République Algérienne Populaire et Démocratique

Ministère de l'enseignement Supérieur et de de la recherche scientifique

Université Dr Yahia Fares-Médéa

Faculté de Technologie

Mémoire de fin d'études de Master

Filière : Génie des procédés pharmaceutiques.

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques.

Thème

Etude de l'effet inhibiteur naturel d'une formule à base de miel et d'extrait de plante à usage pharmaceutique

Réalisé par :

Mlle EZZOUAOUI Amel

Mlle BOUZIR Maria Hadjer

Devant le jury :

Dr. ARBIA Wassila : Présidente.

Dr. TURKMAN Meriem: Examinatrice.

Dr. TASSIST Amina : Promotrice.

Pr. ABOUSSEOUD Mahmoud : Co-Promoteur.

2019-2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les voies du savoir, et pour nous avoir accordé la volonté et le courage pour élaborer ce travail.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à notre encadreur Mme **TASSIST Amina** pour nous avoir donné l'occasion de réaliser ce travail sous sa direction, pour son amabilité, ses précieuses orientations, ses conseils avisés et ses corrections combien bien utiles.

A notre co-promoteur Mr **ABOUSEOUD Mahmoud** pour son soutien continu et pour avoir cru en nous.

Nous tenons également à remercier tous les membres de notre jury d'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nous remercions **Dr ARBIA Wassila** d'avoir accepté de présider notre jury de soutenance.

Nous remercions aussi **Dr TURKMAN Meriem** pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons nos remerciements à toute l'équipe des laboratoires de Hall technologique de l'université Yahia Farès de Médéa surtout Mme **FERGANI Radia**, ingénieure de laboratoire de biologie, pour son aide et son encouragement.

Notre remerciement s'adresse également à tous nos professeurs pour leurs générosités et patience pendant tout notre parcours universitaire.

Enfin tout ceux qui ont contribués de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire, un grand merci à tous.



Dédicace

A la mémoire de mon père que dieu repose son âme en paix.

A la plus belle perle du monde…ma tendre mère,
L'étoile de ma vie qui fait briller mes jours les plus sombres, qui réchauffe mon cœur quand il fait froid. Aucune langue ne peut exprimer ta beauté et ta force. Mon respect et ma reconnaissance pour tous ce que tu as sacrifie pour ma formation, ma réussite et mon bien être.
A mes très chers frères, Yakoub et Haithem.
A mes tendres, gentilles et adorables sœurs Soumia et Amel.
A toute ma famille et mes collègues.
A tous mes professeurs.
A mon binôme Amel, je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments qu'on a passé ensemble.
A tous mes amies qui m'ont encouragé : Youssra, Souhila, Houda.
À tous ceux qui me connaissent.

Maria



Dédicace

D'un sentiment plein d'amour, de sincérité et fidélité, je dédie ce travail :

A Mon très cher papa qui, malgré sa maladie, a toujours été pour moi un soutien pour continuer et ne pas échouer, il disait que je suis forte et que je peux réaliser tout ce que je souhaite. Je l'ai puisé de ma force pour accomplir ce travail.

A ma très chère maman, une lueur d'espoir dans cette vie, c'est la dose d'optimisme et de patience, c'est la lumière du mon chemin. Elle me fait toujours des déclarations encourageantes et m'informe que rien n'est mieux pour une femme que son succès qu'elle fait pour elle-même.

A Mes adorables frères, *Brahim*, *Abderrahmane*, *Mohamed*.

A Mes très chères sœurs, *Radia*, *Ibtissem*

A Toute ma famille, *Soumia*, *Rahima*, *Ma chère tante*

Tous mes proches et tous mes collègues de la promotion.

A Tous mes enseignants.

A Mon binôme Maria, ma chère amie, je la remercie de m'encourager, je lui souhaite plus de succès.

Mes très chères amies surtout, *Souhila.*

Ainsi à tous ceux qui tiennent dans leurs cours et me souhaitent réussite**.**

Amel



ملخص

يتمحور العمل الذي أجريناه حول تقييم مفعول وصفة مكونة من خليط العسل و مستخلص *alypum Globularia* (تسلغة) كمضاد بكتيري طبيعي. في هذا السياق أجرينا التحاليل الفيزيائية و الكيميائية للعسل وقمنا بتقييم نشاطه المضاد. أظهرت النتائج معيارية العسل (الكثافة = 1.39, درجة الحموضة = 3.89, محتوى الماء = 15.6 %, الناقلية الكهربائية = 0.691 cm/ms , محتوى السكريات المختزلة = 60 %) مما يدل على إحتمالية أنه من أصل الرحيق. يملك العسل طيف واسع مضاد للجراثيم (غرام+ و غرام-) في ظل الشروط المثالية التالية : درجة الحموضة =[4-6], درجة الحرارة < 75 درجة مئوية, يكون أكثر نشاطا على المكورات العنقودية الذهبية (CMI=[25-33]%) ثم الزائفة الزنجارية (CMI= 50%). البكتيريا المعوية هي أكثر السلالات المقاومة (CMI=[50-66]%).

الكلمات المفتاحية : عسل الغابة, *alypum Globularia* , تسلغة, تأثير مضاد للبكتيريا, المكورات العنقودية الذهبية, البكتيريا المعوية, الزائفة الزنجارية.

Résumé

Notre étude porte sur la détermination de l'effet inhibiteur naturel d'une formule à base de miel du forêt couplé avec l'extrait de *Globularia alypum* (*Tassalgha).* Nous avons effectué les analyses physico-chimiques du miel et évalué son activité antibactérienne. Les résultats révélent la conformité du miel (densité=1.39, pH=3.89, teneur en eau=15.6%, conductivité éléctrique=0.691 ms/cm, P% sucres réducteurs=60%) témoignant l'appartenance probable à une origine néctarique. Le miel possède un large spèctre antibactérien (Gram+ et Gram-) dans les conditions optimales suivantes : pH=[4-6], température <75°C. Il est plus actif sur *Staphylococcus aureus* (CMI=[25-33]%) puis *Pseudomonas aeruginosa* (CMI=50%). *Escherichia coli* est la souche la plus résistante (CMI = [50-66]%).

