. Ces caractéristiques permettent aux toxines ingérées d'atteindre le tube digestif sans modification de leur toxicité. ***(Delarras. C, 2007; AFSSA. G, 2006)***.

La **Staphylococcitose** induite par cette bactérie est rarement mortelle chez l'homme**. L**es symptômes se traduisent soit par des syndromes gastro-intestinaux de types crampes abdominales, vomissements, nausées, diarrhées. Dans le cadre des intoxications alimentaires staphylococciques, les symptômes apparaissent très rapidement après l'ingestion de l'aliment contaminé (2-6h) et les douleurs peuvent être très violentes. Dans certains cas graves, l'individu infecté peut manifester du sang dans les selles, mais les personnes récupèrent en 24 heures (au maximum 2 jours). Les aliments impliqués dans ces cas d'infections à entéro-toxine de *staphylocoque*, sont les produits laitiers, les salades, les préparations à base de viande, volailles et poissons, les œufs… ***(Delarras. C, 2007, AFSSA G, 2006)***.

La prévalence du portage diminue avec l'âge dans la population générale allant de 60% environ dans la première année de vie à 40% entre 10 et 20 ans et 20 à 30% après 40 ans. Environ 20% des humains ne sont jamais porteurs et 30% sont des porteurs intermittents. Les facteurs de risque de portage sont le sexe masculin, le diabète, l'alcoolisme, l'insuffisance rénale terminale et la dialyse, les hépatopathies chroniques, une pathologie pulmonaire chronique, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, les infections cutanées par SA, certaines dermatoses chroniques (eczéma, psoriasis), l'obésité et les antécédents neuro – vasculaires ***(Wertheim. HF et al, 2005)***.

III. 1. 2. *Escherichia coli*:

a/ Caractères bactériologiques:

Escherichia coli est l'espèce type du genre *Escherichia* des entérobactéries. Appelée communément "colibacille" c'est-à-dire. "Bacille à côlon", cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram- aérobies. La plupart des *E. coli* se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plastes et à bords réguliers ***(Joly. B et Reynaud. A, 2002)***.

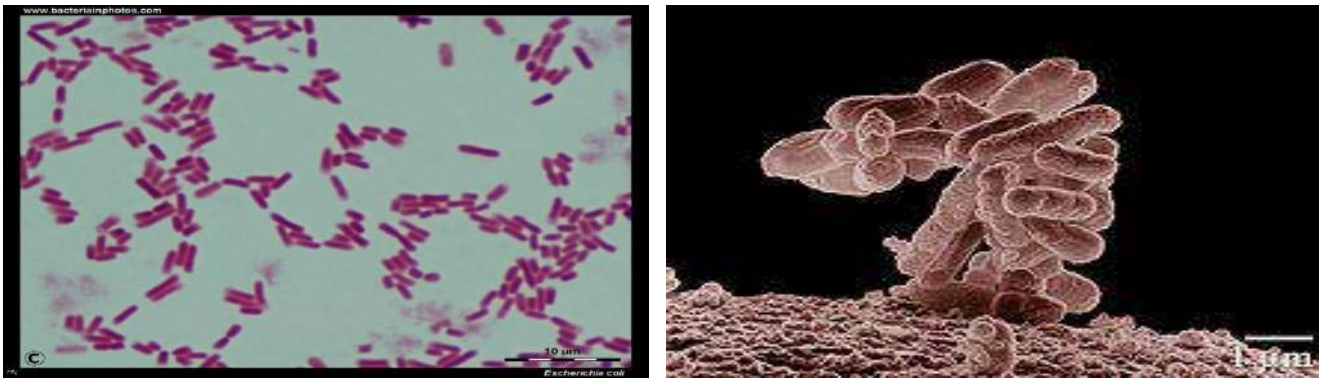


Figure III-3 : *E coli* en coloration de Gram (à droite) et *E coli* en grossissement × 10 000 au microscope électronique (à gauche) *(Site 2)*

b/ Habitat et pouvoir pathogènes :

C'est l'une des espèces bactériennes les plus souvent rencontrées en pathologie humaine ***(Berche. P, 2003)***.

Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif (présente à raison de 10^7 à 10^9 corps bactériens/g de selle des anaérobies) et pathogène pour l'appareil urinaire et qui se transmet par voie fécale. Certaines souches d'***E. Coli*** sont capables de causer des dommages au niveau de la muqueuse digestive se traduisant par un syndrome infectieux ***(Avril. J.L, 2000)***. Les aliments incriminés sont: l'eau (dans certains pays), les viandes et le lait cru. La durée d'incubation est de 3 à 9 jours pour provoquer des gastro-entérites peu graves, diarrhées abondantes et liquides (turista) ***(Joly. B et Reynaud. A, 2002)***.

L'espèce *E. coli* regroupe plusieurs sérotypes dont certains sont pathogènes pour l'homme et, qui sont répartis en six groupes: *E. coli* entérotoxigène; *E.coli* entéro-invasif; *E. coli* entéropathogène ; *E. coli* entéroagrégant, *E. coli* entéroadhérant diffus; *E. coli* entérohémorragique. Les symptômes observés chez l'homme sont généralement des diarrhées

précédées de violentes douleurs abdominales et suivies généralement de diarrhées sanglantes. Les aliments impliqués sont les viandes hachées crues ou peu cuites, les eaux de distribution et certains jus de fruits, les produits laitiers non pasteurisés et les végétaux crus. Les principaux réservoirs de ces sérotypes sont les tractus intestinaux des bovins et des ovins qui contaminent les sols et les eaux via leurs déjections ***(Delarras. C, 2007)***.

III. 2. Les agents antimicrobiens *(Site 1)* :

Ce sont des substances dont le contact, dans des conditions définies avec les microorganismes, entraine, soit l'arrêt de leur multiplication, soit leur mort. Chaque agent est défini par son spectre d'activité (liste des espèces vis-à-vis desquelles cet agent à une action). L'activité peut être :

- **Bactéricide:** propriété de tuer les bactéries.
- **Bactériostatique:** propriété d'inhibée momentanément la croissance bactérienne.
- **Fongicide:** propriété de tuer les champignons.
- **Sporicide:** propriété de tuer les spores bactériennes.
- **Virucide:** propriété de tuer les virus.

III.2.1. Les antibiotiques:

III.2.1.1. Définitions:

Il s'agit de molécules toxiques, pour un groupe cible de micro-organismes. Leur mode d'action est spécifiques, ils agissent à faible dose, ils sont en général synthétisés par des bactéries, moisissures, levures, puis modifiés chimiquement ***(Nasser. S, 2005)***.

III.2.1.2. Classification des antibiotiques :

Ils sont classés suivant plusieurs critères :

- l'origine de leur production.
- le spectre d'activité.
- le site d'action.
- la nature chimique.

III.2.1.3. Modes d'action des antibiotiques :

a/ Action au niveau de la paroi :

Ils inhibent la synthèse du peptidoglycane des bactéries en phase de croissance.

b/Action au niveau de la membrane cytoplasmique :

Ces antibiotiques désorganisent la membrane. L'action bactéricide se fait à la fois sur les bactéries en phase de croissance ou non, ainsi que sur des protoplasmes.

c/ Action sur la synthèse des protéines:

Elle se fait à plusieurs niveaux :

- des ribosomes.
- de la formation des protéines.

d/Action par inhibition compétitive :

Les antibiotiques sont alors des antis-métabolites ou des analogues structuraux.

III.2.2. Les extraits végétaux :

Les plantes constituent une source intéressante, en raison de la diversité chimique de leurs constituants, lesquels sont souvent difficiles, voire impossibles, à synthétiser. Cependant, des composés isolés de plantes sont fréquemment utilisés mais ils sont souvent trop peu sélectifs et provoquent des dégâts au niveau des cellules et des tissus normaux, ce qui engendre de sévères effets secondaires. L'index thérapeutique (la différence entre la dose efficace et la dose toxique) est trop étroit et, de ce fait, la dose du médicament ne peut pas être augmentée pour avoir l'effet souhaité ***(Jean-Jacques. M, 2005)***.

Un extrait végétal est un mélange complexe de différents composés, souvent étroitement apparentés, capables d'agir sur différentes cibles. Cette particularité fait de ce produit un intéressant cocktail d'origine naturelle. En raison de la concentration généralement basse des constituants, la *toxicité* est faible tandis que, du point de vue de l'activité, on observe souvent une synergie. En outre, les extraits végétaux peuvent représenter une alternative moins onéreuse par rapport aux autres traitements ***(Site 3)***

III.2.3. Les miels :

Chaque miel possède une composition propre qui lui donne des caractéristiques et des propriétés plus ou moins particulières dont découlent des applications diététiques et thérapeutiques plus ou moins spécifiques. Grace à sa richesse en éléments biologiques, le miel augmente aussi les capacités du système de défense immunitaire, renforçant ainsi la résistance de notre organisme dans sa lutte contre les agressions. Sa richesse participe aussi directement à une action non négligeable de complémentation alimentaire palliant de

nombreuses micro-carences qui causent à long terme des troubles maladifs plus ou moins importants ***(Maryse. V, 2008)***.

Les miels ont tous des propriétés antiseptiques, antibiotiques, antitussives, expectorantes, anti oxydantes, nutritives, régénératrices, stimulantes, antibactériennes, antivirales, cicatrisantes, énergétiques du fait de leur teneur en glucides (principalement du fructose et du glucose) et antianémiques (en apportant du fer et du cobalt). Ils favorisent la digestion et l'assimilation des autres aliments, détoxifient le foie, exercent une action laxative, équilibrent le système nerveux, calment les maux de gorge...

Le miel est aussi utilisé pour favoriser la cicatrisation de petites plaies ou brûlures, il soigne également les brûlures d'estomac. Il est efficace contre la prolifération bactérienne et accélère la cicatrisation tout en évitant l'infection ***(Mostefaoui . M, 2008)***. Le miel contient deux protéines qui expliquent ses propriétés antibiotiques:

- des inhibines, qui freinent ou inhibent la reproduction des bactéries;
- des défensines (protéines qu'on trouve chez divers vertébrés et invertébrés, dont insectes) et qui jouent un rôle chez l'homme, dans le système immunitaire. Un dysfonctionnement de cette protéine provoque des maladies chroniques, dont la maladie de Crohn.

Des Néerlandais ont récemment montré que ces défensines étaient la substance la plus antibiotique naturelle du miel. Elle s'est montrée *in vitro* active contre *Bacillus subtilis* ou contre des souches d'*Escherichia coli* multi-résistantes aux antibiotiques, ou contre des staphylocoques responsables d'infections nosocomiales, comme *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline, *Pseudomonas aeruginosa* résistante à la ciprofloxacine et *Enterococcus faecium* résistante à la vancomycine. Tous ces microbes ont été tués par 10 à 20 % de miel dans leur milieu de culture (1 ou 2 millilitres de miel pour 10 millilitres de culture bactérienne), ou par 40 % de sucre extrait du miel ***(Paulus. H et al, 2010)***.

III. 3. Techniques d'études de l'effet antimicrobien :

III.3.1. Critères de mesure de la sensibilité bactérienne aux antimicrobien:

La mesure de la sensibilité d'une bactérie à un agent antimicrobien repose essentiellement sur des mesures effectuées sur des cultures bactériennes *in vitro*.

III.3.1.1. La concentration minimale inhibitrice (CMI)

a/Définition:

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antimicrobien capable, d'empêcher une suspension limpide de 10^5 Unités Formant Colonies par millilitre de devenir trouble après 24h d'incubation à 37°C. L'apparition de cette turbidité correspondant à

une multiplication d'un facteur 10 environ de la concentration en bactéries ***(Levison. M.E, 2004)***. Cette valeur est susceptible d'être influencée par des facteurs tels que le milieu, la taille de l'inoculum, la température ou le temps d'incubation, ce qui explique la nécessité de méthodes de détermination standardisées afin d'obtenir des résultats comparables ***(Andrews. J.M, 2001)***.

La CMI constitue l'indicateur le plus utilisé pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un antimicrobien, que ce soit dans des laboratoires de diagnostic pour évaluer la résistance d'un germe vis-à-vis d'un antibiotique ou dans le cadre de recherches visant à évaluer *in vitro* l'activité d'une substance antibiotique.

b/ Obtention:

Méthode sur milieu liquide

L'ensemencement est réalisé sur des milieux de cultures liquides contenant des concentrations décroissantes d'antibiotiques suivant une loi géométrique de raison 0.5. On détermine alors par une méthode turbidimétrique la CMI du germe étudié comme la concentration la plus faible pour laquelle les bactéries ne se sont pas développées en 24h **(Fig. III-4)**. Compte tenu de sa lourdeur, cette méthode est aujourd'hui peu utilisée en pratique dans les laboratoires d'analyse mais elle constitue la méthode de référence ***(Penel. N et al, 2009)***.

Méthode en milieu solide par mesure du diamètre des cercles d'inhibition:

La mesure des diamètres des cercles d'inhibition est la méthode la plus utilisée pour la mesure de la sensibilité bactérienne dans les laboratoires d'analyse. Elle consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'un agent antibiotique donné, sur un milieu de culture solide ensemencé. Il se forme alors un gradient de concentrations en antibiotique autour du disque de papier et la croissance bactérienne est bloquée jusqu'au diamètre où les concentrations du gradient sont égales ou supérieures à la CMI **(Fig. III-5)**. Cela permet d'établir une corrélation entre ces diamètres d'inhibition sur les disques de gélose où les bactéries ne se développent pas en 24h et les CMI mesurées par une méthode de référence

(existence d'une relation entre le diamètre de la zone d'inhibition et le logarithme de la CMI)
Ce type de méthode, extrêmement rapide à mettre en œuvre, pose des problèmes d'interprétation des résultats et de leur expression en termes qualitatifs à cause du caractère imprécis de la relation liant les diamètres des disques d'inhibition aux CMI. En effet, on observe une importante variabilité des diamètres des disques d'inhibition pour des souches de

mêmes CMI de façon plus marquée chez les bactéries anaérobies que chez les bactéries aérobies ***(Metzler. C.M et al, 2004)***. Cela a conduit à introduire de façon systématique pour l'expression qualitative des résultats de l'antibiogramme une catégorie intermédiaire et à classer fréquemment les bactéries sensibles en bactéries dites résistantes et cela, pour éviter un risque d'erreur qualifié de majeur, c'est-à-dire de déclarer à tort une bactérie réellement résistante comme étant sensible.

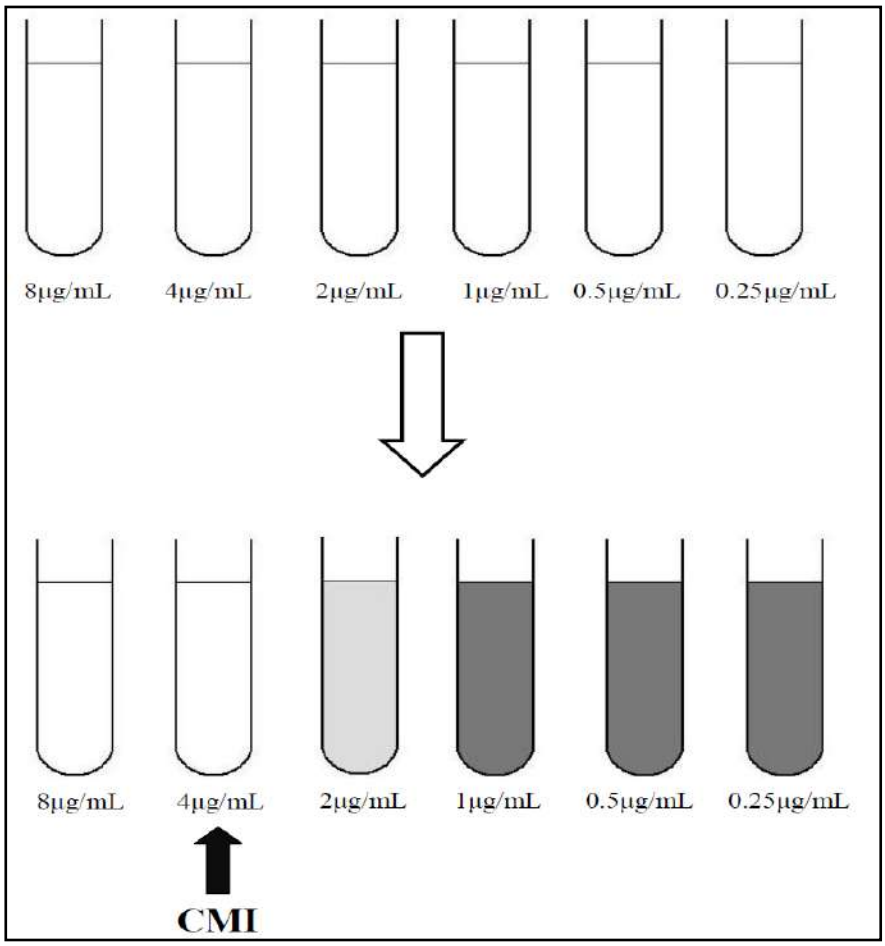


Figure III-4: Schéma de la méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

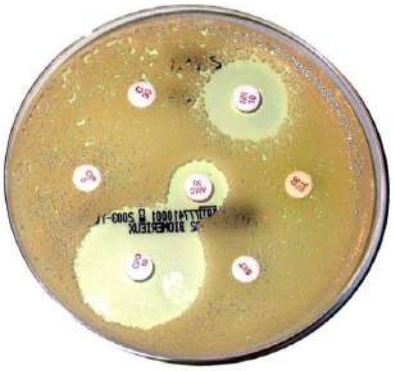


Figure III-5: Photographie d'un antibiogramme réalisée par mesure des cercles d'inhibition *(Wikipedia, 2008)*

III.1.1.2. Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide d'un antibiotique vis-à-vis d'un germe donné est la plus petite concentration capable d'inhiber *in vitro* la croissance bactérienne après sous-culture sur un milieu sans antibiotique. Sa valeur est supérieure à celle de la CMI. Cet indicateur est moins fréquemment utilisé que la CMI ***(Andrews. J.M, 2001)***.