Mots clefs : Miel de Forêt, *Globularia alypum*, *Tassalgha,* Effet inhibiteur, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa.*

Abstract

Our study relates to the determination of the natural inhibitory effect of a formula based on forest honey coupled with the extract of *Globularia alypum* (*Tassalgha*). We carried out the physico-chemical analysis of honey and we evaluated its antibacterial activity. The results reveal the conformity of honey (density=1.39, pH=3.89, water content=15.6%, electrical conductivity=0.691 ms/cm, P% reducing sugars= 60%) testifying to the probable membership of a nectaric origin. Honey has a broad antibacterial spectrum (Gram+ and Gram-) under the following optimal conditions : pH=[4-6], temperature <75ºC. It is more active on *Staphylococcus aureus* (CMI=[25-33]%) than *Pseudomonas aeruginosa* (CMI=50%). *Escherichia coli* is the most resistant strain (CMI =[50-66] %).

Keywords: Forest honey, *Globularia alypum*, *Tassalgha*, Inhibitory effect*, Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Pseudomonas *aeruginosa*.

Liste des principales abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
CMI :	Concentration minimale inhibitrice.
E. coli:	*Escherichia coli.*
FAOSTAT:	Statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
HMF :	Hydroxy-Méthyl Furfural.
Max :	Maximum.
Min :	Minimum.
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé.
ORL :	Oto-rhino-laryngologie.
P. aeruginosa :	*Pseudomonas aeruginosa.*
pH :	Potentiel d'hydrogène.
S.aureus :	*Staphylococcus aureus.*
sp:	espèce inconnue.
UE :	Union Européenne.

Liste des Unités

an :	Année
°C :	Degré Celsius.
g :	Gramme.
h :	Heure.
Kcal :	Kilocalories.
Kg :	Kilogramme.
meq/kg :	Milliéquivalents/kilogramme
mg :	Milligramme.
mg/kg :	Milligramme par kilogramme.
min :	Minute.
ml :	Millilitre
mm:	Millimètre.
mS/cm :	Millisiemens /centimètre.
µl :	Microlitre.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure I-1	Fleur butinée par une Abeille.	**5**
Figure I-2	Puceron avec la goutte de Miellat.	**5**
Figure I-3	Cellules operculées et non Operculées.	**6**
Figure I-4	Structure chimique de l'hydroxy-methyl furfural.	**11**
Figure II-1	Aspect morphologique de *Globularia alypum* (A : plan de la plante, B : sommités fleuries).	**20**
Figure III-1	Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution dans un gel d'Agar. A gauche, l'appareil de steers, à droite, résultats obtenus.	**31**
Figure III-2	Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution en volume. A gauche, test en volume macroscopique. A droite, résultats obtenus en plaque à micro-titration photographie.	**32**
Figure III-3	Exemples illustrant des résultats d'antibiogrammes. A gauche, boite carré (16 tests au maximum). A droite, boite ronde (6 tests au maximum).	**33**
Figure III-4	Exemple standard d'un E-test.	**33**
Figure III-5	Photos des différents automates d'antibiogramme et leur support.	**35**
Figure III-6	*Pseudomonas aeruginosa*: *(a)* coloration de Gram (x100), *(b)* Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* Après 72 heures de formation.	**36**
Figure III-7	*Escherichia coli* observée au microscope électronique (Gx10000)	**36**
Figure III-8	Aspect de *Staphylococcus aureus* (*a*) : microscope optique ×100 ; *(b)* : microscopie électronique X 20000).	**37**
Figure IV-1	Photo de miel étudié.	**38**
Figure IV-2	*Globularia alypum*	**38**
Figure IV-3	Souches bactériennes, *P. aeruginosa, E. Coli. ,* S. a*ureus*.	**39**

Figure IV-4	Photos de préparation de la plante *Globularia alypum* ; A-(Feuilles+fleurs) fraiche, B-tiges fraiches, C-tiges sèches, D-tiges après broyage, E-(feuilles+fleurs) après broyage.	**40**
Figure IV-5	Photo du Réfractomètre utilisé; Mesure de l'indice de Réfraction	**44**
Figure IV-6	Photo du Polarimètre utilisé dans l'étude du pouvoir rotatoir du miel.	**45**
Figure IV-7	Schéma expérimentale concernant l'étude envisagé sur la plante et l'association miel-Extraits de la plante.	**49**
Figure V-1	Photo des dilutions de miel préparées à partir d'une solution mère de 200g/l.	**53**
Figure V-2	Variation des diamètres des zones d'inhibition des deux souches obtenues pour le miel dilué à 75% en fonction de la température du traitement.	**55**
Figure V-3	Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75 % aux différentes températures : A- *Staphylococcus aureus ;* B- *Pseudomonas aeruginosa.*	**56**
Figure V-4	Variation des diamètres des zones d'inhibition des deux souches testées en fonction du pH du miel dilué à 75%.	**59**
Figure V- 5	Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75% aux différents pH : A- *Staphylococcus aureus ;* B- *Pseudomonas aeruginosa.*	**59**
Figure V-6	Variation des diamètres des zones d'inhibition totale des souches testées selon les dilutions de miel.	**64**
Figure V-7	Détermination de la CMI du miel pour *Staphylococcus aureus* ATCC : Résultats de deux essais.	**64**

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I-1	Production Algérienne de miel en 2011.	**7**
Tableau I-2	Composition moyenne du miel.	**9**
Tableau I-3	Principaux caractères du miel.	**10**
Tableau I-4	normes de qualité du miel selon Codex Alimentarius et l'Union Européenne.	**14**
Tableau I-5	Teneur en sucre et conductivité électrique: Proposition d'une nouvelle norme.	**15**
Tableau I-6	Composition pondérale moyenne du miel de forêt	**17**
Tableau II-1	Classification et systématique de *Globularia alypum L*	**21**
Tableau II-2	Principes actifs présents dans *Globularia alypum* et leurs intérêt, biologique.	**22**
Tableau IV-1	Matériel utilisé durant la partie expérimentale.	**39**
Tableau V-1	Valeur de la densité d'échantillon de miel	**51**
Tableau V-2	Angles de rotation des dilutions préparées	**53**
Tableau V-3	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition sur les deux souches obtenues pour le miel dilué à 75% et traité à différentes températures.	**55**
Tableau V-4	Variation des diamètres des zones d'inhibition des deux souches testées en fonction du pH du miel dilué à 75%.	**58**
Tableau V-5	Effet des dilutions de miel sur *Staphylococcus aureus*.	**63**
Tableau V-6	Effet des dilutions de miel sur *Escherichia coli*.	**63**
Tableau V-7	Effet des dilutions de miel sur *Pseudomonas aeruginosa*.	**63**