Le rapport CMB/CMI permet de classer les antibiotiques suivant leurs caractères comme bactéricides (rapport proche de 1) ou bactériostatiques (rapport supérieur à 4) ***(Pankey. G.Â A et al, 2004)***.

Conclusion

D'après **Kerkvliet, 2006**, l'effet antimicrobien du miel peut partiellement être expliqué par son contenu important en enzyme, le glucose oxydase, qui active la transformation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène. L'enzyme reste active tous le temps de la transformation du nectar en miel. Dans le miel mûr, l'enzyme n'est plus active mais reste intacte. Si le miel est dilué avec un peu d'humidité, l'enzyme est réactivée. Cette idée a été annoncée depuis plus de 14 siècles par notre prophète MOHAMED qui insiste sur "boire du miel dilué".

Au terme de ce travail, L'étude des paramètres physico-chimiques du miel montrent que les deux miels (**Multi-fleurs** et **Harmel**) présentent des teneurs en eau inférieurs à 20% défavorables à la fermentation, ont des pH acides, sont très riches en sucres réducteurs et leurs densités est en accord avec les normes.

L'étude de l'effet antibactérien des deux miels montre clairement:

- qu'ils présentent leurs activités maximales sans traitement thermiques et dans une marge de pH située entre leurs pH(s) naturels et la neutralité,
- que ces miels sont dotés d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les souches bactériennes à Gram+ et à Gram-. *E. coli* est plus sensible à l'effet des deux types de miel par rapport à *S. aureus*.
- les deux miels ont des effets antibactériens très voisins.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antibactérien des extraits de ***Marrubium vulgare*** et ***Oléandre nerium***. Les résultats ont montré que:

- la macération constitue la meilleure méthode d'extraction,
- *E. coli* est sensible uniquement à l'extrait de l'Oléandre fraiche alors que *S. aureus* est sensible à trois extraits (Oléandre sèche, le Marrube frais et sec).
- le seuil minimal du rapport m/v nécessaire à la préparation des extraits est fixé comme suit :
  - 0,1 g/ml pour le Marrube frais et l'Oléandre sèche,
  - 0,24 g/ml pour le Marrube sec,
  - 0,08 g/ml pour l'Oléandre fraiche.
- les différents extraits expriment leurs maximums d'effets inhibiteurs aux pH naturels obtenus dans les conditions optimisées.

- parmi les plantes actives sur *S. aureus*, le Marrube sec donne un extrait à effet antibactérien le plus prononcé (CMI la plus petite< à 25%) suivie de celui de l'Oléandre sèche (50%-75%) et en dernier celui du Marrube frais (75% - 100%).
- l'extrait d'Oléandre fraiche donne une CMI située entre 50% et 75% vis-à-vis d'*E coli*.

Afin d'améliorer l'activité antimicrobienne des miels et de l'extraits choisis, nous avons mené un couplage entre ces deux composants. Suivant les résultats que nous avons obtenus expérimentalement, nous pouvons dire que le couplage des miels avec les extraits révèle une activité inhibitrice très importante à cause des interactions entre leurs constituants. La nature des interactions entre les miels et les extraits testés pourrait être une synergie pour tous les mélanges sauf celui obtenu avec le Marrube sec qui a un effet + ou – additif.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de sources naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence. De plus, la recherche d'association plus complexe à effet plus important est souhaitée ultérieurement afin de trouver une application dans le secteur de l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

Introduction

Chapitre I :

Le miel

Chapitre II :

Les plantes médicinales

Chapitre III :

Bactéries pathogènes et agents antimicrobiens

Chapitre IV :

Matériels et méthodes

Chapitre V :

Résultats et discussions

Conclusion

Annexes

Références bibliographiques

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'hygiène d'eau de la direction de la santé publique (DSP), wilaya de Médéa et du Hall technologique de l'université « Yahia Farès » de Médéa.

IV.1 Matériels :

IV.1.1. Matériels biologiques

IV.1.1.1. Miels (Fig. IV-1):

a/Miel de multi fleurs : Le miel de multi fleurs est issu de plusieurs fleurs, de couleur plutôt sombre, d'un gout prononcé et d'une saveur agréable.

b/Miel de Harmel: Le miel de Harmel est en provenance des fleurs de Harmel, d'une couleur plus claire, en plus de son goût succulent. Le miel Harmel est utilisé pour traiter différents troubles : digestifs, cutanés et infectieux.

Remarque: Harmel c'est une plante à grosse racine vivace; glabre, gris-vert, à puissante odeur désagréable; en touffe de 15 à 60 cm de haut. Feuilles alternes, épaisses, découpées en lanières de 3 à 5 mm. Fleurs blanches: 5 sépales, 5 pétales, 12 à 15 étamines. Fruit : capsule à 3 ou 4 loges.





Figure IV-1 : Présentation des échantillons de miels étudiés.

IV-1-1-2 Souches bactériennes :

Les souches microbiennes testées ont été fournies par le laboratoire d'hygiènes d'eau. Il s'agit d'isolats cliniques responsables d'infections nosocomiales. Ainsi, nous avons retenu les espèces suivantes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus.*

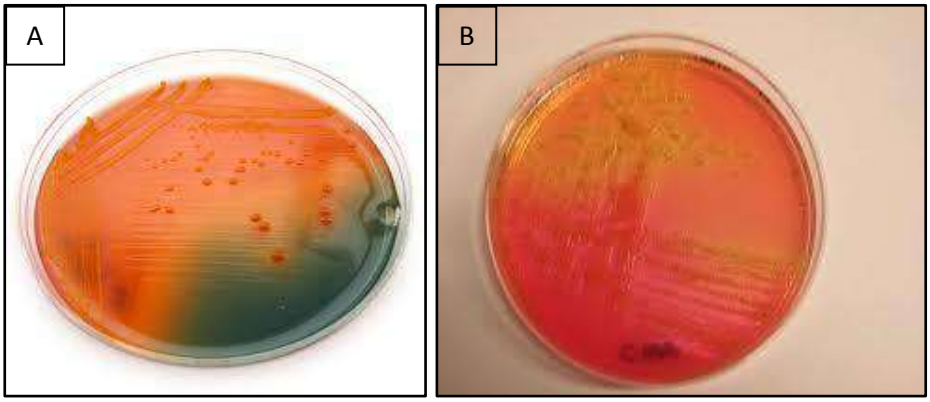


Figure IV-2: A: *E coli* isolé sur Hektoen, **B:** *Staphylococcus aureus* isolé sur Chapman.

IV.1.1.3. Les plantes : Deux genres de plantes ont été utilisés : Marrube et Oléandre en plus Laurier. Ces plantes ont été récoltées fraiches au niveau de la région de Médéa, en Avril 2013. Il s'agit des espèces suivantes : ***Marrubium vulgare*** et ***Oléandre Nerium***

IV.1.2. Matériels non biologiques:

IV.1.2.1. Solution, produits et milieux:

- Solution étalons de pH(s) connus pour l'étalonnage de pH-mètre,
- Méthanol,
- Ethanol,
- Liqueur de Fehling,
- Solution de sulfate ferrique 0.1 M 10%(v/v) de H_2SO_4,
- Solution de permanganate de potassium 0.1M,
- Gélose Chapman pour l'isolement des ***Staphylocoques***,
- Gélose Hektoen pour l'isolement des ***Entérobactéries***,
- Gélose de conservation en tubes,
- Solution de violet de gentiane,
- Solution de Lugol,
- Solution de Fushine,
- Huile à immersion,
- Huile de paraffine stérile,
- Eau oxygénée (H_2O_2) à 10%,
- Disques d'oxydases,

- Milieux pour la recherche des décarboxylases (ADH, LDC, ODC),
- Milieux urée indole,
- Perchlorure de fer,
- Réactif de Kovacs,
- Disques d'ONPG,
- Milieu « citrate de Simmons »,
- Milieu « TSI »,
- Milieu « Mannitol Mobilité »,
- Milieu « Clark et Lubs »,
- Rouge de méthyle,
- Solution à 6% d'alphanaphtol dans de l'alcool à 90° (Réactif VP1),
- Solution de NaOH 4N (Réactif VP2),
- Galerie API 20,
- Eau physiologique stérile,
- Eau distillé stérile,
- HCl,
- NaOH,
- Désinfectants (eau de javel, alcool…).

IV.1.2.2. Petit matériel et verrerie :

a/ Verrerie: Béchers, Burette, Eprouvettes, Ballons, Erlenmeyers, Mortier, Verres de montres et Spatules, Pipettes graduées, Tubes à essai en verre.

b/ Matériels microbiologiques: Lames et lamelles, Pipettes pasteurs, Pince en acier, Anse de platine, Bec bunsen, Micropipettes à volumes réglables et à volumes fixes, Compresses stériles, Boites de pétrie en plastiques, Disque en papier filtres stériles. Autres : Papiers filtres, Thermomètre, Règle, Marqueur.

IV.1.2.3. Grands matériels :

- Balance analytique (Type :Sartorius),
- pH-mètres (Type : HANNA instrument),
- Réfractomètre (Type : exacta + optech),
- Chauffe ballon,
- Etuve 37°C et 40°C (Type :Memmert),

- Bains marie (Type :Gel et Jouan),
- Four pasteur (Type :JUMO),
- Agitateur (Type :Heidolh),
- Microscopes optiques (Type :Optech et Leica-cme)

IV.2. Méthodes :

V.2.1. Identification des souches utilisées :

Avant d'utiliser les souches isolées, il faut d'abord confirmer leurs identifications. Cette dernière passe par les étapes suivantes. :

IV.1.2. 1. Critères morphologiques *(Belmekki. N, 2009)*:

L'étude de la morphologie bactérienne est le premier acte effectué par un laboratoire de diagnostic pour identifier une bactérie. L'observation de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire du diagnostic.

1/Critères Macroscopiques :

À l'œil nu, on peut distinguer les caractéristiques d'une colonie :

- La forme du relief (bombée, semi-bombée, plate),
- La taille,
- La couleur,
- L'aspect (collant, filamenteux...),
- L'odeur,
- La transparence (opaque, translucide),
- L'allure des contours (régulier, dentelés),
- La consistance,
- La pigmentation,
- Aspect de la surface (lisse ou rugueuse). Il existe trois grands types de colonies:
  - ✓ colonies de **TYPE S** (Smooth=lisse): contours lisse et réguliers, semi-bombée, surface brillantes, crémeuses,
  - ✓ colonies de **TYPE M** (Muqueux): contours lisse et réguliers, très bombées, surface très brillantes, filantes,
  - ✓ colonies de **TYPE R** (Rough=rugueux) : contours irréguliers, plates rugueuses et mates, sèches.

2/Critères microscopiques:

a/Etat frais:

L'état frais se fait avec une suspension de bactéries entre lame et lamelle. La suspension n'est pas fixée sur la lame (comme dans le cas de la coloration de gram) pour ne pas tuer les bactéries, car le but de cette observation est de voir leurs mobilités (on peut voir aussi la morphologie mais cela se voit mieux en coloration de gram).

Technique:

- Nettoyer une lame,
- Déposer des gouttes d'eau physiologique au centre de la lame,
- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, prélever une parcelle de la culture et l'étaler dans l'eau physiologique,
- Placer une lamelle,
- Examiner avec tous les objectifs.

b/ Coloration de Gram *(Chacou. M H et Bassou. K, 2007)*:

La **coloration de Gram** doit son nom au bactériologiste danois **Hans Christian Gram** qui mis au point le protocole en 1884.

Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance : la muréine (le peptidoglycane). Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram-, tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues. Cette paroi de part son organisation permet de les classer soit en Gram+ ou en Gram-. Cette coloration a un rôle taxonomique important. Elle permet ainsi, la reconnaissance de la morphologie et le mode de groupement des bactéries. Cette coloration de Gram se réalise en 7 étapes :

1. ***Préparation du frottis :*** Réaliser un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne: agiter la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. A l'aide d'une anse stérile (sous la flamme du bec benzène), prélever un peu de la suspension bactérienne. Déposer ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
2. ***Fixation :*** Fixer le frottis par passage de la lame dans la flamme du bec Bunsen (3 fois).
3. ***Coloration au violet de Gentiane (colorant basique):*** la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans le violet de gentiane puis rincée à l'eau déminéralisée. Toutes les bactéries sont colorées en violet.

4. ***Mordançage au Lugol (solution iodo-iodurée)*:** Etaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
5. ***Décoloration à l'alcool**:* Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram- : l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparait. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, la bactérie est dite Gram+.
6. ***Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine**:* laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée puis sécher la lame. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

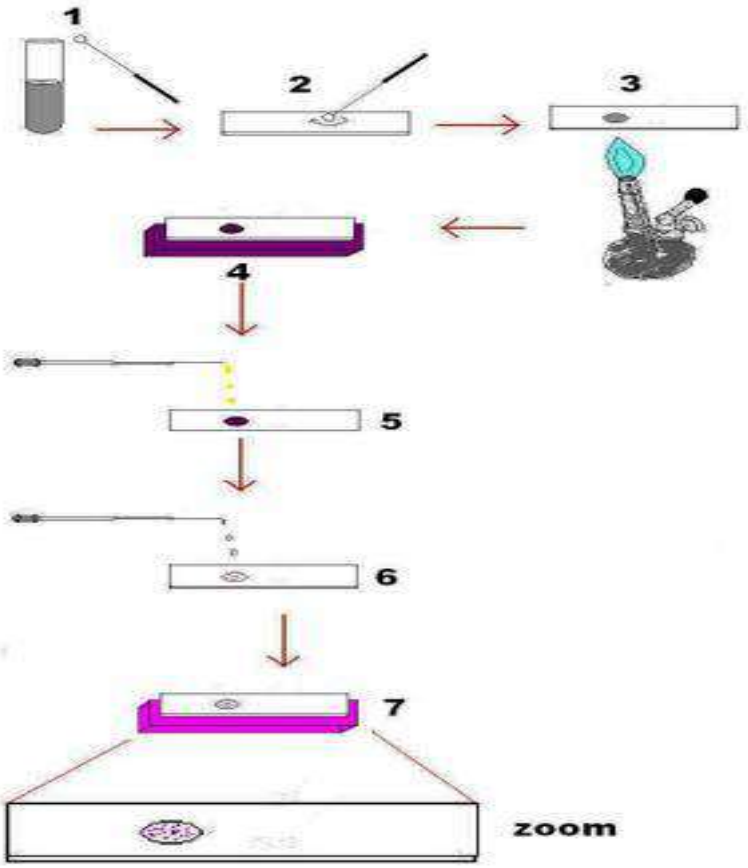


Figure IV-3 : Les étapes de Coloration de Gram *(Site 12)*

7. Lecture :

Les bactéries à Gram+:

les Staphylocoques apparaissent en "grappe de raisin" violette.

les Streptocoques sous la forme d'une chainette violette.

Les bactéries à Gram-:

Escherichia* coli *(Entérobactérie) apparait sous la forme de bacille rose.

IV.1.2.2. Critères biochimiques :

Chaque famille de bactéries a des caractères biochimiques propres. On peut rassembler les critères biochimique d'une bactérie à identifier afin de tirer une conclusion quand à son appartenance à une famille donnée.

1/Recherche de la catalase *(Nehme. N et al, 2008)*:

But : C'est un test fondamental pour orienter l'identification des coques et bacilles Gram (+) positives.

Principe : Pendant leur respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce à des enzymes qu'elles synthétisent, notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction:

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½\ O_2$$

Technique : On utilise de l'**eau oxygénée (H_2O_2)** à 10 volumes, fraîchement préparée et stockée dans un flacon opaque. La technique se résume ainsi :

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée.
- Prélever stérilement une colonie à l'anse de platine.
- Déposer la colonie dans la goutte d'eau oxygénée.
- **Lecture :** Apparition de bulles d'oxygène → H_2O_2 est dégradé en H_2O et ½ O_2 → La bactérie possède une catalase, elle est dite Catalase(+) **(Fig. IV-4)**. Pas d'apparition de bulles d'oxygène → H_2O_2 n'est pas dégradé en H_2O et ½ O_2 → La bactérie ne possède pas une catalase, elle est dite Catalase (-).