Table des matières

Introduction **1**

Partie bibliographique

CHAPITRE I : Le miel

I.1. Généralités **4**

I.2. Définition **4**

I.3. Origine et formation du miel **4**

I.3.1. Le nectar **5**

I.3.2. Le miellat **5**

I.3.3. Formation du miel **5**

I.4. Les différents types de miel **6**

I.4.1. Selon l'origine florale **6**

I.4.1.1. Les miels mono floraux **6**

I.4.1.2. Les miels poly floraux **7**

I.4.1.2.1. Selon l'Origine géographique **7**

I.5. Le miel Algérien **7**

I.6. Caractéristiques du miel **8**

I.7. Propriétés du miel **11**

I.7.1. Propriétés nutritionnelles **11**

I.7.2. Propriétés thérapeutiques **11**

I.7.2.1. Propriétés anti-diarrhéiques **11**

I.7.2.2. Propriétés cicatrisantes des blessures et anti-inflammatoire **12**

I.7.2.3. Action antianémique **12**

I.7.2.4. Action apéritive et digestive **12**

I.7.2.5. Propriétés antitussives, expectorantes et adoucissantes **12**

I.7.2.6. Action préventive vis à vis des cancers **12**

I.7.2.7. Propriétés antioxydantes **13**

I.7.2.8. Propriétés antimicrobiennes **13**

I.8. La qualité du miel **14**

I.9. Le miel de forêt **16**

CHAPITRE II : Les plantes médicinales (Tassalgha)

II.1. Définition **18**
II.2. La phytothérapie **18**
II.3. Présentation des Globulariaceae **19**
II.3.1. L'espèce *Globularia alypum* ou Tassalgha **20**
II.3.2. Morphologie générale et végétative **20**
II.3.3. Ecologie et habitat **21**
II.3.4. Classification botanique **21**
II.3.5. Principe Actifs majeurs **21**
II.3.6. Période de récolte **22**
II.3.7. Usage **22**
II.3.8. L'activité antibactérienne **23**
II.3.8.1. Les antimicrobiens naturels **23**
II.3.8.2. Composition chimique et Activités biologiques **24**
II.3.9. L'extraction solide-liquide **25**
II.3.9.1. Définition **25**
II.3.9.2. Principe **25**
II.3.9.3. Méthodes d'Extraction Traditionnelles **26**

CHAPITR III: Usage des molécules à effet antimicrobien

III.1. Les antibiotiques **28**
III.2. Pouvoir antibactérien du miel et des plantes **28**
III.3. Tests d'évaluation de l'effet antibactérien **30**
III.3.1. Concentration minimale inhibitrice(CMI) **30**
III.3.2. Méthodes de détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI) **30**
III.3.2.1. Méthodes par dilution **31**
III.3.2.2. Méthodes par diffusion **32**
III.3.2.3. Méthodes automatisées **34**
III.4. Spectre antibactérien **35**
III.4.1. Bactéries à Gram négatifs **35**
III.4.1.1. Genre *Pseudomonas* **35**
III.4.1.2. Genre *Escherichia* **36**
III.4.2. Bactéries à gram positif **37**
III.4.2.1. Genre *Staphylococcus* **37**

Partie expérimentale

CHAPITRE IV: Matériel et méthodes

IV.1. Matériel....**38**
IV.1.1. Matériel biologique....**38**
IV.1.2. Matériel non biologique....**39**
IV.2. Méthodes....**40**
IV.2.1. Préparation de la plante médicinale....**40**
IV.2.2. Analyse physico-chimique du miel....**42**
IV.2.2.1. Mesure de la densité....**42**
IV.2.2.2. Le potentiel d'Hydrogène....**42**
IV.2.2.3. Détermination de conductivité électrique....**43**
IV.2.2.4. Détermination de l'indice de réfraction et de la teneur en eau....**43**
IV.2.2.5. Analyse polarimétrique....**44**
IV.2.2.6. Dosage des sucres réducteurs....**45**
IV.2.3. Etude de l'effet antibactérien du miel....**47**
IV.2.3.1. Effet de la température....**47**
IV.2.3.2. Effet du pH....**47**
IV.2.3.3. Détermination de la concentration Minimale Inhibitrice (CMI)....**48**
IV.2.4. Etude de la plante et de l'association Miel-Extraits de la plante..…….. **49**

CHAPITR V: Résultats et discussion

V.1. Caractérisation physico-chimique du miel....**51**
V.1.1. La densité....**51**
V.1.2. Le pH....**51**
V.1.3. la conductivité électrique....**52**
V.1.4. Indice de réfraction et teneur en eau....**52**
V.1.5. L'analyse polarimétrique....**53**
V.1.6. Dosage des sucres réducteurs....**54**
V.2. Etude de l'effet antibactérien du miel....**54**
V.2.1. Effet de la température....**55**
V.2.2. Effet du pH....**58**
V.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice(CMI)....**62**

Conclusion....**67**

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les infections microbiennes occupent actuellement la première place en pathologie humaine. Connues depuis longtemps, elles (infections nosocomiales, urinaires…) ont progressivement changé de visage mettant la clinique face à une situation d'impasse thérapeutique (Cornaglia et al, 2011).

Les antibiotiques ont été massivement utilisés durant les dernières décennies pour traiter les infections bactériennes chroniques et aiguës (Rémy et al, 2016). En effet, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne (Djaafri et al, 2014).

De nos jours, devant l'essor des médecines naturelles et face à certaines pathologies résistantes aux traitements conventionnels. Le miel et les plantes médicinales seraient des prétendants éventuels pour jouer le rôle d'antibiotiques naturels.

Connu, depuis les temps les plus reculés, le miel est la substance naturelle sucrée, produite par les abeilles mellifiques à partir de nectar et/ou de miellat. C'est l'une des denrées alimentaires les plus appréciées par l'homme en raison de ses saveurs, arômes et vertus énergétiques (Homrani, 2020). La composition du miel varie selon les plantes sur lesquelles l'abeille se nourrit. Cependant, la quasi-totalité des miels naturels présente des caractéristiques médicinales communes (Oskouei *et al.,* 2013). Grace à ses nombreux principes actifs (peroxyde d'hydrogène, lysozyme, pH, acides phénoliques, flavonoïdes etc.…), le miel possède diverses propriétés biologiques dont les plus importantes sont l'activité antibactérienne, antioxydante, anti-inflammatoire, antifongiques, gastro et hépato-protectrices (Anand et al., 2018).

Aujourd'hui, l'apiculture est considérée comme une activité agricole à part entière et le miel est classé comme une production animale, bien qu'il diffère significativement des autres produits d'élevage (Homrani, 2020). L'Algérie est un grand pays, disposant d'un climat favorable à l'éclosion et à l'essaimage des abeilles, mise sur une production de miel de plus en plus importante; avec un objectif d'atteindre les 100 000 tonnes de miel par an en 2015 selon les autorités algériennes. Cependant, la production Algérienne de miel est estimée en moyenne à 33 000 quintaux en 2011 avec un rendement de 4- 8 kg / ruche, ce qui est moins que les besoins de la consommation locale alors qu'il est censé être à l'origine d'un important débouché à l'exportation (Draiaia, 2016). La connaissance des caractéristiques physico-

chimiques des miels est également essentielle pour l'évaluation de sa bonne qualité et de son authenticité (Homrani, 2020).

Aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique a investi dans la recherche des médicaments d'origine végétale. L'étude de la biodiversité des plantes médicinales et les utilisations médicinales traditionnelles des populations autochtones ont constitué un axe prioritaire dans cette recherche (Ghnimi, 2015). Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être 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 (Zeghad, 2009). Actuellement, dans le domaine des anti-infectieux, la recherche des nouvelles substances à partir des plantes attire tous les flashes et constitue une étape substantielle dans le développement de nouveaux médicaments (Majinda et al., 2001) .

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 (Zeghad, 2009).

Globalement, ce travail s'inscrit dans le but de déterminer les caractéristiques physico-chimiques du miel, d'étudier l'effet antimicrobien du miel forêt et les extrait de *Globularia alypum* L, vis-à-vis de trois souches de bactéries pathogènes. Une association « Miel- Extrait de plante » a été envisagée afin de détecter l'effet synergie des deux composants. Cette expérimentation ouvre une perspective intéressante dans le domaine médical qui suggère l'utilisation du miel et de la plante médicinale comme des alternatives aux antibiotiques.

La première partie est consacrée à la revue bibliographique qui comporte trois chapitres et traite successivement des notions générales du miel, des plantes médicinales ainsi les différentes méthodes utilisés pour l'évaluation de leurs activité antibactériennes.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale qui s'intéresse à :

- ✓ Une Analyse physico-chimique du miel de forêt (Densité, pH, conductivité électrique, teneur en eau, polarité et teneur en sucre réducteur).
- ✓ Une étude de l'effet du pH et de la température sur l'activité antibactérienne du miel afin de détecter leur mécanisme et leurs conditions optimales d'action.
- ✓ Une évaluation du pouvoir antibactérien du miel en utilisant la méthode de diffusion sur gélose afin de déterminer leur concentration minimale inhibitrice dans les conditions optimales de pH et de Température.

Une partie est particulièrement ajoutée sous forme d'organigrammes afin d'expliquer le reste du schéma expérimentale concernant l'étude envisagé sur la plante et l'association miel-plante. Il faut rappeler que cette partie n'a pas été réalisée à cause de la Pandémie COVID-19.

Nous terminons avec une conclusion générale et perspective jugées utiles pour cerner ce travail.

Chapitre I :

Le miel

I.1. Généralités

Les produits de la ruche ont toujours fasciné l'homme (Henri, 2010) y compris le miel qui constitue un aliment connu depuis la nuit des temps. Les usages qu'en faisaient les anciens étaient très variés. En effet, si en Egypte il était considéré comme source d'immortalité et servait à conserver la dépouille du pharaon, à Babylone il était employé en ophtalmologie ainsi qu'en thérapie des pathologies auditives alors qu'en Afrique il jouait un grand rôle dans l'alimentation et constituait un élément fondamental dans les pharmacopées destinées au soin des brûlures, des morsures de serpent mais aussi les plaies infectées (Huchet *et al.,*1996). Cette substance est également retrouvée dans certains textes de la Bible et du Coran qui le présentent comme un des symboles de la prospérité et de l'abondance (Blanc, 2010). Des textes égyptiens vieux de plus de 2000 ans ou encore chinois faisaient mention de ses propriétés médicinales (soin des blessures, affections du tube digestif, des reins, cicatrisant,…). Hippocrate et d'autres médecins de l'époque (vers 400 avant Jésus -Christ) le recommandaient dans certaines pathologies comme fortifiant de la vue et des organes sexuels mais aussi dans le traitement de la toux, des plaies et des angines. En somme au fur et à mesure des différentes époques traversées, le miel a fait l'objet de plus de 2000 références bibliographiques, prouvant ainsi sa grande valeur thérapeutique (Blanc, 2010).

I.2. Définition

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles « *Apis mellifera* » à partir du nectar, de sécrétions de plantes ou d'excrétions d'insectes butineurs, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec les substances spécifiques qu'elles sécrètent, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche (Oudjet, 2012). Suivant le type de plante, le miel peut différer par sa composition en glucose, fructose, disaccharide et saccharose. De plus, d'autres éléments du nectar vont donner au miel sa couleur et son goût unique: les vitamines, les pigments, les arômes (Arnaudon, 2011).

I.3. Origine et formation du miel

Il existe deux variétés de miel selon l'origine sécrétoire : le miel de nectar et le miel de miellat.

I.3.1. Le nectar

Le nectar est un liquide sucré sécrété par les nectaires, il présente une composition complexe mais variable selon les espèces, et différente de celle de la sève. On y trouve de l'eau, des sucres, des substances aromatiques et colorantes, des acides, des enzymes, des minéraux ainsi que quelques substances diverses et rares comme des vitamines ou des protéines. La qualité et la composition du nectar influencent donc les propriétés du miel, par exemple au niveau des arômes, des sucres [(Philipe, 1991); (Bessas, 2008) ; (Lequet, 2010)].

I.3.2. Le miellat

Certaines espèces d'insectes sont capables de prélever la sève élaborée dans les canaux où elle circule (phloème) à l'aide de pièce buccale piqueuse [(Rossant, 2011) ; (Koechler, 2015)]. La sève subie des transformations dans le système digestif de l'insecte, notamment sous l'action de microorganismes qui y vivent en symbiose, puis elle est rejetée sous forme d'excréments liquides et sucrés, le miellat. Les abeilles le récoltent directement sur les insectes ou sur la végétation (Guerriat, 2000).