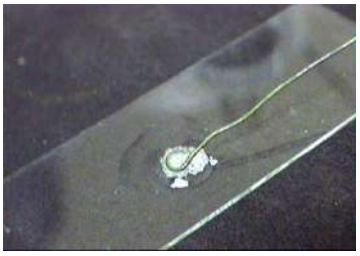


Figure IV-4 : Bactérie catalase +

2/Recherche de l'oxydase *(Nehm. Net al, 2008)*:

But: Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques Gram –.

Principe: Si une bactérie possède la cytochrome oxydase (dernière enzyme de la chaîne respiratoire), elle peut donc faire la réaction suivante:

Cytochrome oxydase

PDA → PDA

(chromogène forme réduite incolore) *(chromogène forme oxydée rose violacée)*

Le PDA est l'oxalate du N-diméthyl paraphénylène diamine. On peut utiliser ce réactif en solution mais le plus souvent en disques imprégnés (disques oxydases).

Technique :

- Placer un disque d'oxydase sur une lame (NB: ces disques sont des papiers filtres imbibés d'un réactif qui est l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène-diamine),
- Imbiber le disque avec de l'eau distillée,
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une parcelle de la culture et la déposer sur le disque.

Lecture :

- Apparition d'une tache violette → le PDA a été oxydé → la bactérie possède l'oxydase, elle est dite Oxydase (+) **(Fig. IV-5)**,
- Pas apparition d'une tache violette → le PDA n'a pas été oxydé → La bactérie ne possède pas l'oxydase, elle est dite Oxydase (-).



Figure IV-5 : Bactérie oxydase +

3/Recherche des décarboxylases *(Atlan. D et al, 2000)* :

But : Ce test permet de révéler les décarboxylases impliquées dans le métabolisme des protéines et principalement celles liées aux acides aminés étudiés : LDC, ODC, ADH. C'est un test utilisé dans le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles et genres suivants:

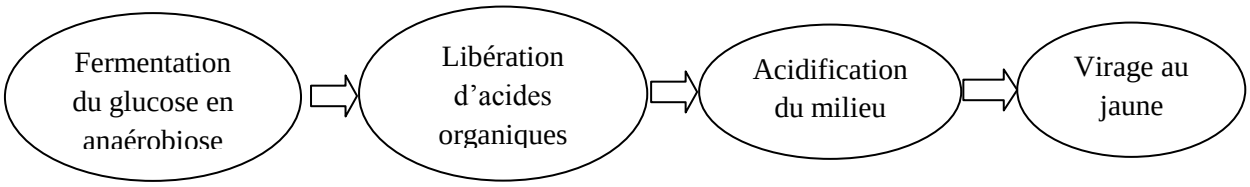
-*Enterobacteriaceae*

-*Vibrionaceae*

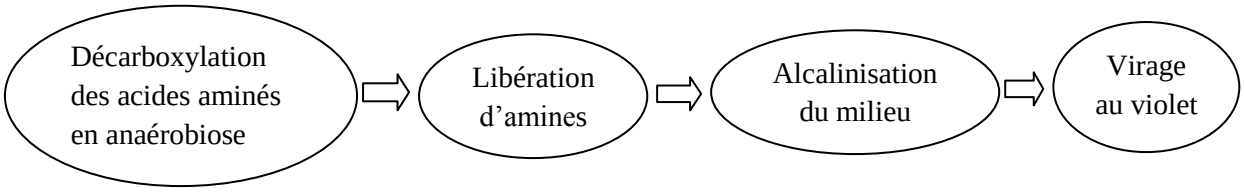
-*Pseudomonas et genres associés*

Principe :

Dans un premier temps les bactéries en anaérobiose*, fermentent le glucose et donc les milieux s'acidifient (virage du violet au jaune de l'indicateur de pH).



Dans un deuxième temps, les bactéries ayant épuisées le glucose peuvent utiliser l'acide aminé présent dans le milieu si elles possèdent les enzymes adéquats. En anaérobiose et en milieu acide c'est la décarboxylation des acides aminés par les décarboxylases qui est favorisée. L'amine produite re-alcalinise le milieu ce qui a pour effet le virage au violet.



Technique :

- Prépare une suspension (assez épaisse) à partir d'une culture de la souche à étudier.
- Ensemencer, chacun des tubes suivants, avec 2 ou 3 gouttes de cette suspension :

  Tube (1): Glucose sans acide aminé (Témoin),

  Tube (2): Glucose + Arginine,

  Tube (3): Glucose + Ornithine,

  Tube (4): Glucose + Lysine.
- Recouvrir chaque tube avec 1 ml d'huile de vaseline.
- Incuber 18h à 24 h à 37°C, bouchon vissé pour éviter l'aération du milieu.

Lecture :

Témoin: Le virage du milieu au jaune révèle l'acidité du milieu donc la bactérie a fermenté le glucose.

Tube (1), (2), (3):

- Si le milieu est jaune indique que le pH du milieu est acide, donc il n'y a pas eu une re-alcalinisation du milieu après dégradation du glucose. La bactérie n'a donc dégradé ni l'Arginine, ni l'Ornithine, ni la Lysine. Elle est dite " **ADH - (Arginine Di Hydrolase -**), **ODC – (Ornithine Décarboxylase**-), **LDC – (Lysine Décarboxylase -**).
- Si le milieu est violet, ceci indique que le pH du milieu est basique, donc il y a eu une re-alcalinisation du milieu après dégradation du glucose. La bactérie a dégradé l'Arginine, l'Ornithine et la Lysine avec ses décarboxylases. Elle est dite **ADH +, ODC +, LDC +**.

4/Recherche d'une Tryptophane désaminase *(Atlas .R.M, 2005)*:

But : C'est un test très important pour le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles suivantes :

- *Enterobacteriaceae,*
- *Pseudomonadaceae* etc...

Principe: Sous l'action de cette enzyme, le tryptophane est dégradé selon la réaction :

Tryptophane désaminase

L-tryptophane → acide indole-pyruvique + NH_3

Apres addition de chlorure de fer III (perchlorure de fer), ce dernier réagit avec l'acide indole-pyruvique en donnant un précipité de couleur marron.

Technique :

- Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane (appelé aussi urée-indole),
- Incuber 2h à 24h,
- Ajouter deux gouttes de perchlorure de fer.

Lecture : La lecture est immédiate.

- Obtention d'un précipité brun foncé : **TDA +**
- Absence du précipité : **TDA -**.

5/Recherche de tryptophanase *(Avallone. S, 2002)*.

Principe: Certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase selon la réaction:

Tryptophanase

Tryptophane → Indole + acide pyruvique + NH_3

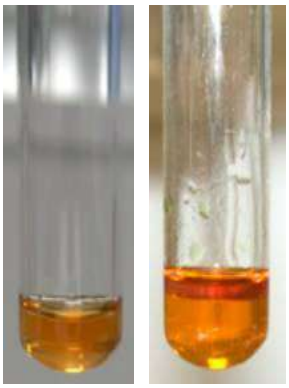
L'addition de réactif de Kovacs se traduit par l'apparition d'un anneau rouge.

Technique :

- Réaliser une suspension bactérienne dans le milieu urée indole et incuber à 37°C.
- La lecture peut être réalisée jusqu'à 24H (une suspension dense permet une lecture rapide <3H). Ajouter le réactif de Kovacs (jaune) et observer.

Lecture :

- Formation d'un anneau rouge : **indole +**
- Absence de coloration rouge : **indole –**

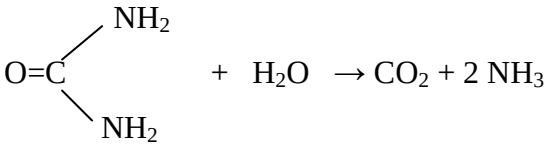


Indole- Indole+

Figure IV-6: Résultats du test de Tryptophanase.

6/Recherche de l'uréase (Guiraud. J.P et al, 2000)

Principe: Les bactéries qui possèdent une Uréase active réaliseront la réaction suivante.



Le CO_2 et le NH_3 se combinent ensuite pour donner du carbonate d'ammonium selon la réaction :

$$CO_2 + 2NH_3 + H_2O \rightarrow CO_3(NH_4)_2$$

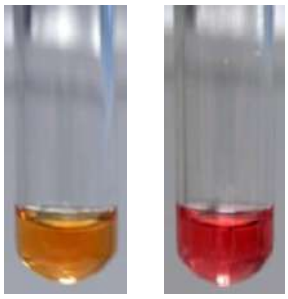
Sous l'action d'une Uréase il y a donc alcalinisation du milieu et virage de l'indicateur coloré.

Technique :

- Réaliser à partir d'une culture sur gélose nutritive, une suspension aussi dense que possible des bactéries à étudier dans 0.5 ml de milieu urée-indole.
- Incuber à l'étuve ou de préférence au bain marie à 37°C.

Lecture (Fig. IV-7):

- La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium: Uréase+
- Si la couleur du milieu persiste orange, nous pouvons dire que notre souche est Uréase –



Uréase - Uréase +

Figure IV-7: Résultat du test Uréase.

7/Recherche de L'ONPG hydrolase (β galactosidase) (*Guiraud. J.P et al, 2000)* :

But: Ce test permet de rechercher la présence d'une enzyme intracellulaire β-galactosidase (ONPG hydrolase) qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Principe: Cette enzyme peut-être mise en évidence facilement car elle est capable d'hydrolyser toute molécule analogue du lactose comme l'ONPG (**O**rtho **N**itro **P**hényl **G**alactopyranoside) qui est scindé en **O**rtho **N**itro **P**hénol, composé jaune.

Technique :

- Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau physiologique.
- Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.
- Incuber à l'étuve 30 min à 37°C.
- Observer la couleur du milieu après incubation.

Lecture :

- Milieu jaune : ONPG (+), Milieu sans couleur : ONPG (–).



ONPG- ONPG+

Figure IV-8: Résultat du test ONPG.

8/L'assimilation du citrate comme seule source de carbone *(Avallone. S, 2002)* :

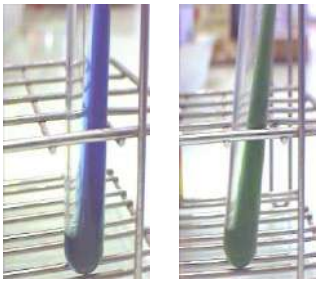
But : Ce test permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

Principe: Les bactéries capables d'utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone pourront se développer sur ce milieu. La fermentation du citrate de sodium entraîne alors une acidification qui provoque une coloration bleue du milieu en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH).

Technique: Le milieu de citrate de Simmons doit être ensemencé à partir d'une culture pure et fraîche de bactéries prélevée sur milieu gélosé,

- Ensemencer en stries la surface inclinée.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h.

Lecture (Fig. IV-9): Les bactéries « Citrate Positive » bleuissent ce milieu en donnant une culture souvent abondante. La présence de colonies sur la pente du milieu citrate de Simmons est la preuve d'un développement bactérien et l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Les bactéries « citrate négative » ne donnent ni culture, ni bleuissement du milieu. Le milieu reste de couleur verte.



Citrate+ Citrate -

Figure IV-9: Résultat de test Citrate.

9/ Etude du pouvoir glucidolytique : Assimilation du Glucose, Saccharose et Lactose *(Atlas. R.M, 2005)*:

Principe: Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH). Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la concentration de ce sucre a été abaissée au 1/10ème de celle du lactose ou du saccharose, de telle façon que la faible quantité d'acide produite sur la pente pendant la fermentation s'oxyde rapidement, ce qui entraîne un retour rapide à la coloration rouge. Par contre, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube. Les germes qui dégradent le lactose ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube car leurs concentrations sont 10 fois plus importantes que celle du glucose. Les microorganismes qui ne fermentant pas le glucose ou ne dégradent pas le lactose et le saccharose ne modifient pas la couleur du milieu.

La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

Technique :

- A partir d'une colonie à étudier, ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées. Il est nécessaire d'utiliser des cultures pures prélevées au centre de colonies bien isolées, sinon les réactions croisées rendent l'identification impossible à réaliser.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures de manière à favoriser les dégagements gazeux.

Lecture: L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire. Il faut aussi chercher les poches de gaz. La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux:

(1) Fermentation de glucose

- Culot rouge : glucose non fermenté,
- Culot jaune : glucose fermenté.

(2) Dégradation du lactose et/ou du saccharose

- Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non dégradé (s),
- Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose dégradé (s).

(3) Production de gaz : apparition de gaz dans le culot.

(4) Formation d'H2S : Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

10/Assimilation des autres glucides :

Elle se base sur le même principe qui est le virage de l'indicateur coloré après la dégradation du sucre testé utilisé comme seule source de carbone et d'énergie.

11/Assimilation du mannitol *(Nehme. N et al, 2008)* :

Principe :

L'utilisation du mannitol se traduira par une acidification qui sera mise en évidence par le virage d'un indicateur coloré (le rouge de phénol) :

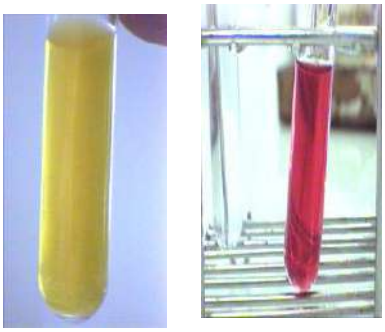
*Milieu jaune → acidification du milieu → utilisation du mannitol comme source de carbone et d'énergie → Mannitol(+)

*Milieu rouge → pas d'acidification du milieu → pas d'utilisation du mannitol comme source de carbone et d'énergie →Mannitol (-). Dans ces conditions il faut vérifier que la bactérie a bien été ensemencée et vérifier son type respiratoire.

Technique: A partir d'une colonie donnée, ensemencer le milieu Mannitol-Mobilité par piqûre centrale.

Lecture (Fig. IV-10) :

- Milieu jaune : souche dite **mannitol (+)**,
- Milieu rouge : souche dite **mannitol (-)**.



Mannitol+ Mannitol –

Figure IV-10: Résultat du test Mannitol.

12/ Les types fermentaire: Exemple test RM ou VP *(Nehme. N et al, 2008)*:

But : Lorsque plusieurs espèces bactériennes différentes dégradent le glucose par voie fermentative, les produits de dégradation obtenus peuvent être différents, puisqu'il existe plusieurs voies fermentaires. Ce test permet une différenciation entre les fermentations « acide-mixte » et « 2, 3 butane-diol ».

Principe :

- Mise en évidence de la voie des acides-mixtes : Elle consiste à mettre en évidence une acidification très importante du milieu après fermentation du glucose. L'indicateur de pH utilisé est le Rouge de Méthyle (RM) qui est rouge à un pH inférieur à 5 et jaune à un pH supérieur à 5,8. Le pH est bas parce qu'il y a une production importante d'acide comme l'acide formique, lactique, pyruvique etc...

Milieu acide (pH < 5) **RM (rouge)** Voie des acides mixtes (+)

Milieu acide (pH > 5) **RM (jaune)** Voie des acides mixtes (-)

- Mise en évidence de la voie butane diol (Recherche de l'acétoïne = Hydroxy-3-butanone):

La recherche de l'acétoïne ou réaction de Voges-Proskauer (VP) permet de mettre en évidence une autre voie fermentative. Certaines bactéries sont capables de produire de l'acétylméthylcarbinol (=AMC ou encore acétoïne) et on peut mettre en évidence cette production à l'aide de la réaction colorée suivante:

Hydroxy-3-butanone + α-naphtol (+ NaOH) → Butane dione (rouge).

Technique:

- Ensemencer 5 ml du milieu Clark et Lubs avec le germe à étudier.
- Incuber à 37°C pendant 24h à 48h.

Lecture :

Il vous faut dans un premier temps diviser en deux le contenu du milieu Clark-Lubs.

Pour le test RM:

- Ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle

  *Réaction RM+: la coloration est rouge,

  *Réaction RM-: la coloration est jaune.

Pour le test VP :

- Dans l'ordre 2 gouttes de soude NaOH (VP1), 2 gouttes d'alpha-naphtol (VP2),
- Agiter puis laisser 15 min :

*Réaction VP+: Coloration rouge,

*Réaction VP-: Coloration des réactifs + le milieu.

13/ Identification des Enterobacteriaceae en minigalerie (Api 20) *(Houssine. C, 2011)* :

Principe :

C'est une galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des ***Enterobacteriaceae***.

Les galeries Api utilisent plusieurs types de tests. Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. Ils sont remplis d'une suspension bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie). Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit aussi être remplie de manière à créer un ménisque. Pour les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine soit pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), soit pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH.

Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support et le couvercle par dessus. L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24 à 48h.

Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les micro-tubes de la galerie à l'aide de la même pipette:

*Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir le tube et la coupure,

*Pour les autres tubes, remplir uniquement les tubes

*Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H2S, UREE, créer une anaérobiose en remplissant leur coupure par de l'huile de paraffine.

- Incuber à 37°C pendant 18h à 24h.

Lecture de la galerie :

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de Lecture ***(annexes 1,2 et 4).***

- Noter toutes les réactions spontanées et révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

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

*Test IND: ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une coloration rose ou rouge indique une

réaction positive

*Test VP: ajouter 1 goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre 15 min. une coloration rose ou rouge indique une réaction positive.

IV.2.2. Etude du miel :

IV.2.2.1. Caractérisation physicochimique:

a/ La densité : la densité d'un liquide et le rapport de sa masse volumique à la masse volumique de l'eau

$$\mathbf{d}_{miel} = \rho_{miel} / \rho_{eau}$$

Où

- d: la densité,
- ρ_{miel} : la masse volumique du miel en g/cm^3 : $\rho_{miel} = m_{miel} / V_{miel}$
- ρ_{eau} : la masse volumique de l'eau en g/cm^3 : $\rho_{eau} = m_{eau} / V_{eau}$
- m: la masse en g,
- V : le volume en cm^3

Technique: 5ml de miel (à 40°C) est pesé à l'aide d'une balance analytique, la masse volumique et la densité sont ensuite calculées.

b/ Le pH :

Le potentiel d'hydrogène (ou pH) mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+). Pour le miel, c'est un indice de la « réactivation acide » du produit. Le miel est mis en solution à 10% dans l'eau distillée. Il suffit de plonger la pointe de l'électrode dans le liquide, la valeur du pH s'affiche au potentiomètre au centième d'unité. Le pH mètre doit être étalonné avant son utilisation à l'aide des solutions tampons.

c/ Mesure de la teneur en eau :

La teneur en eau se fait au moyen d'un réfractomètre **(Fig. IV-11)**. Le miel à analyser doit être parfaitement liquide. La goutte de miel est déposée puis répartie en couche mince sur la platine du prisme d'un réfractomètre (nettoyé par du méthanol ou de l'éthanol et séché). La lecture est faite à travers l'oculaire au niveau de la ligne horizontale de partage entre une zone claire et une zone obscure. Cette ligne coupe une échelle verticale graduée directement en pourcentage d'humidité dans le miel. La température du prisme est notée. En se rapportant au tableau de ***(Bogdanov. S. et al, 1997)*** **(annexe 3)**, nous obtenons le pourcentage d'eau correspondant à l'indice de réfraction.



Figure IV-11 : Refractomètre.

d/ Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bertrand :

En milieu alcalin (basique), à chaud, les sucres réducteurs réduisent le sulfate du cuivre II (bleu) en oxyde de cuivre II (rouge) selon l'équation générale :

$$RCHO + 2CuO + HOK \rightarrow RCOOK + \underline{Cu_2O} + H_2O$$

Précipité rouge brique

Mode opératoire:

1/Réduction de la liqueur de Fehling:

- Peser une masse de miel à l'aide d'une balance analytique,
- Pour chaque type de miel mettre dans un ballon :
  *80 ml de la liqueur de Fehling
  *L'échantillon de miel pesé
  *20 ml d'eau distillée
- Agiter le mélange jusqu'à la dissolution du miel,
- Dans un chauffe-ballon, porter le mélange à l'ébullition pendant exactement trois minutes.

2/ Isolement du cuivre formé :

- Refroidir, transvaser le mélange dans un erlenmeyer et laisser décanter le précipité,
- Enlever le surnagent en entraînant le moins possible le précipité,
- Faire des lavages du précipité à l'eau distillée bouillante jusqu'à ce que le surnagent bleu devient clair. Le précipité ne doit pas être en contact avec l'air (risque du ré oxydation de Cu_2O),
- 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 0.1 M,
- Titrer avec une solution de permanganate de potassium 0.1 M jusqu'à l'obtention d'une coloration rose pale stable 10 à 20 seconde et noter le volume de $KMnO_4$ correspondant.

IV.2.2.2. Etudes de l'activité antibactérienne du miel:

Dans cette partie, nous avons ciblé :

- ✓ Etude de l'influence de la température sur l'activité antibactérienne du miel de Multi fleurs et de Harmel contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Etude de l'influence du pH sur l'activité antibactérienne de chaque type des miels précédents contre chacune des deux souches bactériennes choisies.
- ✓ La détermination de la CMI pour chaque type de miel contre chaque souche bactérienne (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en utilisant la méthode de diffusion sur gélose.

a/ Etude de l'influence de la température :

Technique :

- Pour chaque type de miel, remplir 5 tubes à essai par 3 ml de miel,
- Chaque tube à essai est utilisé pour un seul traitement à une température donnée: 40°C, 55°C, 70°C, 85°C, 95°C
- A chaque température donnée, régler le bain marie et attendre sa stabilisation, ensuite y mettre le tube correspondant à cette température de façon que le niveau d'eau soit supérieur au niveau du miel pendant 15 min,
- Ajouter à chaque tube 1 ml d'eau distillée stérile et bien homogénéiser les dilutions obtenues (75%),
- Réaliser un ensemencement en nappe de la souche de *Staphylococcus aureus* et d' *Escherichia coli* sur le milieu Muller-Hinton,
- Placer les disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'un miel dilué à 75% et traité à une température donnée,
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

b/Etude de l'influence de pH :

Technique :

- Préparer dans chaque tube à essai une dilution du miel à 75% (v/v) avec de l'eau distillée stérile.
- Mesurer le pH de la dilution en utilisant le pH mètre,
- Ajuster le pH de chaque dilution à une valeur donnée en utilisant du HCl ou du NaOH dilués de façon à ne pas affecter le volume totale de la dilution,
- Réaliser un ensemencement en nappe de la souche de *Staphylococcus aureus* et d' *Escherichia coli* sur le milieu Muller-Hinton,
- Placer les disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'un miel dilué et dont le pH est ajusté à une valeur donnée,
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

Remarque : Les deux types de miels sont testés avec la même suspension bactérienne

c/ Détermination de CMI:

1/Préparation des dilutions des miels :

Pour entamer l'étude de l'effet antimicrobien du miel, nous avons préparé plusieurs dilutions pour chaque variété de miel. Les dilutions sont 75%(3/4), 50%(1/2), 33.33%(1/3), 25%(1/4), 16.67%(1/6).

2/ Méthode de diffusion sur gélose :

C'est une méthode qualitative permettant de tester l'existence de l'activité antimicrobienne, qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque contenant la substance à tester.

Mode opératoire :

- Préparation de la suspension : Prélever à l'aide d'une pipette pasteur 3 colonies pures et bien isolées et les décharger dans un tube contenant 3ml d'eau physiologique stérile,
- Ensemencement des boites : ensemencer une boite de pétri stérile coulée précédemment par le milieu Muller-Hinton en utilisant un écouvillon trompé dans la suspension de la souche à tester, de façon à couvrir toute la surface,
- Application des disques : à l'aide d'une pince stérile, placer cinq disques en papier de 9mm de diamètre sur chaque milieu précédemment ensemencé en nappe,

- Dépôt du miel dilué : à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile, déposer 50µl d'une dilution de miel sur un disque. Chaque disque porte une dilution,
- Incubation : les boites sont incubées 18h à 24h à 37°C,
- Lecture : elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle à l'extérieur de la boite.

IV.2.3. Etude des plantes :

IV.2.3.1. Préparation de l'extrait:

Trois méthodes d'extraction simples ont été retenues pour tester l'effet antimicrobien des plantes (Marrube et Oléandre) afin de sélectionner la meilleure méthode (infusion, décoction et macération).

a/Extraction par infusion :

- Peser 4g de plante,
- Faire bouillir 40 ml d'eau distillée,
- Verser l'eau bouillante sur la plante et laisser infuser pendant 10 minutes,
- Filtrer à l'aide d'un papier filtre, transférez dans un tube en verre et étiqueter.

b/Extraction par décoction :

- Dans un ballon mettre 4g de plante avec 40 ml d'eau distillée et laisser bouillir dans un chauffe ballon pendant 10 minutes,
- Filtrer à l'aide d'un papier filtre, transférez dans un tube en verre et étiqueter.



Figure. IV-12 : Décoction dans un chauffe-ballon

c/ Macération à chaud :

- Mélanger 4g de plante avec 40ml d'eau distillée dans un erlenmeyer et mettre au bain marie à 100°C,

- Porter l'eau à l'ébullition et laisser macérer 2 heures,
- Filtrer à l'aide de papier filtre, transférer dans un tube en verre et étiqueter.



Figure IV-13 : Macération dans un bain marie.

IV.2.3.2. Effet antibactérien des extraits: Optimisation de la méthode d'extraction et du genre botanique :

L'étude de l'effet antibactérien résultant des extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction des deux plantes « fraiches » a été réalisée. Dans cette partie, nous visant le choix de la méthode d'extraction optimale ainsi que le choix du genre donnant un extrait à effet antibactérien le plus élevé.

Mode opératoire :

1/Préparation de la suspension: Prélever à l'aide d'une pipette pasteur 3 colonies pures et bien isolées et les décharger dans un tube contenant 3 ml d'eau physiologie stérile,

2/Ensemencement des boites : Prendre une boites de pétrie stérile coulée précédemment par le milieu Muller – Hinton et ensemencer par un écouvillon trompé dans la suspension de la souche à tester, de façon à couvrir toute la surface,

3/Application des disques: A l'aide d'une pipette stérile, placer 3 disques en papier de 9mm de diamètre sur le milieu précédemment ensemencé en nappe.

4/Dépôt de l'extrait : A l'aide d'une micropipette réglée à 50µl et munie d'un embout stérile, déposer 50µl de chaque extrait de plante sur un disque. Pour cela quatre boites de pétri ont été envisagées, chaque deux boite correspond à une plante et portent chacune 3 disques correspondant aux méthodes d'extraction,

5/Incubation: Les boites sont incubées 18h à 24h à 37°C,

6/Lecture: La lecture consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle à l'extérieure de la boite.

IV.2.3.3. Choix de la nature de plante:

Dans cette étape, nous avons ciblé l'optimisation de l'état de la plante choisie précédemment (sèche ou fraiche), et ce en comparant leurs effets antibactériens correspondants en utilisant la méthode d'extraction optimisée dans les mêmes conditions.

a/ Mesure la teneur en eau:

Le taux d'humidité ou la teneur en eau est calculé ainsi:

$$T\% = (x-y)/x * 100$$

Tel que :

T% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage (%),

x : Masse initiale de l'échantillon,

y : Masse finale de l'échantillon après déshydratation à une température de 110°C jusqu'à masse constante.

b/ Etude de l'effet antibactérien des échantillon secs et frais :

- Réaliser une extraction par macération en chaud de la plante fraiche et sèche avec la même masse de la matière végétale pure (4g) (En éliminant la teneur d'eau) et avec le même volume d'eau (40ml),
- Réaliser un ensemencement en nappe de *Staphylococcus aureus* et *d'Escherichia coli* sur Muller-Hinton,
- Placer deux disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'un extrait,
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV-2-3-4 Optimisation du rapport Masse/Volume :

Le rapport masse de la matière végétale sur le volume d'eau distillée ayant servis à l'extraction a été optimisé. Pour cela, nous avons préparé par macération à chaud des extraits de plantes sélectionnées à différentes teneures en matière végétale : 1g/100ml, 2g/100ml, 4g/100ml, 6g/100ml, 8g/100ml, 10g/100ml, 15g/100ml, 20g/100ml, 24g/100ml, 28g/100ml , 30g/100ml, 36g/100ml.

- Réaliser un ensemencement en nappe pour les deux souches bactérienne sur Muller-Hinton,
- Placer les disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'extrait préparé à une teneure donnée,

- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.5. Influence du pH sur l'effet antibactérien de l'extrait:

Technique :

- Préparer des extraits de plantes par macération à chaud (chaque plante avec la teneure optimisée précédemment). Mesurer le pH résultant en utilisant le pH mètre,
- Répartir l'extrait en plusieurs échantillons
- Ajuster le pH de chaque échantillon à une valeur donnée par des solutions diluées de HCl ou NaOH sans affecter le volume,
- Réaliser un ensemencement en nappe des deux souches bactérienne sur Muller-Hinton,
- Placer les disques en papier sur le milieu ensemencé et déposer sur chacun d'eux 50µl d'extrait à un pH donné,
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.6. Détermination de CMI de l'extrait :

Dans cette partie la concentration minimale inhibitrice de notre extrait optimisé a été estimée. Pour cela, nous avons suivi le protocole suivant :

- Préparer des dilutions de l'extrait : 100%, 75% (3/4), 50% (1/2), 33.33% (1/3), 25% (1/4),
- Réaliser un ensemencement en nappe des deux souches bactériennes sur Muller-Hinton,
- Placer 5 disques en papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'une dilution donnée,
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.4. Etude de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extrait de plantes:

Cette partie cible la mise en évidence de l'effet synergique des composants d'une association Miel-Extrait de plante. Pour cela, nous avons préparé plusieurs dilutions des deux miels étudiés dans les extraits des plantes sélectionnées préparés dans les conditions optimisées : 75% (3/4), 66.66% (2/3), 50M (1/2), 33.33% (1/3), 25% (1/4).

- Réaliser un ensemencement en nappe des deux souches bactériennes sur Muller-Hinton,
- Placer 5 disques en papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'une dilution donnée,
- Incuber à l'étuve à 37 °C pendant 18h à 24h,
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

Références bibliographiques

- **Abdelghafour Marfak, 2003**, Radiolyse gamma des flavonokles, etude de leur reactivite avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides,. (These de Doctorat), l'Universite de Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Sante, Faculte de Pharmacie.
- **Afssa G (2006) (**Association Française de Sécurité Sanitaire des Aliments)**,**. Hy giène domestique. CHU Bordeaux, (France).
- **Andrews J.M. 2001,**Determination of minimum inhibitory concentrations**.** ***J Antimicrob Chemother,*** , **48**: 5-16.
- **Arvanitoyannis IS., Chalhoub C., *et al*. 2005**.; *Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity*, Crit Rev Food Sci Nutr,
- **Assie B., Descottes B. 2004.** (dir.). *Le miel comme agent cicatrisant*. 115 p. Thèse d'exercice : Médecine. Toulouse : Toulouse III **:**
- **Atlan, D., Aubel, D. et Gilbert, C. *(*2000).** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases. *Science des aliments*,
- **Atlas, R.M. (2005**). Handbook of microbiological media for the examination of food. (University of Louis Ville). CRC press USA
- **Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., Olguin, E. and Guiraud, J.P.(2002).** Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*,
- **Avril J.L. (2000).** Bactériologie clinique. 3ème Edition.
- **Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B. et Odugbemi T. O. 2008**. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* oliv (Guttiferae). *International journal of health research*., **1** (2) : 81-93.
- **Baba Aissa Farid, 2001.** Les plantes médicinales d'Algérie, ED Edman p 93.
- **Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. 2006**. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, singlegene knockout mutants : the Keio collection. *Mol Syst Biol*, **2**, 2006 0008.