I.3.3. Formation du miel

L'abeille transporte dans son jabot les matières premières liquides sucrées qu'elle aspire avec sa trompe. Le nectar aspiré par l'abeille ou le miellat excrété par les pucerons des arbres sont mélangée aux sécrétions salivaires contenant différents enzymes responsables de modifications importantes du spectre des sucres.



Figure I-1 : Fleur butinée par une Abeille



Figure I-2 : Puceron avec la goutte de Miellat (Nicolay, 2014)

Le nectar circule alors très vite d'une abeille à l'autre. Dans un premier temps, les abeilles évaporent l'eau du nectar en refoulant une goutte et en l'étalant sous la trompe, de manière répétitive ; la concentration en sucre augmente. Lorsque la teneur en eau est tombée à 40-50% ; le nectar est déposé dans les cellules où l'évaporation de l'eau se poursuit sous la

double influence : de la chaleur et la ventilation des abeilles ventileuses [Guerriat, 2000 ;Mazrou, 2008]. Quand le miel est mué, c'est-à-dire suffisamment concentré en sucre et la teneur en eau ne dépasse pas 21% (Codex Alimentarius), les abeilles ferment les cellules d'un couvercle de cire (operculation). Finalement, Le travail de l'apiculteur est de récolter le miel quand la majorité des alvéoles sont operculées, à cette étape, il désopercule les cadres et extrait le miel. Il le filtre puis le conditionne (Nicolay, 2014).



Figure I-3 : Cellules operculées et non Operculées (Nicolay, 2014).

I.4. Les différents types de miel : Le miel est classé en fonction de plusieurs critères.

I.4.1. Selon l'origine florale

L'origine florale d'un miel est importante car elle détermine les propriétés organoleptiques de celui-ci (couleur, goût, texture). Par exemple, le miel de colza est plutôt de couleur claire (jaune très pâle, voire blanc) et a tendance à cristalliser très rapidement (Élodie, 2013).

I.4.1.1. Les miels mono floraux

Sont élaborés à partir d'une seule espèce végétale, qu'il s'agisse de miel de nectar ou de miellat. Pour l'obtention d'un miel mono floral (Composé de 80% d'une même espèce végétale), il faut placer la ruche près de l'espèce végétale considéré au cours de sa floraison et la récolte doit avoir lieu dès la fin de la miellée (Élodie, 2013). Les miels mono floraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques (Moussaoui, 2011).

I.4.1.2. Les miels poly floraux

Ces miels sont élaborés à partir du nectar et/ou du miellat provenant de plusieurs espèces végétales. Pour valoriser leur spécificité et permettre au consommateur de reconnaître leur caractère dominant, les apiculteurs indiquent leur origine géographique. Celle-ci indique soit aire de production, région, département, massif (Chouia, 2014).

I.4.1.2.1. Selon l'Origine géographique

Certains miels polyfloraux ont acquis une réputation particulière qui est liée à leur origine géographique, qu'il s'agisse d'une petite région, d'une province d'un continent. Par contre, il n'est pas impossible qu'une origine florale soit associée avec une région (Chouia, 2014).

I.5. Le miel algérien

Le miel algérien répond aux normes internationales, car il est naturel n'ayant subi aucun traitement technologique qui pourra nuire à sa qualité. L'Algérie importe de grandes quantités de miel de différent pays tel que : l'Arabie saoudite, la chine ou encore l'inde, suite à une production locale très faible malgré la grande potentialité mellifères dont dispose ce pays (Oudjet, 2012). En effet, l'apiculture est prédominante dans :

- La zone du littoral (miel d'agrumes et eucalyptus).
- La zone de montagne (Kabylie : miel de toutes fleurs, lavande, carotte sauvage et bruyère).
-Les hauts plateaux : miel de sainfoin, romarin et jujubier, maquis et forets : miel toutes fleurs et miellat **(tableau I-1).**

Tableau I-1 : Production Algérienne de miel en 2011 (Fao stat, 2011).

Region	Production (kg/an)
Seddouk	19546.2
Bejaia	12950
Amizour	11260
Tazmalt	10611.4
Sisi-aich	9998
Aokas	9938.2
EL-Kseur	8656.4
Akbou	8445

I.6. Caractéristiques du miel

Le miel est une substance complexe dont la composition varie d'un échantillon à l'autre en fonction de nombreux facteurs tels que :

L'origine florale.

Les conditions météorologiques.

La nature du sol [(Guerriat, 2000) ; (Makhloufi, 2010)].

Dans ce mélange hybride (d'origine végétale et animale), plus de 200 substances ont été identifiées jusqu'à présent participant à l'équilibre de notre organisme (Ali Raeessi et *al*., 2013). Le tableau 2 donne la composition moyenne du miel.

-les substances indiquées entre parenthèses sont à l'état de traces ; les pourcentages sont donnés par rapport au poids total du miel **(Tableau I-2).** Les principaux caractères du miel sont résumés dans le **Tableau I-3.**

Tableau I-2: Composition moyenne du miel
[(Olaitan et *al*., 2007); (Abousseddik, 2008); (Bogdanov et *al*., 2008); (Jessica,2015)].