- **Badawy O., Shasii S., Tharwat E. et Kamal M.** (**2004**).; Antibacterial actïvity of bee honey and its therapeutic usefulness against Escherichia coli 157:H7 and Salmonella typhimurium infection.Rcv.sci.tech.off.int.epiz. **23** (3), 1011-1022 page 1018
- **Baltrusaityte V., Venskutonis P. et Ceksteryte V.** (**2007**).; Antibacterial Activity of honcy and beebread of different origin against S. aureus and D. epidermidis. Food technology, Lithuania. **45** (2) 201-208
- **Barceloux DG**. Medical Toxicology of Natural Substances. **John Wiley and Sons; 2008.**
- **Bardeau, F. 2003**. La pharmacie du Bon Dieu, Paris, *Edition Stock*, Vol.02, 334p.
- **Belmekki N. ; 2009**.Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de Saccocalyx satureio des, Salvia verbenaca et Teucrium polium de la région Ouest d'Algérie. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie. Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers.
- **Berche P. (2003)**. Bactériologie générale. PCE M 2. Faculté de médecine Necker-E nfants malades (France). pp 89.
- **Bogdanov .S et Blumer. P, 2001,** « Propreités antibiotiques naturelles du miel » RSA. 98 :107-114
- **Bonté F., Rossant A., Archambault J.-C. [*et al.*] 2011**. *Miels et plantes : de la thérapeutique à la cosmétique*. La Phytothérapie Européenne, , n° 63, p. 22-28.
- **Bruneau E**. **2002 ;** Les produits de la ruche. *In Le traité rustica de l'apiculture*. Paris, Rustica, , p. 354-384.
- **Bruneau E. 2009 ;** Les produits de la ruche. *In Le traité rustica de l'apiculture*. Paris, Rustica, , p. 354-387.
- **Bruneton J**. ; **2005**. Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l 'Homme et les animaux. 3 éd.Paris Cachan: Éditions Tec & Doc ; Éditions médicales internationales
- **Caillas A**. (**2004**).; Le rucher de rapport, Les produits de la ruche, Traité pratique d'apiculture moderne, Edition .syndicat national d'apiculture, Paris, p.497
- **carlisle617** ;Photo prise le : 19 mai 2008. Plaka, Peloponnisos, Grèce Nikon D40
- **Chacou M.et Bassou K., 2007**.Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha SpicataL*isdue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogenes: *E.coli,Pseudomonasaeroginosa,*

Staphylococcus aureus, Bacillus subtiluis et *Candida albicans*.Mémoire de DES microbiologie. Universitéde Kasdi Merbah Ouargla,

- **Clement H. 2006 ;** (dir.). *Le Traité Rustica de l'Apiculture*, 2° Edition, Paris, Editions Rustica, , 528p.
- **Dandiya P.-C., Dobrowolski J.-W., Naqui S.-A.-H., Sharma K.,Shaukat A.S., Vohora S.B**. **2001 ;** *Antibacterial, antifungal, antiamoebic,antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products*, Journal og Ethnopharmacology 35, Elsevier Scientific Publishers, Ireland,.
- **De Jesus RA, Cechinel-Filho V, Oliveira AE, Schlemper V**. **2000 ;**Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from Marrubium vulgare. Phytomedicine. Apr
- **Delarras C. (2007),** Microbiologie Pratique pour le laboratoire d' analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- **Denis Richard. Delachaux et Niestlé 2008.**Poisons et venins dans la nature**,**
- ***Descottes B***. ***, 2009*** .Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 ans. *Phytothérapie*, , vol. 7, n°2, p. 112-116.
- **Descottes.B 2004.** Le miel comme agent cicatrisant, thèse de doctorat en médecine, université de Toulouse III-Paul SABATIER, Limoges. France
- **Dinesh Valke** ; **2006** Photo prise le : 24 décembre .Thane, Maharashtra, Inde ,Sony EricssonK750i
- **Donadieu Y. 2008** *Le miel thérapeutique naturelle*, 2° Edition, Paris, Maloine edit., , 36p.
- **Dr Hakim H**. **2000** Les produits de la ruche contre le vieillissement. *Apithérapie : la science de l'abeille pour l'énergie et le bien-être*, , n°0704G79436, p. 44-45.
- **Dr Sable. S 1997** Propriétés, valeur nutritionnelle et diététique du miel, cas du miel de tournesol. *Apithérapie : la science de l'abeille pour l'énergie et le bien-être*, , n°57950, p. 25-32.
- **El Modafar c,Tantaoui A, El Boustani (2000).** Time course accumulation and Fungitoxicity of date palm phytoalexins towords Fusarium oxysporum f.so.albedinis cell wall-degading enzymes.j.Phytopthol., 148:405-411.
- **Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D**. **2007**. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

- **Encyclopédie des plantes médicinales**. Larousse**. 2007**
- ***Essawi. T et Srour.M , 2000 ;*** *Screenieng of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J, Ethnopharm. 70 :343-349*
- **Faseb J. 2010 ;** Communiqué Honey as an antibiotic : *Scientists identify a secret ingredient in honey that kills bacteria* [archive] et source : Paulus H. S. Kwakman, Anje A. te Velde, Leonie de Boer, Dave Speijer, Christina M. J. E. Vandenbroucke-Grauls &Sebastian A. J. Zaat. *How honey kills bacteria* . **FASEB J. 2010**
- **Frankel S., Robinson GE., Beranbaum MR**. **1998. ;** *Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys*, Journal of Apicultural Research,
- ***Goete P. 2009***. Le miel comme traitement local désinfectant et cicatrisant des plaies. *Phytothérapie,* , vol. 7, n°2, p. 91-93.
- **Gonnet .M (1982)** Le miel ; composition, propreités, conservation. INRA station expérimentale d'apicultures.20 : 1-18
- **Gout J**. : (**2003**). ; Le monde du miel et des abeilles, Paris, Edition Delachaux et Nïestlé.S.A. Lanssanne (Suitgerrland), A, p.58 **GOUT J. 2001** *Le miel et les hommes*, Thionville, Gerard Klopp, , 249p.
- **Guiraud, J.P. et GALZY, P. (2000).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Eds. Usine nouvelle Paris,
- **Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Hofle, J. Boenigk, and P. Stadtler. 2003.** *Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia*. Appl. Environ. Microbiol. 69:1442-1451
- **Hamdi Pacha, Y. ; Bekhiri, A. ; Benazzouz, M. ; Benhamza, L. ; Bensegni, L. 2002.** 1- Evaluation de l'activité cicatrisante suite à des brulures expérimentales de quelques plantes algériennes. *Rev. Méd. Pharm. Afr. Vol. 16-2002. 1-8.*
- **Hostettmann, K. 2007**. Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources de médicaments. Lausanne, *édition Favre S A*, vol. 01, 239p.
- **Huchet E., Coustel J. et Guinot L**. (**2006**).; Les constituants chimiques du miel, Méthodes d'analyses chimiques, département science de l'aliment, p.5
- **Iserin, P. 2001**. Encyclopédie des plantes médicinales. London, ☐ *ypogly Edith Ybert,*Tatiana Delasalle- Feat. Vol 01, 335p.
- **Ishige T, Honda K, Shimizu S**, , **2005** « Whole organism biocatalysis », dans *Curr Opin Chem Biol*, vol. 9, n^{o} 2, p. 174–80

- **Jean-Jacques Macheix Annie Fleuriet Christian Jay-Allemand, 2005**, les composes phenoliques des vegetaux, un exemple de metabolites secondaires d'importance economique, presses polytechniques et universitaires romandes, p 1, p 67, p viii, p 162.
- **Jean-Michel Millecamps** ; **2004** L'herbier de St Georges.. Editions La Tanière
- **Joly B. et Reynaud A. (2002).** Entérobactéries : Systématique et Méthode de diagnostic. Tec & Doc, Lavoisier.
- **Kenneth Todar ;2007** Textbook of Bacteriology : Flore bactérienne de l'Homme.
- **Kerkvliet JD**. (**2006**).; Screening method for the determination of peroxide accumulation in honey and relation with HMF content. J. Apicult Res, 35, 110-117
- **King L.-A., Popoff M.-R., Mazuet C. [*et al.*]** , **2010**. Le botulisme infantile en France. *Archives de pédiatrie*, vol. 17, n°9, p. 1288-1292.
- **Kwakman P. H. 2010**, Te VELDE A. A., De BOER L. [*et al.*]. How honey kills bacteria. *FASEB journal*, , vol. 24, n°7, p. 2576-2581.
- **Lamballais C**. (**2000**). ; Les aliments. Paris Edition. MALOINE, p.136
- **Larpent J.P. (2007).** Microbiologie Alimentaire, Techniques de laboratoire. Tec & Doc, Lavoisier, pp 1074.
- **Lecerf J.-M**. **2009** Effets métaboliques du fructose et du miel. *Phytothérapie*, , vol.7, n°2, p. 83-86.
- **Lefief-Delcourt 2010**A. *Le miel malin*. Paris, Leduc.s, , 176 p.
- **Levison M.E**. **2004** Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. *Infect Dis Clin North Am*, **, 18**: 451-465, vii.
- **Lobreau-Callen D., Clement M.-C., Marmion V**. **2000 ;** Les miels. *Techniques de l'ingénieur, traité Agroalimentaire*, , n° F 7000, p. 1-20.
- **Mack RB**. **2004**"To see a world in a grain of sand and a heaven in a wild flower"—oleander poisoning**. N C Med J.** Nov;45(11):729-730.
- **Madjid Mostefaoui, 2008** *Miel et cicatrisation*, Université d'Aix Marseille 2, (thèse)
- **Marie-Claude Paume. Edisud 2007,**2011Sauvages et médicinales : Plantes remèdes pour nos petits maux.
- **Marie-Claude Paume. Edisud 2009,**Sauvages et toxiques : Plantes des bois, des prés et des jardins.
- **Maryse Vero**, **2008***Étude de l'abeille domestique et de son miel : présentation des miels corses*, Université d'Aix-Marseille 2, (thèse)

- **Matuhe L 2001** (Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Urbanisme, de l'Habitat et de l'Environnement) /Département de l'Environnement,. Etude nationale sur la biodiversité. Rapport de synthèse
- **Merlin, C., McAteer, S., & Masters, M. 2002**. Tools for characterization of Escherichia coli genes of unknown function. *J Bacteriol*, **184**(16), 4573–81.
- **Metzler C.M., DeHaan R.M**. **2004,**Susceptibility Tests of Anaerobic Bacteria: Statistical and Clinical Considerations. *J Infect Dis, ,* **130**: 588-594.
- **Michel Botineau** Guide des plantes toxiques et allergènes.. Belin Litterature et Revues
- **Nasser S**. **2005.**, *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, Cours, 6e édition, Dunod,
- **Pankey G.Â A., Sabath L.Â D**. **2004** Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gramâ€•Positive Bacterial Infections. *Clin Infect Dis, ,* **38**: 864-870.
- **Penel N., Yazdanpanah Y**. **2009,**Vancomycin flush as antibiotic prophylaxis for early catheter-related infections: a cost-effectiveness analysis. *Support Care Cancer, ,* **17**: 285-293.
- **Pham-Delegue M.-H**. **1999** *Les abeilles*. Genève, Minerva, , 206 p.
- **Phillippe Jean Marie**. (**1999**). ; Le guide de l'apiculture. Ed Edisud la calade.13090 Aix en. Provence, pp.209-228
- **Pierre Lefrançois et Françoise Ruby**, **2007 ;** avec la collaboration de Jean-Yves Dionne, pharmacien.Mars
- **Pr Girault, 1997**. Effets du miel sur les métabolismes glucidiques et lipidiques. *Apithérapie : la science de l'abeille pour l'énergie et le bien-être*, , n°57950, p. 42-51.
- **Reyns T., De Boever S., Baert K., Croubels S., Schauvliege S., Gasthuys F., De Backer P. 2007 ;** Disposition and oral bioavailability of amoxicillin and clavulanic acid in pigs. *J Vet Pharmacol Ther, ,* **30**: 550-555.
- **RIZZO Catherine, 2010**.CONTRIBUTION A L'ETUDE PHARMACOLOGIQUE DU MARRUBE BLANC ET DE QUELQUES UNES DE SES PREPARATIONS
- **Rossant A., Desmouliere A**. **2011.** (dir.). *Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes*. 132 p. Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : Université de Limoges :

- **Roux D, Catier O**. **2007**. ; Botanique Pharmacognosie Phytothérapie. Editions Porphyre;
- **Safadi R, Levy I, Amitai Y, Caraco Y**. **. 2005** ; Beneficial Effect of Digoxin-Specific Fab Antibody Fragments in Oleander Intoxication. Arch Intern MedOct 23;155(19):2121-2125.
- **Site internet**

  Site 1 : http://www.arnobio2.com

  Site 10 : www.produitsapicoles23A.fr

  Site 11 :www.technobio.com

  Site 12 : *2002 WHO mortality data*. Consulté le 2007-01-20.

  Site 2 : http://www.memoireonline.com/10/11/4897/Determination-in-vitro--du-pouvoir-antibacterien-des-huiles-essentielles-deucalyptus-myrte-.html

  Site 3 : http://www.reliablecancertherapies.com/

  Site 4 : www.01santé.com

  Site 5 : www.apiculture-populaire.com

  Site 6: www.Beekeeping.com

  Site 7 :www.ecosociosystemes.fr

  Site 8 :www.infectionnosocomiales.dz

  Site 9 : www.legifrance.gouv.fr
- **Ticli, B. 2005**. L'herbier de santé. 2°édition, Paris, *édition VECCHI SAO*, 01.206 p.
- **Tosi.E ; Martinet.R, Ortege.M, Lucero. H, 2007** « Honey diastase activity modified by heating » 206 : 217-221
- **Verdrager, J. 2000**. Ces médicaments qui nous viennent des plantes. 2°édition, Paris, *édition Maloine S.A.*, vol.01, 233p.
- **Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al**. **2005 ;** The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis. Dec;5(12):751-62.

V. 1. Identification des souches bactériennes :

V.1.1. Etude macroscopique :

Les observations qui concernent l'aspect des colonies sur leurs milieux sélectifs sont représentées sur le **Tableau V-1**.

Tableau V-1 : Caractères macroscopiques des bactéries isolées sur leurs milieux sélectifs.

	Forme	**Dimension (mm)**	**Chromo-genèse**	**Opacité**	**Elévation**	**Aspect de la surface**
 ***S aureus*** **sur Chapman**	Circulaire à bord régulier	Punctiforme	Dorée	Opaque	Bombée	Lisse
 ***E coli*** **sur Hektoen**	Circulaire à bord régulier	2 à 3 mm	Jaune orangée	Opaque	Bombée	Lisse

V.1.2. Etude microscopique:

V.1.2.1. Observation à l'état frais :

***E coli* :** Bacilles aux extrémités arrondies (coccobacilles), regroupés deux par deux (diplo-bacilles) et parfois en amas. Mobilité +.

***S aureus*:** Cocci, ils appariassent le plus souvent en amas dit « grappes de raisin », immobile.

V.1.2.2. Observation après une double coloration: (Coloration de Gram) :

***E coli* :** Coloration rose → Gram négatif,

***S aureus* :** Coloration violette → Gram positif.

Le gram nous confirme une fois de plus les autres critères microscopiques ainsi que l'absence des spores. Il s'agit donc de souches non sporulantes.

V.1.3. Identification biochimiques :

V.1.3.1. E coli:

Les résultats obtenues pour l'identification biochimique d'***E coli*** par la galerie moderne ***API 20^{E}*** sont représentés sur le **Tableau V-2** et la **Figure V-1.**

Tableau V-2: Résultats d'identification biochimique d'*E coli* par *API 20^{E}*.

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP
+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
GEL	**GLU**	**MAN**	**INO**	**SOR**	**RHA**	**SAC**	**MEL**	**AMY**	**ARA**
-	+	+	-	+	+	-	+	-	+



Figure V-1 : Résultats de l'*API 20^{E}* d'*E coli*.

V.1.3.2. *S aureus* :

Les résultats obtenus pour la galerie classique sont représentés sur le **Tableau V-3**.

En comparant nos résultats avec les données théoriques sur ces espèces bactériennes **(Annexe 1)**, nous pouvons dire que l'ensemble des caractères biochimiques convergent vers les espèces: ***Staphylococcus aureus*** et ***Escherichia coli.*** L'identification des souches fournies est donc confirmée.

Tableau V-3 : Résultats de l'identification biochimique de *S aureus*

Test	Résultats	Test	Résultats
 **Catalase**	Présence de bulles Gazeuse: Cat+	**TDA**	Milieu rouge brun avec précipité : TDA +
 **Oxydase**	Pas de coloration noir : Oxy-	 **IND**	Formation d'un anneau rouge : Indole +
 **ONPG**	Milieu transparent ONPG-	**TSI**	Glu + (culot jaune). Lac et/ou Sac+ (pente jaune. Gaz- (Pas de poches de gaz). H2S- (Pas de noircissement du milieu)
ADH/LCD/ODC	Milieu jaune : Décarboxylase -	**Assimilation du mannitol**	Milieu jaune : Mannitol+
 **CIT**	Milieu vert sans croissance CIT-	 **VP**	Coloration du milieu+ réactifs: VP-
UREE	**Milieu rouge violacé: +**	 **RM**	**Teinte jaune: RM-**

V.2. Etude du miel :

V.2.1. Analyse physico-chimique:

V.2.1.1. La densité :

Le **Tableau V-4** résume les différentes données expérimentales qui ont permis de calculer la densité des deux miels. Nous remarquons que la densité des miels de Multi fleurs et de Harmel est 1.49 et 1.31 respectivement.

Tableau V-4 : Valeurs de la densité des échantillons de miel

Echantillon	m(g)	v (ml)	ρ (g/ml)	d
Eau distillé	2.95	3	0.98	1
Miel de Multi-fleurs	4.40	3	1.46	1.49
Miel de Harmel	3.88	3	1.29	1.31

Nous pouvons donc dire que presque tous les échantillons de miel répondent aux normes. D'après ***Gonnet. M, 2002***, le miel est donc un produit relativement dense. Les variations de la densité proviennent surtout des variations de la teneur en eau. Plus un miel est riche en eau et moins il est dense. On peut pratiquement se servir de la densité comme moyen de connaitre la teneur en eau d'un miel ***(Louveaux. L, 1985)***.

V.2.1.2. Le pH :

Les résultats issus de cette analyse nous donnent une indication sur la nature acide des miels analysés. Les valeurs de pH sont présentées sur le **Tableau V-5.**

Tableau V-5 : pH des miels.