Composition	Pourcentage total	Types de composés	Principaux composants
Hydrates de carbone	75 à 80%	Monosaccharides	Fructose (38%), glucose (31%).
		Disaccharides	Maltose (7, 3%), isomaltose, saccharose (1, 3%).
		Polysaccharides (1,5 à 8%)	Erlose, Raffinose, dextantriose, mélézitose, Kojibiose, mélibiose
Eau	15 à 20% (moyenne 17%)	---	---
Substances diverses	1 à 5% (Moyenne 3, 5%)	Acides organiques (0,1 à 0,5%)	Acide citrique, acétique, phosphorique, gluconique (0,1 à 4%), lactique, fumarique, maléique,oxalique, pyroglutamique, succinique
		Protéines, peptides et acides aminées (0,2 à 2%)	Matières albuminoïdes, matières azotées, la defensine-1(aspartique, glutamique, alanine, arginine, asparagine, cystine, glycine, histidine, Isoleucine, leucine lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, tryptophane, tyrosine et valine).
		Les vitamines	B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8 ou H, B9 et C
		Enzymes provenant des glandes hypopharyngiennes	Amylase α et β, gluco-invertase, glucose-oxydase
		Enzymes provenant du nectar	catalase, amylase, phosphatase acides
		Minéraux	Mg, Mn, K, Ca, Na, Fe, Cu, Se, S, Cl, Zn, Co, B, Ci, Cr, Ni, Au, Ag, Ba, P, Cs
		Neurotransmetteur	Acétylcholine,...
Aromes		Aldehydes et Cétones	Formaldéhyde, acétaldéhyde...
		Esters	Méthyléthylcétone, méthylantranylate, acétates
		Alcools	Ethanol, méthanol, isobutanol, 2 phényléthanol.
Lipides		Acides gras	acide palmitique, oléique et linoléique, butyrique, caprique
Pigments		Caroténoïdes et flavonoïdes	Lutéoline, méthylflavonol, catéchine, chrysine....

Tableau I-3 : Principaux caractères du miel.

Caractère	Description	Référence
Couleur	Elle va du jaune très pâle (presque blanc) au brun très foncé (presque noir) en passant par toute la gamme des jaunes, oranges, marrons et même parfois des verts ; mais le plus souvent le miel est blond.	(Donadieu, 2008)
Goût	Le miel foncé a généralement un goût plus prononcé et sa teneur en sels minéraux est élevée ; le miel clair a une saveur plus délicate.	(Chouia, 2014)
Arôme	les méthodes de chromatographies ont permis d'isoler plus de cinquante substances aromatiques.	(Domerego et al., 2007)
Texture	Le Miel peut être liquide, crémeux, visqueux ou même granuleux.	(François ,2017)
pH	Le miel est acide : son pH varie de 3,2 à 5,5.	(Marcet, 2017)
Densité	La moyenne retenue s'élève à 1,42 kg par litre	(Guerriat, 2000)
Viscosité	Le miel est un corps plus ou moins visqueux, notamment au dessous de 20 c°, peut devenir fluide dès qu'il atteint 30 à 35 c°.	(ITA et OIDA, 2004)
Cristallisation	Les miels à cristallisation rapide se cristallisent le plus souvent très finement, alors que les miels à cristallisation lente ont tendance à avoir une cristallisation grossière.	(Bogdanov et al., 2003)
Hygroscopie	Les miels est hygroscopique ; si on laisse au contacte de l'air ambiant, il peut atteindre une hygrométrie de 55 % en 3 mois et la fermentation est inéluctable.	(Maglon et Vanwijck, 2003)
Taux d'HMF(*)	La teneur en « HMF » doit être en général inférieure à 40 mg/kg.	(Cetam, 2010)
Fluorescence	Beaucoup de miels présentent une fluorescence avec des couleurs variables. Cette caractéristique est plus ou moins importante suivant les types de miel et est sous l'action des rayonnements ultraviolets.	(Nair, 2014)

(*) HMF : L'hydroxy-Méthyl Furfural (HMF) est un dérivé de la déshydratation des sucres simples en l'occurrence le fructose. Ce composé constitue un très bon indice de la qualité du miel. En effet, plus la teneur en HMF est faible, plus la qualité de miel s'affirme (qualité médiocre : HMF> 40mg/Kg). La formation d'HMF est due principalement à plusieurs facteurs entre autres : le stockage et l'entreposage prolongés, le chauffage excessif (au-delà de 40°C) qui décompose partiellement les sucres et le vieillissement naturel du miel (Oudjet, 2012).

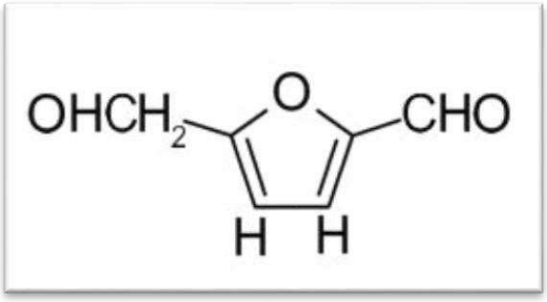


Figure I-4: Structure chimique de l'hydroxy-methyl furfural (Sanborn et Howard, 2012).

I.7. Propriétés du miel

I.7.1. Propriétés nutritionnelles

Le miel est essentiellement contient des glucides, des protéines, des lipides, des enzymes et des vitamines. C'est un aliment sain, léger, naturel et riche en calories. Son apport énergétique est un peu moins important que celui du sucre (316 kcals pour 100 g contre 400 kcals pour 100 g). C'est une alternative au sucre de table convenant aux personnes portant une attention particulière à leurs apports énergétiques (Velghe, 2016). Les quantités quotidiennes que l'on conseille d'absorber sont, en général, de 1 à 2g de miel par kilogramme de poids (pour une personne pesant 60 kg : 60 à 120 g de miel) (Bazoche, 2011).

I.7.2. Propriétés thérapeutiques

I.7.2.1. Propriétés anti-diarrhéiques

A une concentration de 40%, le miel a un effet bactéricide sur différentes bactéries de l'intestin souvent associées à la diarrhée et la dysenterie comme *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli enteropathogène* et *Vibrio cholera*. Une étude a montré que le miel donné avec un liquide de réhydratation aux enfants réduit la durée de la diarrhée bactérienne (Lina et *al*., 2011).

I.7.2.2 Propriétés cicatrisantes des blessures et anti-inflammatoire

Au contact d'une plaie, le miel réalise une barrière physique et contribue à maintenir un milieu humide du fait de sa teneur en eau. De plus, du fait de son hyperosmolarité au niveau des plaies, il absorbe les exsudats et favorise la diminution de l'oedème lésionnel, améliorant ainsi indirectement la microcirculation locale. L'eau oxygénée, outre ses propriétés antiseptiques, joue un rôle très important dans les processus de cicatrisation. En effet, au contact des tissus et du sang, elle se décompose en eau et en oxygène créant une " micro effervescence" et un nettoyage mécanique de la plaie (Couquet., 2013).

L'action anti-inflammatoire du miel joue un rôle thérapeutique important, l'inflammation peut devenir délétère et empêcher la guérison lorsqu'elle est excessive et prolongée, surtout avec la production de radicaux libres dans les tissus. Même si les antioxydants n'agissent pas directement sur l'inflammation, ils éliminent les radicaux libres et évitent leurs effets néfastes (Balas, 2015).

I.7.2.3. Action antianémique

Cette action serait en relation avec la présence de fer et de cobalt dans le miel. Le cobalt est un composant normal de la vitamine B12 qui intervient dans l'organisme lors de la biosynthèse de nombreuses substances et dans différents mécanismes, notamment comme activateur de l'hématopoïèse (Maameri, 2014).

I.7.2.4. Action apéritive et digestive

Les acides présents dans le miel influencent favorablement l'appétit et la digestion (Maameri, 2014).

I.7.2.5. Propriétés antitussives, expectorantes et adoucissantes

En effet, le miel calme la toux, facilite l'expectoration, et soulage les maux de gorge (Maameri, 2014).

I.7.2.6. Action préventive vis à vis des cancers

Le risque de cancers est accru dans une population qui présente un déficit en vitamines, en oligo-éléments et en certains nutriments indispensables au métabolisme cellulaire et à la production d'enzymes et d'hormones. Ces nutriments qui ont une action inhibitrice sur le processus cancérigène se trouvent pour la plupart dans le miel. On peut notamment citer les flavonoïdes, qui ont la capacité de ralentir le processus d'évolution des tumeurs (Maameri, 2014).

I.7.2.7. Propriétés antioxydantes

Le mécanisme protecteur antioxydant du miel utilise à la fois les enzymes tels que la catalase et la peroxydase, les composants phénoliques, les flavonoïdes, les acides organiques comme l'acide ascorbique et des acides aminés comme la proline .Toutefois, les composés phénoliques sont les plus importants dans cette activité. Les miels foncés et les miels ayant une forte teneur en eau ont une capacité antioxydante plus grande que celle des autres miels. De plus, l'activité antioxydante des miels est très variable d'un miel à un autre, et elle dépend essentiellement de son origine botanique (Maameri, 2014).

I.7.2.8. Propriétés antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne du miel a été exploitée par l'homme depuis des siècles pour traiter les plaies infectées .Des résultats montrent que le miel possédait un effet bactériostatique sur 60 espèces de bactéries avec un large spectre d'action contre les bactéries gram-positif et négatif (Katrina, Calvin, 2014). Le miel du fait de son osmolarité conséquente et de sa forte teneur en sucre crée un appauvrissement de l'eau disponible pour les bactéries mettant en péril leur vie. Par sa viscosité, le miel forme une barrière protectrices sur les plais qui prévient ainsi la formation du biofilm (agrégat complexe de nombreuses espèces bactériennes). Par son acidité il permet l'inhibition de nombreux pathogènes (Lavoine, 2012). Cependant, même dilués les miels restent actifs face aux bactéries. Ceci est dû à la production de peroxyde d'hydrogène en présence d'eau grâce à l'activation d'un glucose-oxydase. Cette enzyme a pour rôle d'oxyder le glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est alors le composant principal responsable de l'activité antibactérienne du miel (Irlande, 2010). Le miel peut également contenir des substances antimicrobiennes telles que la défensine-1 et le méthylglyoxal (Desmoulière, 2013). Le miel a été signalé aussi avoir des effets inhibiteurs sur les champignons. En plus des effets antibactériens et antifongiques, le miel naturel a montré un effet antiviral notamment contre le virus de la rubéole (Al-waili et al., 2011) et aussi un effet anti parasitaire également contre la leishmaniose et l'echinococcus (Balas ,2015).

I.8. La qualité du miel

Un miel de qualité doit être un produit sain, extrait sous de bonnes conditions d'hygiène et correctement conditionné, peut conserver toutes ses propriétés d'origine pendant une longue durée. Il ne doit pas être adultéré et doit contenir le moins possible (peut on encore dire pas du tout) de polluants divers (antibiotiques, pesticides, métaux lourds…) ou autres produits émergeants de notre environnement industrialisé (Amri, 2011).

En Europe les critères de qualité du miel figurent dans une directive européenne et dans les normes du Codex Alimentarius (tableau I-4) (Bogdanov ,1999), de nouveaux critères de qualité tels que la teneur en sucres spécifiques et la conductivité électrique sont pris en considération (**Tableau I-5**).Les taches futures de la commission internationale du miel consisteront à rassembler et à harmoniser les méthodes et les critères pour la caractérisation des miels monofloraux (Amri, 2006).

En Algérie, devant l'absence de loi concernant ce produit alimentaire la définition du Codex Alimentarius est appliquée.

Tableau I-4 : Normes de qualité du miel selon Codex Alimentarius et l'Union Européenne (Bogdanov ,1999).

Critères de qualité	Projet du Codex-	Projet de l'UE
Teneur en eau		
Général	≤ 21 g/100g	≤ 21 g/100g
Miel de bruyère, de trèfle	≤ 23 g/100g	≤ 23 g/100g
Miel industriel ou miel de pâtisserie	≤ 25 g/100g	≤ 25 g/100g
Teneur en sucres réducteurs		
Miels qui ne sont pas mentionnés ci-dessous	≥ 65 g /100 g	≥ 65 g /100 g
Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar	≥ 45 g /100 g	≥ 60 g /100 g
Xanthorrhoea pr.	≥ 53 g /100 g	≥ 53 g /100 g
Teneur en saccharose apparent	≤ 5 g/100 g	≤ 5 g/100 g
Miels qui ne sont pas mentionnés ci-dessous		
*Robini, Lavandula, Hedysarum, Trifolium, Zitrus,Medicago, Eucalyptus cam., Eucryphia luc. Banksia menz.**	≤ 10 g/100 g	≤ 10 g/100 g
Calothamnus san., Eucalyptus scab., Banksia gr.,Xanthorrhoea pr. Miel de miellat et mélanges de miel de miellat et de nectar	≤ 15 g/100 g	
Teneur en matières insolubles dans l'eau		
Général	≤ 0,1 g/100 g	≤ 0,1 g/100 g
Miel pressé	≤ 0,5 g/100 g	≤ 0,5 g/100 g

Teneur en matières minérales (cendres) Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar, miel de châtaignier	≤ 0,6 g/100 g ≤ 1,2 g/100 g	≤ 0,6 g/100 g ≤ 1,2 g/100 g
Acidité	≤ 50 meq/kg	≤ 40 meq/kg
Activité diastasique, (indice diastasique en unités de Schade) Après traitement et mise en pot (Codex) Tous les miels du commerce (UE) Général Miels avec une teneur enzymatique naturellement faible	 ≥ 8 ≥ 3	 ≥ 8 ≥ 3
Teneur en hydroxyméthylfurfural Après traitement et mise en pot (Codex) Tous les miels du commerce (UE)	≤ 60 mg/kg	≤ 40 mg/kg

Tableau I-5 : Teneur en sucre et conductivité électrique: Proposition d'une nouvelle norme (Bogdanov et al., 2001).