Miel	pH	T (°C)
Miel de Multi-fleurs	**4.80**	**19**
Miel de Harmel	**4.19**	**20**

Comme le montre le **Tableau V-5,** le pH de nos miels est inclus dans la norme décrite par ***Bogdanov .S et al, 2004.*** Sa valeur varie en général entre 3.5 et 5.5; elle est due à la présence des acides organiques. D'autre part, on note que les deux variétés de miel ont un pH acide et que le miel de Harmel est le plus acide (pH=4.19).

Le pH acide du miel est un facteur antibactérien pour les bactéries qui ne tolèrent pas des pH acides, donc le miel de Harmel pourrait avoir une activité antibactérienne plus prononcée que celle du miel de Multi-fleurs.

Le pH d'un miel est en fonction de la quantité d'acide ionisable qu'il renferme (ions H+) ainsi que de sa composition minérale. Plus le taux de la matière minérale est fort, et plus le pH de miel se rapproche de la neutralité ***(Gonnet. M, 2002)***. Le miel de Multi-fleurs (pH=4.80) pourrait avoir plus de la matière minérale que de miel Harmel (pH= 4.19).

V.2.1.3. La teneur en eau:

L'indice de réfraction et la teneur en eau selon ***(Bogdanov. S et al, 1997, Annexe 3*)** des échantillons sont répertoriés dans **le Tableau V-6**.

Tableau V-6: Pourcentages d'eau dans les deux types de miels.

Miel	**Indice de réfraction**	**Pourcentage d'eau**
Miel de Multi-fleurs	1.494	17.0
Miel de Harmel	1.490	18.6

Les deux types de miel présentent des teneurs en eau voisines. A partir du **Tableau V-6,** Rappelons que d'après sa définition légale, le miel ne doit pas dépasser 20% d'humidité ***(Décret n°2003-587 du 30 juin 2003)***. Au dessus de ce seuil, le miel risque de fermenter rapidement ou de mal cristalliser.

Nous déduisons que les résultats sont en accord avec les normes décrites par ***Jean-prost. P, 2009*** pour l'indice de réfraction (qui varie entre 1.47 à 1.50). De plus, l'indice de réfraction nous renseigne sur la composition chimique du miel, plus l'indice de réfraction est fort, plus le miel est riche en matières sèches ***(Jean-prost. P, 2009)***.

V.2.1.4. Dosage des sucres réducteurs :

Il faut noter que les sucres réducteurs représentent la catégorie la plus dominante dans la composition des hydrates de carbones du miel. Leurs dosages nous donnent une appréciation de l'osmolarité des différents miels. Les résultats du dosage des sucres réducteurs sont indiqués sur le **Tableau V-7**.

Tableau V-7: Quantité des sucres réducteurs dans les miels

Miel	V_{KMnO4} (ml)	N_{RCHO} (mole/g de miel
Miel de multi-fleurs	**12.8**	**$5.9*10^{-3}$**
Miel de Harmel	**15.1**	**$8.2*10^{-3}$**

Selon ces résultats, le miel de Harmel est le plus concentré en sucres réducteurs que le miel de Multi-fleurs. En générale, lorsque la teneur en sucre augmente la pression osmotique augmente ce qui provoque une diminution de la croissance bactérienne. Au-delà d'une certaine concentration de sucre la croissance est bloquée sauf pour les microorganismes osmophiles.

V.2.2 Activité antibactérienne :

V.2.2.1. Etude de l'influence de la température :

Les diamètres des zones d'inhibition des deux souches obtenus pour les deux types de miel (Multi-fleurs et Harmel à une dilution de 75%) en fonction de la température du traitement sont regroupés sur le **Tableau V-8 (Figures V-2**, **V-3 et V-4)**.

Tableau V-8 : Diamètre d'inhibition (mm) des deux souches obtenus pour les miels dilués à 75% et traités à des températures différentes.

		Sans chauffage (26-30°c) (moyenne de 28°C).	40°c	55°c	70°c	85°c	90°c
Miel de Multi fleurs	***E. coli***	24	23	25	13	-	-
	S. aureus	21	24	20	-	-	-
Miel de Harmel	***E. coli***	23	23	24	14	-	-
	S. aureus	20	23	19	-	-	-



Figure V-2: Zones d'inhibition (mm) des deux souches obtenus pour les miels dilués à 75% et traités à des températures différentes.

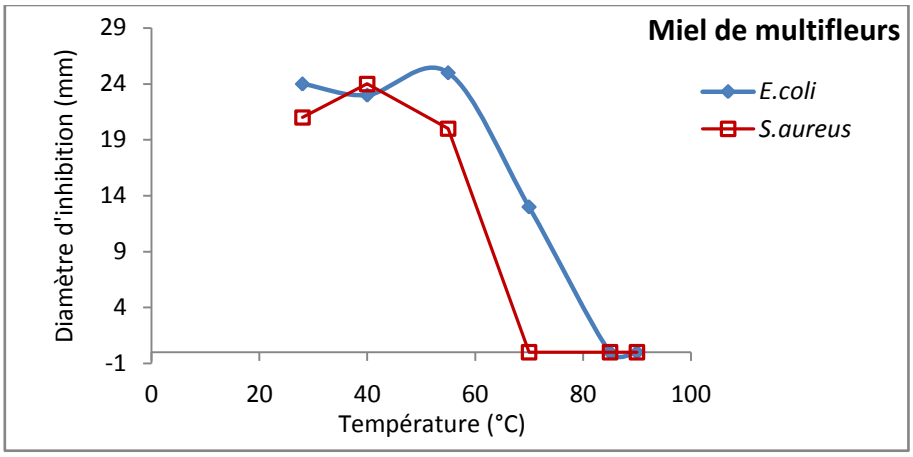


Figure V-3 : Variation des zones d'inhibition (mm) des deux souches obtenus pour le miel de Multi-fleurs en fonction de la température du traitement

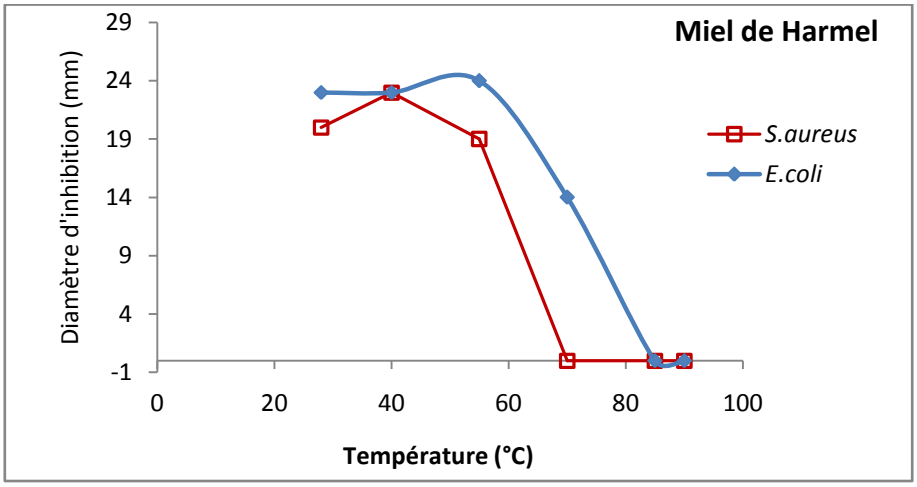


Figure V-4 : Variation des zones d'inhibition (mm) des deux souches obtenus pour le miel de Harmel en fonction de la température du traitement

L'effet inhibiteur des deux types de miels vis-à-vis d'*E. coli* est pratiquement stable entre (26-30°C soit une moyenne de 28°C) et 55°C. Nous notons une élévation non significative de l'effet inhibiteur vis-à-vis de *S. aureus* à 40°C. Au delà de 55°C, il apparaît que le diamètre des zones d'inhibition décroit avec l'augmentation de la température du traitement pour les deux types de miel. Une température ambiante est donc favorable à un bon effet inhibiteur des miels testés vis-à-vis des deux souches. Selon ***(Tosi. E et al, 2007)***, les changements dans l'activité antibactérienne est peut être due à la modification de l'activité enzymatique. A partir d'une température situé dans l'intervalle [65°C à 80°C], la dégradation totale de l'activité antibactérienne du miel est peut être due à la dénaturation de quelque substances antibactérienne thermolabiles ainsi à la dénaturation de l'enzyme « glucose-oxydase » qui produit l'eau oxygéné. Selon ***(Descottes. B, 2004),*** la valeur antibiotique du miel est attribuée à l'inhibine, qui est une enzyme très fragile à la chaleur et à la lumière ; il affirme que pour conserver l'activité de cette enzyme il ne faut pas dépasser 65°C pour *E. coli* et 70°C pour le *S. aureus* pendant 30 min.

V.2.2.2. Etudes de l'influence du pH :

L'étude de l'influence du pH a été réalisée pour le miel non traité par chauffage, car il exprime le maximum de son activité. Les diamètres des zones d'inhibitions des deux souches bactériennes enregistrées pour les deux types de miels (Multi-fleurs et Harmel à une dilution de 75%) en fonction du pH sont présentés sur le **Tableau V-9 (Figures V-5, V-6, V-7 et V-8).**

Tableau V-9: Diamètres des zones d'inhibition des deux souches bactériennes obtenues pour les deux miels traités à des pH différents.

	pH	***E. coli***	***S. aureus***
Miel de Multi- fleurs	**4.80 (naturel)**	**24**	**21**
	1.20	-	-
	3.98	19	17
	6.30	24	21
	8.40	20	16
	9.80	15	-
Miel de Harmel	**4.01 (naturel)**	**25**	**20**
	1.15	-	-
	4.20	27	15
	6.69	28	18
	8.74	22	13
	9.98	16	-



Figure V-5: Zones d'inhibition de *S. aureus* obtenues pour les miels de Multi-fleurs et de Harmel (dilués à 75%) et traités à des pH différents.

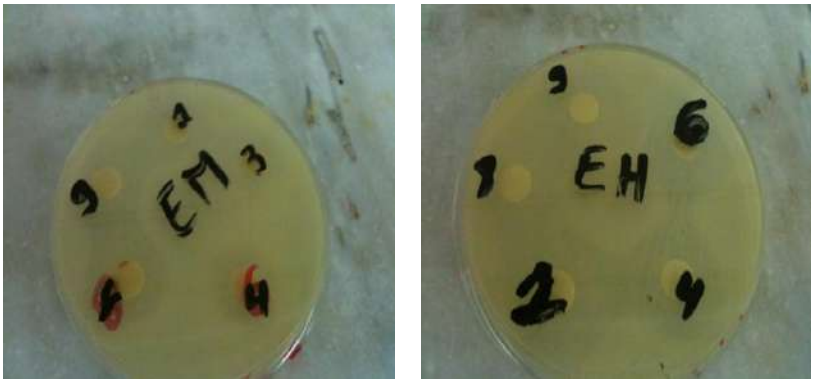


Figure V-6: Zones d'inhibition d'*E. coli* obtenues pour les miels de Multi-fleurs et de Harmel (dilués à 75%) et traités à des pH différents

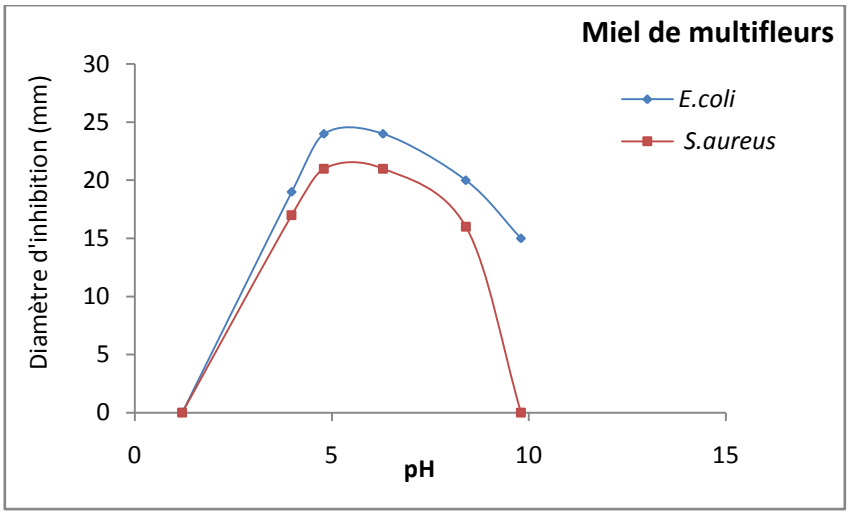


Figure V-7: Influence du pH sur l'activité antibactérienne du miel de Multi-fleurs sur les deux souches microbiennes

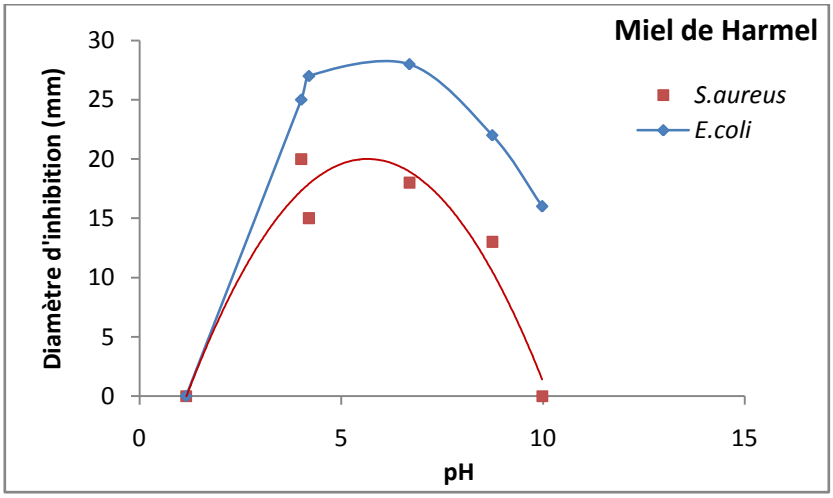


Figure V-8: Influence du pH sur l'activité antibactérienne du miel de Harmel sur les deux souches microbiennes.

- Au pH bas (1.2), les deux miels n'inhibent pas la croissance ni de *S aureus* ni de *E coli*. Ce ci est dû à la dénaturation de l'enzyme responsable de la production de l'eau oxygénée: la glucose oxydase
- L'activité du miel de Multi-fleurs augmente à partir du pH=3.98 jusqu'à atteindre du maximum à pH=4,80. L'activité est stable dans une marge située entre 4,80 (≈5) (pH naturel) et le pH neutre (6,30 à 7) (Zone optimale).
- Au-delà du pH acide, l'activité du miel de Harmel augmente jusqu'à atteindre un maximum à partir du pH= 4.01 (naturel) ou l'effet antibactérien reste pratiquement stable jusqu'à un pH = 6.69. Le pH optimal est donc situé entre 4,01 et le pH neutre (6,69 à 7).
- En fin, l'effet antibactérien des deux miels commence à diminuer au-delà du pH neutre jusqu'à l'absence des zones d'inhibition.

Les miels à tester sont des solutions concentrées en sucre. Leur teneur en eau est comprise entre 17% et 18.6%. Le miel agit ainsi d'une manière osmotique et absorbe l'eau vitale des agents pathogènes ***(Bogdanov. S et Blumer. P, 2001)***. A partir de ces observations, nous pouvons confirmer que le mode d'action des miels de Multi-fleurs et de Harmel est indépendant de l'effet osmotique puisqu'à pH=2 où l'activité oxydase est nulle, l'effet osmotique est absent (pas de zone d'inhibition). A partir du pH=4 ces miels agissent très peu par effet de leur acidité. Le pH dans ce cas constitue un facteur favorisant l'activité enzymatique du glucose oxydase : enzyme productrice de l'eau oxygénée.

V.2.2.3. Détermination de la CMI :

L'évaluation de la CMI des miels est basée sur les mesures des diamètres en millimètre des zones d'inhibition obtenues pour les différentes dilutions des miels. Pour cela, nous avons utilisé des miels natifs (non traités par chauffage, aux pH(s) naturels).

Les résultats sont résumés sur le **Tableau V-10** et les **Figures V-9, V-10, V-11** et **V-12**. Nous pouvons ainsi déduire la CMI des miels étudiés vis-à-vis des deux genres bactériens **(Tableau V-11)**.

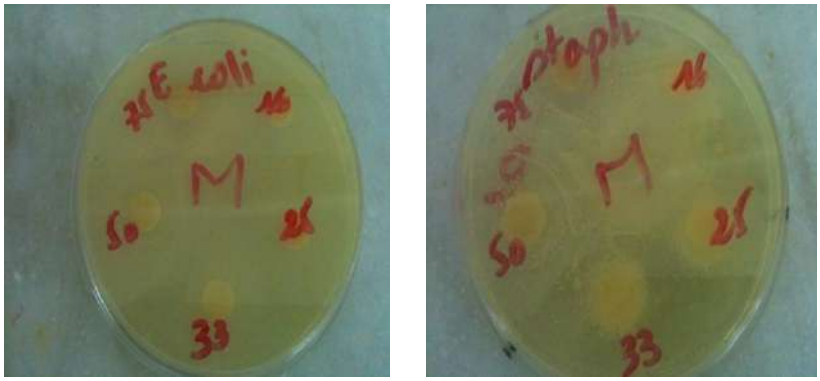


Figure V-9: Zones d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions de miel de Multi-fleurs sur les deux souches bactériennes.

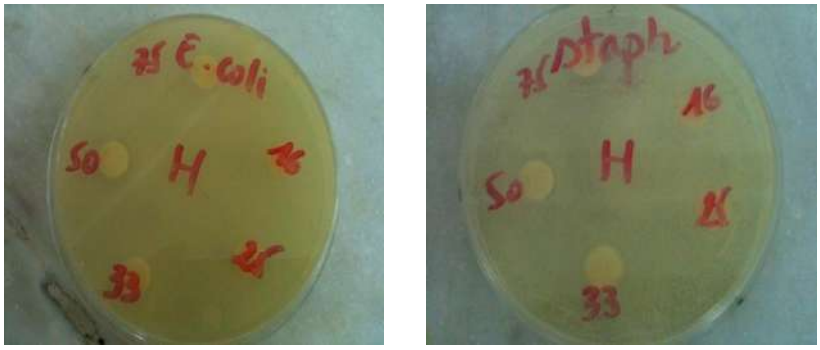


Figure V-10: Zone d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions de miel de Harmel sur les deux souches bactériennes.

Tableau V-10 : Diamètres d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions des miels.

	Staphylococcus aureus		*Escherichia coli*	
	Miel de multi-fleurs	**Miel de Harmel**	**Miel de multi-fleurs**	**Miel de Harmel**
75%(3/4)	21	20	24	23
65%	16	18	20	20
50% (1/2)	-	10	23	17
40%	-	-	19	15
33.33% (1/3)	-	-	-	-
25% (1/4)	-	-	-	-
16.67% (1/6)	-	-	-	-

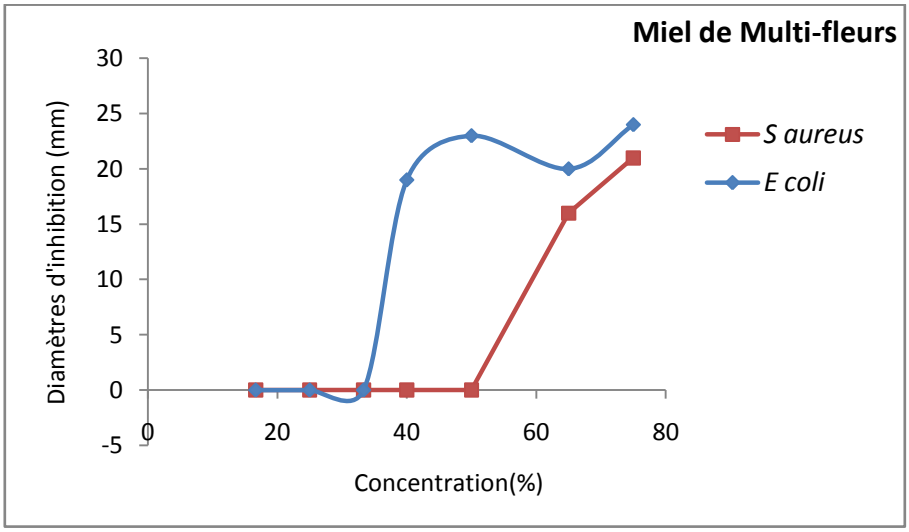


Figure V-11 : Effet inhibiteur du miel de Multi-fleurs sur les deux souches bactériennes

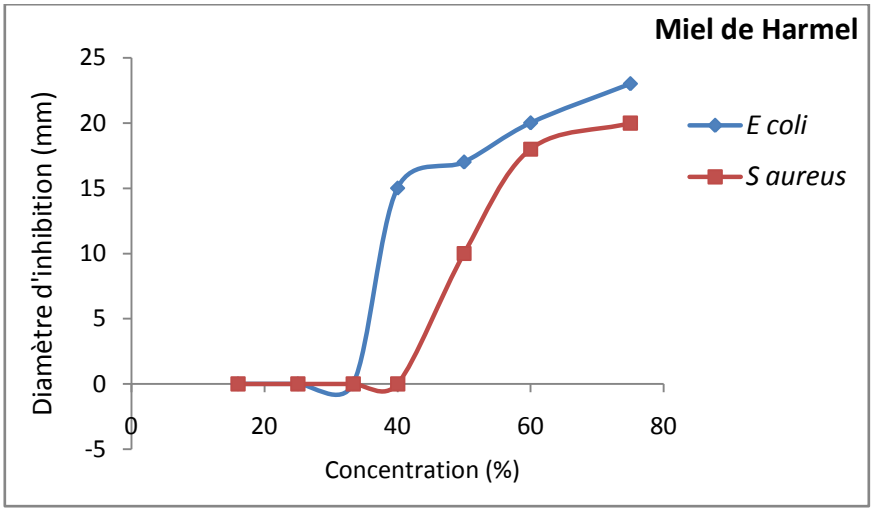


Figure V-12 : Effet inhibiteur de Harmel sur les deux souches bactériennes

Tableau V-11: CMI des miels sur les deux souches bactériennes

	Staphylococcus aureus		***Escherichia coli***	
Miel	**Multi-fleurs**	**Harmel**	**Multi-fleurs**	**Harmel**
CMI	[50%-65%]	[≈ 50%]	[33.33%-40%]	[33.33%-40%]

D'après ces résultats, nous pouvons constater ce qui suit:

- Les deux souches microbiennes testées sont sensibles à l'action inhibitrice des deux échantillons de miel naturel, ce qui indique un spectre large d'action (Gram- et Gram+).
- L'effet antibactérien du miel est plus important avec les échantillons moins dilués, il diminue avec des dilutions successives.
- Les effets antibactériens des deux miels sont pratiquement identiques car leurs CMI obtenues vis-à-vis des mêmes souches sont identiques (cas d'***E. coli***) ou voisines (cas de ***S. aureus***). Pour cela, nous retenons les deux miels pour le reste de notre étude.
- Plus la CMI est petite, plus la bactérie est sensible. Nous pouvons donc dire qu'*E. coli* est plus sensible à l'effet des deux types de miel par rapport à *S. aureus* (moins sensible). Nous pensons que l'action du miel naturel sur les microorganismes dépend de la structure de la paroi de la cellule cible, puisque nos échantillons de miel possèdent en effet inhibiteur sur les bactéries à Gram - plus élevé que sur les bactéries à Gram+. Nos résultats corroborent bien avec ceux de ***Kebaili. T, 2005*** qui a enregistré un effet antibactérien de trois types de miel (Forêt ; Oranger et Carline) sur *E coli* de collection et isolée (CMI la plus importante est 50%-

75% enregistrée pour le miel d'Oranger). Par contre, La même étude a signalé que *S. aureus* est plus sensible qu'*E. coli* vis-à-vis de ces miels. D'autre part, nos résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par ***Bensaber. I et Zahraoui. F, 2013*** qui ont signalé l'absence de l'effet antibactérien de deux types de miels sur *E. coli* : le miel de Jujubier et Euphorbe (volume d'essai 50µl et la concentration maximale testée est de 75%). Ceci nous laisse une interrogation soit sur la qualité de conservation des miels ou sur la possibilité d'adaptation de ce genre aux inhibines naturels de certains miels par rapport à d'autres.

V.3. Etude des extraits de plante :

La méthode des antibiogrammes est la technique choisie pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits étudiées. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extraits à l'intérieur d'une boite de pétri, dans un milieu nutritif solide. Pour cela, nous avons testé les deux souches *S. aureus* et *E. coli* isolées et identifiées au laboratoire. L'activité antimicrobienne des extraits est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne

L'estimation de l'activité antimicrobienne des extrait des plantes est basée sur une échelle de mesure mise en place par ***Meena et Sethi, 1994*** et ***Ela et al., 1996***. Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 4 classes ***(Jean Marie. P et al, 2009)***:

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm,
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16mm et 28mm,
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10mm et 16mm,
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Selon ***Pibiri. E, 2005***, il est difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus avec ceux rapportés par la littérature en raison des problèmes suivants :

- Nature du matériel végétale (l'espèce, extrait, origine géographique, altitude, saison de cueillette),
- Procédé d'extraction,
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation,
- Nature des souches testées,
- Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne,
- Milieux de cultures employés (milieu synthétique ou naturel).

V.3.1. Effet antibactérien des extraits : Optimisation de la méthode d'extraction et le genre botanique :

Nous avons testé l'activité antibactérienne de deux extraits de plantes fraiches préparés par les trois méthodes d'extraction (macération, décoction, et infusion). Les zones d'inhibition des souches sont résumées dans le **Tableau V-12**.

Tableau V-12 : Les zones d'inhibition (mm) des souches vis-à-vis des différents extraits.

			E. coli	***S. aureus***
Oléandre	**Frais**	*Macération*	14	R
		Décoction	14	R
		Infusion	12	R
Marrube	**Frais**	*Macération*	R	15
		Décoction	R	12
		Infusion	R	R

D'après ces résultats, il apparaît que:

- *Staphylococcus aureus* est sensible à l'action inhibitrice du Marrube et résistant à l'action inhibitrice de l'Oléandre. *E. coli* exprime une résistance vis-à vis de marrube et une sensibilité vis-à-vis de l'Oléandre,
- L'effet antibactérien des extraits est plus important avec la méthode d'extraction par macération.

D'après ***Rojas et al, 1992; Marjorie, 1999,*** l'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, (en particulier thymol et carvacol), les flavonoîdes et les triterpénoîdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyles libres, qui sont classés comme composés antibiotiques très actifs. La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait ***(Essawi. T et Srour.M , 2000)***.

En conclusion, l'action des extraits naturelle sur la souche testée varie d'une part selon la nature de la plante (composition chimique) et d'autre part selon la méthode d'extraction. Nous choisissons pour la suite de notre travail la macération comme méthode d'extraction. Nous terminons notre étude avec les deux plantes puisqu'elles ont deux spectres différents : l'Oléandre pour les Gram- (dont *E. coli*) et le Marrube pour les Gram+ (dont *S. aureus*).

V.3.2. Optimisation de la nature de la plante :

Nous rappelons que le but de cette partie est de choisir le mode d'utilisation des deux plantes: sèches ou fraiches ? En utilisant la macération comme méthode d'extraction.

V.3.2.1. Mesure de la teneur en eaux :

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60% à 80% d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10% ***(Paris . O et Moyes, 2002)***. Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans les deux types de plantes fraiche ou sèche. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve. Les résultats de cette analyse ont révélé un teneur en eau de 80% pour le Marrube frais et 10% pour le Marrube sec ; 70% pour l'Oléandre fraiche et 10% pour l'Oléandre sèche **(Tableau V-13)**.

Tableau V-13: Taux d'humidité des feuilles sèches et fraiche des deux plantes.

	Marrube		**Oléandre**	
	Frais	**Sec**	**Frais**	**Sec**
X (g)	2	2	2	2
Y (g)	0.4012	1.8047	0.6047	1.8035
T (%)	80	10	70	10

V.3.2.2. Etude de l'effet antibactérien des échantillons secs et frais :

Nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits des plantes fraiches et sèches préparés dans les mêmes conditions et avec la même masse en matière végétale ***pure***. Les diamètres d'inhibitions obtenus sont représentés sur le **Tableau V-14**.

Tableau V-14 : Diamètre d'inhibition (mm) des deux souches vis-à-vis des extraits deux types de plantes (sèches et fraiches) préparés par macération.

		E. coli	***S. aureus***
Oléandre	***Sèche***	R	16
	Fraiche	14	R
Marrube	***Sec***	R	11
	Frais	R	15

D'après ces résultats, il apparait que :

- L'extrait de l'Oléandre frais a réagit sur *E. coli* et extrait de l'Oléandre sec a réagit sur *S. aureus.* Par contre, les deux extraits de Marrube (sec et frais) ont réagit sur *S. aureus* et non pas sur *E. coli*. Sa forme fraiche est la plus active.
- Pour la suite de notre travail, nous avons décidé de terminer avec l'Oléandre sèche et fraiche puisqu'elles ont deux spectres différents et avec le Marrube Frais puisqu'il est le plus actif sur *S. aureus*. Finalement et pour plus de précaution, nous avons aussi ajouté le Marrube sec, car il peut donner de meilleurs résultats avec l'augmentation du rapport (m/v). et pour le même souci, nous avons décidé de réaliser les tests d'inhibition sur les deux souches.

V.3.3. Optimisation du rapport Masse/Volume (m/v):

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des extraits des plantes préparés à différents rapport masse/volume afin d'optimiser à partir duquel l'effet antibactérien est maximal. Ceci nous évite le gaspillage dû à l'utilisation de la matière végétale en surplus. Les diamètres (mm) des zones d'inhibition en fonction de concentration de l'extrait des plantes sont indiqués sur le **Tableau V-15** et la **Figure V-13.**

Tableau V-15 : Les diamètres (mm) d'inhibition des souches microbiennes obtenus pour les extraits des plantes préparés par macération à différents rapport (m/v).

m/v (g/ml)		0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.15	0.2	0.24	0.28	0.3	0.36
S. aureus	Marrube frais	11	11	12	12	12	16	16	17	16	13	12	12
	Marrube sec	11	11	11	16	13	12	14	13	17	16	18	16
	Oléandre fraiche	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
	Oléandre sèche	11	11	11	12	14	16	17	14	15	0	0	0
E. coli	Marrube frais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marrube sec	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Oléandre fraiche	0	0	0	0	14	12	11	0	0	0	0	0
	Oléandre sèche	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

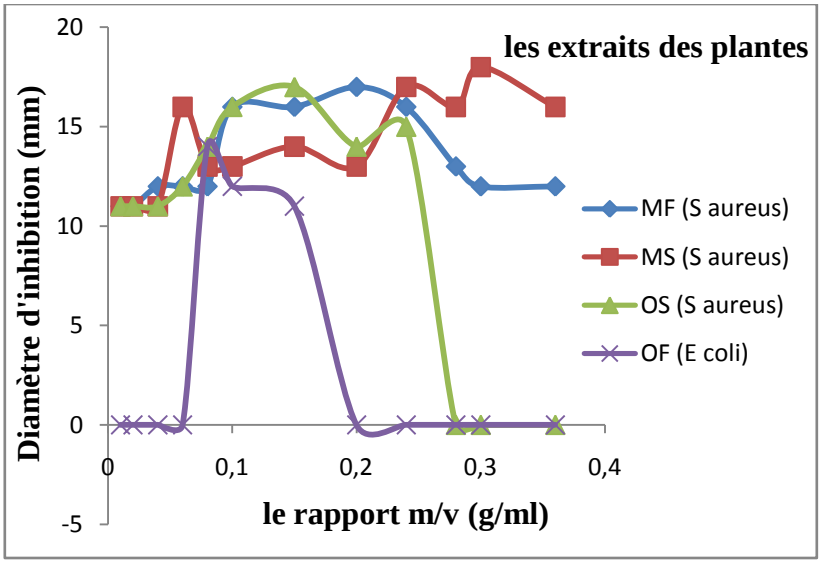


Figure V-13 : Effet de les extraits des plantes préparés par macération à différents rapport (m/v) sur les deux souches microbiennes

MF : Marrube frais

MS : Marrube sèche

OF : Oléandre fraiche

OS : Oléandre sèche

D'après ces résultats, il apparaît que :

- *Staphylococcus aureus* est sensible à l'action inhibitrice des extraits de plantes avec des différences d'une concentration à une autre.
- L'effet antibactérien des extraits sur *S. aureus* augmente avec l'augmentation du rapport m/ v jusqu'à obtention d'un maximum d'activité à partir d'un rapport de :
  - ✓ 0,1g/ml pour : - le Marrube frais (plateau entre 0,1g/ml et 0,24g/ml),
    - l'Oléandre sèche (plateau entre 0,1g/ml et 0,15g/ml),
  - ✓ 0,24 pour le Marrube sec (plateau à partir de 0,24g/ml),

  Il est donc inutile d'ajouter plus de matière végétale au-delà de ces seuils puisque ceci n'améliore pas l'effet antimicrobien de ces extraits. Nous notons un déclin de l'effet antimicrobien à partir de 0,24g/ml pour le Marrube frais et 0,15g/ml pour l'Oléandre sèche. Ceci est expliqué par la mauvaise extraction causé par la charge du milieu d'extraction.
- L'effet antibactérien de l'extrait de l'Oléandre fraiche sur *E. coli* augmente avec l'augmentation du rapport m/v dans un intervalle situé entre 0.08g/ml et 0.15g/ml mais les autres extraits n'ont pas un effet antibactérien sur la souche.

V.3.4. Influence du pH :

Afin d'optimiser le pH, nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits des plantes dans les conditions déjà optimisées à différents pH. Les diamètres (mm) des zones d'inhibition obtenus aux différents pH testés sont indiqués sur le **Tableau V-16**.

D'après ces résultats, il apparaît clairement que les différents extraits expriment leurs maximums d'effets inhibiteurs aux pH naturels obtenus dans les conditions optimisées : l'effet antibactérien des extraits augmente avec l'augmentation du pH jusqu'à pH naturel qui possède l'effet antibactérien le plus important, puis l'activité diminue au-delà du pH naturel. Le pH influe sur les principes actifs de l'extrait des plantes, ce qui explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne.

Tableau V-16: Diamètres d'inhibition (mm) des souches vis à vis des extraits des plantes à différents pH, dans les conditions optimisés.

Les extrais	pH	*Straphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
Marrube sec	1.85	10	-
	3.74	13	-
	5.84	18	-
	7.29	17	-
	9.27	16	-
	11.11	16	-
Marrube frais	1.20	0	-
	3.30	0	-
	5.53	0	-
	7.72	15	-
	9.64	13	-
	11.19	13	-
Oléandre sèche	1.31	0	-
	3.23	10	-
	5.90	15	-
	7.44	14	-
	9.20	12	-
	11.01	10	-
Oléandre fraiche	1.50	-	0
	3.48	-	0
	5.12	-	10
	7.01	-	14
	9.78	-	12
	11.65	-	10

Les valeurs en gras et soulignées sont les pH naturels.

V-3-5 Détermination de CMI de l'extrait :

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des extraits de plantes par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller-Hinton). Les résultats obtenus sont représentés sur **Tableau V-17**. Il faut noter aussi que toutes les dilutions ont présenté un pH dans la zone optimale.

Tableau V-17: Diamètres des zones d'inhibition des deux bactéries (mm) pour les différentes dilutions des extraits des plantes préparé dans les conditions optimisées.

		100%	**75% (3/4)**	**50% (1/2)**	**33.33% (1/3)**	**25% (1/4)**	**CMI**
Marrube frais	*S. aureus*	14	0	0	0	0	**[75-100]**
Marrube sec		21	18	16	17	13	**<25%**
Oléandre sèche		18	15	0	0	0	**[50%-75%]**
Oléandre fraiche	*E. coli*	14	11	0	0	0	**[50%-75%]**

Selon ***Chang. J et al, 2001*** et ***Oussalah. B et al, 2007***, le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composés majoritaires,
- Concentration de ces composés,
- Nature et structure des groupements fonctionnels
- L'interaction probable entre les différents constituants (synergie),

D'après ces résultats, il apparaît que :

- *Staphylococcus aureus* est plus sensible par rapport à *E. coli* puisque les extraits de trois plantes sont actifs sur ce germes alors qu'*E. coli* n'est sensible qu'à l'action de l'extrait d'une seule plante (Oléandre fraiche).
- Parmi les plantes actives sur *S. aureus*, le Marrube sec donne un extrait à effet antibactérien le plus prononcé (CMI la plus petite<à 25%) suivie de celui de l'Oléandre sèche (50%-75%) et en dernier celui du Marrube frais (75%-100%).
- Pour *E coli*, la CMI est située entre 50% et 75% pour l'extrait d'Oléandre fraiche.

V.4. Etudes de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extraits des plantes :

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des dilutions des deux miels (Multi-fleurs et Harmel) dans les extraits des plantes sur les deux souches bactériennes par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller-Hinton). Les diamètres (en mm) des zones d'inhibition sont indiqués sur le **Tableau V-18**

D'après ces résultats, il apparaît que:

- L'activité antibactérienne des dilutions des miels dans les extraits des plantes est plus d'importance que l'activité antibactérienne des dilutions des miels dans l'eau.
- Inversement, l'activité antibactérienne des dilutions de l'extraits des plantes dans les deux miels est plus d'importante que l'activité antibactérienne des dilutions des extraits dans l'eau
- Le couplage des miels étudiés avec les extraits des plantes provoque une activité inhibitrice très importante à cause des interactions entre les différents constituants des plantes et des miels ce qui explique donc l'augmentation des zones d'inhibition.
- En faisant l'addition des zones d'inhibition des différentes dilutions du miel et de l'extrait dans l'eau, nous pouvons avoir une idée sur la nature des interactions entre le miel et l'extrait de la plante. D'une façon générale : tous les mélanges (miel-extrait de plantes) sont à effet synergique sauf celui obtenu avec le Marrube sec qui a un effet + ou – additif. Il faut noter que nous pouvons juger un effet synergique lorsque les zones d'inhibition obtenues pour le mélange sont supérieures à la somme des zones d'inhibition des mêmes dilutions des composants dans l'eau. De la même manière, l'effet additif est détecté lorsque les zones d'inhibitions obtenues pour le mélange sont proches de la somme des zones d'inhibition des mêmes dilutions dans l'eau **(Tableaux V-10, V-17, V-18)**.
- Enfin, il faut signaler que nous avons réalisé un mélange de l'extrait du laurier préparé dans les mêmes conditions optimisés par l'étude de ***Bensaber. I et Zahraoui. F, 2013*** avec nos miels. Son association avec le miel de Harmel donne un mélange à effet antimicrobien appréciable et légèrement supérieure à celui trouvé par la même étude. Cependant, l'association avec le miel de multi-fleurs donne un mélange moins actif.

Tableau V-18 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches obtenus pour les dilutions des miels dans les extraits des plantes préparé dans les conditions optimisées.

% de miel		**75%**		**66.66%**		**50%**		**33.33%**		**25%**	
% de l'extrait		**25%**		**33.33%**		**50%**		**66.66%**		**75%**	
		pH	**DI**		**DI**		**DI**		**DI**		**DI**
miel de Harmel + Marrube sec.	**S. aureus**	**4.48**	**30** **33**	**4.64**	**24** **35**	**4.92**	**22** **26**	**5.20**	**21** **/**	**5.40**	**21** **18**
miel de Harmel + Marrube frais.		**4.90**	**27**	**5.25**	**23**	**5.80**	**21**	**6.48**	**18**	**6.78**	**14**
miel de Harmel + Oléandre sèche.		**4.47**	**22**	**4.65**	**20**	**4.93**	**16**	**5.24**	**14**	**5.42**	**13**
miel de Multi fleurs + Marrube frais.		**5.55**	**23**	**5.74**	**21**	**6.24**	**19**	**6.74**	**16**	**6.98**	**12**
miel de Multi fleurs + Marrube sec.		**5.07**	**25**	**5.17**	**23**	**5.31**	**21**	**5.50**	**20**	**5.59**	**19**
Miel de Multi fleurs + Oléandre sèche		**5.08**	**30**	**5.16**	**26**	**5.37**	**24**	**5.54**	**20**	**5.64**	**15**
Miel de Harmel + Laurier frais		**4.87**	**30**	**5.14**	**28**	**5.77**	**26**	**6.33**	**24**	**6.68**	**20**
Miel de Multi fleurs + Laurier frais		**5.47**	**25**	**5.72**	**22**	**6.15**	**18**	**6.60**	**15**	**6.82**	**12**
miel de Harmel + Oléandre fraiche	**E. coli**	**4.75**	**30** **23**	**5.00**	**26** **20**	**5.50**	**20** **17**	**6.02**	**12** **/**	**6.26**	**12** **11**
miel de Multi fleurs + Oléandre fraiche		**5.34**	**29**	**5.58**	**25**	**5.91**	**24**	**6.28**	**18**	**6.45**	**15**

DI : diamètre d'inhibition.

Valeurs en rouge : La somme des zones d'inhibition des mêmes dilutions dans l'eau. Exemple d'un effet + ou – additif.

Valeurs en bleu : La somme des zones d'inhibition des mêmes dilutions dans l'eau. Exemple d'un effet synergique.

Tables des matières

Introduction……..**1**

Partie bibliographique

CHAPITRE I : Le miel

I.1. Définition ……..……**3**

I.2. Elaboration du miel ……..……...**3**

I.3. Caractère physico - chimique du miel ……...……**4**

- La densité……...……...**4**
- La viscosité……..……..**4**
- La solubilité ……...……..**4**
- La coloration ……..……**4**
- La saveur……..……**4**
- La conductibilité thermique……...….**4**
- Le pH ……...…..……**4**
- La conductibilité électrique……...…..**4**
- L'indice de réfraction……..…**5**
- L'hygroscopie du miel……..……**5**

I.4. Composition moyenne du miel ……**5**

I.5. Vieillissement du miel ……..….**5**

I.5.1. La cristallisation……..**7**

I.5.2. La fermentation……...…**7**

I.5.3. Autres modifications liées au vieillissement du miel……**8**

I.5.4. Conservation du miel…….……..…**8**

I.6. Les propriétés du miel…….…..…..**9**

I.6.1. Valeurs nutritionnelles et diététiques communes à tous les miels……**9**

I.6.1.1. Le miel, un aliment pour les jeunes……**10**

I.6.1.2. Un aliment pour les personnes âgées……**11**

I.6.1.3. Un aliment pour les sportifs……..…..**11**

I.6.1.4. Un aliment pour les personnes diabétiques……..….**12**

I.6.2. Propriétés thérapeutique ……..……**13**

I.6.2.1. Activité antibactérienne du miel……...……**13**

I.6.2.2. Propriétés cicatrisantes……..…….……**14**

CHAPITRE II : Les plantes médicinales

II.1. Les plantes médicinales……..……**15**

II. 2. Récolte et conservation des plantes médicinales ……..……**15**

II.2.1. Récolte des plantes médicinales……...……**15**

II.2.2. Conservation des plantes médicinales…….……**16**

II. 3. Présentation de quelques plantes médicinales ……..……..**16**

II. 3. 1. Marrube blanc ……**16**

II.3.1.1. Etymologie…….……**17**

II.3.1.2. Histoire……...……**17**

II.3.1.3. Habitat……...……**18**

II.3.1.4. Description botanique……**18**

II.3.1.5. Composition……**18**

II.3.1.6. Propriétés et vertus ……..……**19**

a/ Propriétés principales……..……**19**

b/ Propriétés secondaires……..……..**19**

II.3.1.7. Indications thérapeutiques ……..……...……**19**

II.3.2. Oléandre ……...……**20**

II.3.2.1. Présentation ……**20**

I.3.2.2. Étymologie et origine……..……**20**

II.3.2 3. Habitat et Répartition géographique……..……..**20**

II.3.2.4. Description…….……**20**

II.3.2.5. Principes actifs……**21**

II.3.2.6. Toxicité d'oléandre ……**22**

II.3.2.7. Quantité toxique……..……**22**

CHAPITRE III :Pathogènes et agents antimicrobiens

III. 1. Bactérie……..**23**

III.1.1. *Staphylococcus aureus*……..…….*24*

a/ Nom commun……..……..*24*

b/ Caractères bactériologiques…….……**24**

c/ Habitat et pouvoir pathogènes ……....……**24**

III. 1. 2. *Escherichia coli*……..……**26**

a/ Caractères bactériologiques……..……**26**

b/ Habitat et pouvoir pathogènes ……**26**

III. 2. Les agents antimicrobiens……..……..**27**

III.2.1. Les antibiotiques……..……**27**
III.2.1.1. Définitions:……..……..**27**
III.2.1.2. Classification des antibiotiques ……**27**
III.2.1.3. Modes d'action des antibiotiques ……...……..**27**
a/ Action au niveau de la paroi ……**27**
b/Action au niveau de la membrane cytoplasmique…….……**28**
c/ Action sur la synthèse des protéines……**28**
d/Action par inhibition compétitive……..**28**
III.2.2. Les extraits végétaux ……..……**28**
III.2.3. Les miels……...……**28**
III. 3. Techniques d'études de l'effet antimicrobien ……...……**29**
III.3.1. Critères de mesure de la sensibilité bactérienne aux antimicrobien……...……..**29**
III.3.1.1. La concentration minimale inhibitrice (CMI) …….……**29**
a/ Définition……..……**29**
b/ Obtention……..……**30**
III.1.1.2. Concentration Minimale Bactéricide (CMB) ……...……**32**

Partie expérimentale

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.1 Matériels …….…..…….**33**
IV.1.1. Matériels biologiques…….……..**33**
IV.1.1.1. Miels……..……**33**
a/ Miel de multi fleurs ……..**33**
b/ Miel de Harmel…….……**33**
IV-1-1-2 Souches bactériennes ……...……**33**
IV.1.1.3. Les plantes ……...……**34**
IV.1.2. Matériels non biologiques……...……..**34**
IV.1.2.1. Solution, produits et milieux…….……**34**
IV.1.2.2. Petit matériel et verrerie……**35**
a/ Verrerie…….……**35**
b/ Matériels microbiologiques…….……**35**
IV.1.2.3. Grands matériels ……..……**35**
IV.2. Méthodes ……..……..**36**

V.2.1. Identification des souches utilisées…….…….…….**36**
IV.1.2. 1. Critères morphologiques…….…….**36**
1/Critères Macroscopiques ……..……**36**
2/Critères microscopiques…….……**36**
a/ Etat frais…….……**36**
b/ Coloration de Gram…….……**37**
IV.1.2.2. Critères biochimiques ……..……..**39**
1/ Recherche de la catalase…….……..**39**
2/Recherche de l'oxydase…….……**39**
3/ Recherche des décarboxylases……..……**39**
4/ Recherche d'une Tryptophane désaminase……..……**42**
5/Recherche de tryptophanase……..……**42**
6/Recherche de l'uréase……**43**
7/ Recherche de L'ONPG hydrolase (β galactosidase)……**44**
8/ L'assimilation du citrate comme seule source de carbone……**45**
9/ Etude du pouvoir glucidolytique : Assimilation du Glucose, Saccharose et Lactose**.....46**
10/Assimilation des autres glucides……**47**
11/Assimilation du mannitol……**47**
12/ Les types fermentaire: Exemple test RM ou VP……**48**
13/ Identification des Enterobacteriaceae en minigalerie…….**.....49**
IV.2.2. Etude du miel ……**50**
IV.2.2.1. Caractérisation physicochimique……..**50**
b/ Le pH ……..**50**
c/ Mesure de la teneur en eau ……..**50**
d/ Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bertrand……..**51**
IV.2.2.2. Etudes de l'activité antibactérienne du miel……..**52**
a/ Etude de l'influence de la température……**52**
b/ Etude de l'influence de pH ……..**53**
c/ Détermination de CMI……..**53**
1/Préparation des dilutions des miels ……...**53**
2/ Méthode de diffusion sur gélose ……..**53**
IV.2.3. Etude des plantes …….**....54**
IV.2.3.1. Préparation de l'extrait……..**54**

a/ Extraction par infusion ……..**54**
b/Extraction par décoction…….**54**
c/ Macération à chaud ……**54**
IV.2.3.2. Effet antibactérien des extraits: Optimisation de la méthode d'extraction et du genre botanique ……**55**
IV.2.3.3. Choix de la nature de plante…….**56**
a/ Mesure la teneur en eau……**....56**
b/ Etude de l'effet antibactérien des échantillon secs et frais……...**56**
IV-2-3-4 Optimisation du rapport Masse/Volume……....**56**
IV.2.3.5. Influence du pH sur l'effet antibactérien de l'extrait…….**57**
IV.2.3.6. Détermination de CMI de l'extrait ……...**57**
IV.2.4. Etude de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extrait de plantes…….**57**

CHAPITRE V : Résultats et discussions

V. 1. Identification des souches bactériennes ……..**58**
V.1.1. Etude macroscopique ……**58**
V.1.2. Etude microscopique……..**58**
V.1.2.1. Observation à l'état frais ……....**58**
V.1.2.2. Observation après une double coloration: (Coloration de Gram)……...**58**
V.1.3. Identification biochimiques ……...**59**
V.1.3.1. E coli……...**59**
V.1.3.2. *S aureus* ……..**59**
V.2. Etude du miel ……...**61**
V.2.1. Analyse physico-chimique……**61**
V.2.1.1. La densité ……**...61**
V.2.1.2. Le pH ……..61
V.2.1.3. La teneur en eau……..**62**
V.2.1.4. Dosage des sucres réducteurs……..**62**
V.2.2 Activité antibactérienne ……**63**
V.2.2.1. Etude de l'influence de la température ……...**63**
V.2.2.2. Etudes de l'influence du pH ……**...65**
V.2.2.3. Détermination de la CMI……**68**
V.3. Etude des extraits de plante……...**71**
V.3.1. Effet antibactérien des extraits : Optimisation de la méthode d'extraction et le genre botanique ……..**72**

V.3.2. Optimisation de la nature de la plante ……...**73**
V.3.2.1. Mesure du taux d'humidité ……**73**
V.3.2.2. Etude de l'effet antibactérien des échantillons secs et frais ……...**73**
V.3.3. Optimisation du rapport Masse/Volume (m/v)……..**74**
V.3.4. Influence du pH ……**76**
V-3-5 Détermination de CMI de l'extrait.……**78**
V.4. Etudes de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extraits des plantes…….**79**

Conclusion……**80**
Références bibliographiques
Annexes