Nouveaux critères de qualité proposés	Valeur proposée
Teneur en sucre Somme du fructose et du glucose Miel de nectar Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar *Saccharose* Miels qui ne sont pas énumérés ci-dessous *Banksia, Zitrus, Hedysarum, Medicago, Robinia, Rosmarinus* *Lavandula*	 ≥ 60 g / 100 g ≥ 45 g / 100 g ≤ 5 g/ 100 g ≤ 10 g/ 100 g ≤ 15 g/ 100 g
Conductivité électrique Miel de nectar à l'exception des miels énumérés ci-dessous et des mélanges de ceux-ci; mélanges de miel de miellat et de nectar. Miel de miellat et de châtaignier, à l'exception des miels énumérés ci dessous et des mélanges de ceux-ci. Exceptions: *Banksia, Erika, Eucalyptus, Eucryphia, Leptospermum, Melaleuca, Tilia.*	 ≤ 0,8 mS/cm ≥ 0,8 mS/cm

I.9. Le miel de forêt

Le miel de foret figure parmi les produits forestiers d'importance. Il résulte d'un mélange de nectars et de miellats provenant de l'épilobe, de la ronce, des bruyères, du lierre, du chêne, du hêtre, du tilleul et de divers conifères (Clément, 2011).

Le miel de forêt extrait est toujours foncé, il peut aller jusqu'à des teints sombres proches du noir à l'état liquide. Son gout fort prononcé et son aspect résineux ne convient pas à tous mais plait aux amateurs éclairés, conquis par ses arrière-gouts de caramel et de réglisse. Les miels de forêt diffèrent entre eux par leur texture et leurs propriétés organoleptiques, bien qu'ayant la même appellation. La récolte de ce miel se fait dans toutes les forêts du territoire. Elle dépend des périodes de floraison des essences butinées. Ce produit est un bon diurétique et un excellent antiseptique des voies respiratoires. Dynamogénique, il donne du tonus. (http://www.desgoutsetdescouleurs.com/le-miel-de-forêt/).

Plusieurs études ont révélé la richesse du miel de forêt par les composés phénoliques. En effet, des chercheurs slovènes ont trouvé une teneur de 24,14 mg/100 g (Gheldof et Engeseth, 2002) .Alors qu'une autre étude italienne **(**Schramm, Karim, Schrader et al., 2000) a montré un pourcentage des polyphénols compris entre 3 mg/100 g à 17,5 mg/100 g. Cette différence en composés phénoliques peut s'expliquer par la différence botanique et géographique des échantillons étudiés. Ce miel possède également quelques notes de miellat qui en enrichisse sa composition en sucres complexes et en oligo-éléments (potassium, phosphore, calcium, soufre, magnésium….). (http://www.miel-du-rucher.fr/produit/miel-de-foret-1kg/).

Tableau I-6: Composition pondérale moyenne du miel de forêt, (Bogdanov et al., 2006).

	Composition (g/100g de miel)	
	Moyenne	**Min-Max**
Eau	16,3	15-20
Monosaccharides		
Fructose	31,8	28-40
Glucose	26,1	19-32
Disaccharides		
Saccharose	0,5	0,1-4,7
Autres disaccharides	4,0	1-6
Trisaccharides		
Mélézitose	4,0	0,3-22,0
Erlose	1,0	0,1-6
Autres trisaccharides	3,0	0,1-6
Polysaccharides non déterminés	10,1	
Total des sucres	80,5	
Sels minéraux	0,9	0,6-2
Acides aminés, protéines	0,6	0,4-0,7
Acides	1,1	0,8-1,5

Le miel de forêt augmente le taux d'hémoglobine dans le sang, soutient le cœur et renforce les vaisseaux. Très bon anti inflammatoire, il est indiqué dans les suites d'opérations graves mais aussi pour les femmes enceintes pendant toute la grossesse. Soutient également le système urinaire (Dancy, 2015).

Chapitre II :

Les plantes médicinales

II.1. Définition

Une plante médicinale est une plante dont les organes (les feuilles l'écorce ou Fruits…etc.) Possèdent des vertus curatives et parfois toxiques selon son dosage (Messaudi, 2008). Donc on appelle une plante médicinale toute plante ayant des propriétés thérapeutiques et mentionnée selon le code de la santé publique la pharmacopée les considère comme médicaments, leur vente est le monopole des pharmaciens et des herboristes. Actuellement grâce aux progrès scientifiques, la thérapeutique a beaucoup évolué et a utilisé la plante comme matière première pour la production de médicaments (Chevallier, 2001). Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs dont certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes (Chaabi, 2008).

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies dans les pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires, utilisant la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées comme médicaments. Plus de 80 % des populations africaine ont recours à la médicine et à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé, le continent Africain regroupe des plantes médicinales très diversifiées. En effet sur les 300.000 espèces végétales recensées sur la planète, plus de 200.000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales. Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement en l'absence d'un système médicinale moderne (Salhi et *al,* 2010).

II.2. La phytothérapie

Le terme phytothérapie provient du grec, il est composé de deux mots : « Phyto » signifiant plante et « thérapie » signifiant traitement. L'association des deux mots signifie donc traitement par les plantes (Baba aissa, 2000).

La phytothérapie est la science des plantes médicinales ou la médication par les plantes, c'est l'une des sources de traitement des maladies qui demeurent basé sur l'observation ou l'analyse vient confirmer ce qu'on observe depuis déjà des millénaires (Beloud, 2001 ; Provost, 1991). Elle désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels (Sebai et Boudali, 2012).On peut la distinguer en trois types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement.

Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

- Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs dans les plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou de phytomédicaments, et selon la réglementation en vigueur dans le pays, leur circulation est soumise à l'autorisation de mise sur le marché pour les produits finis, et à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP) pour les préparations magistrales de plantes médicinales, celles-ci étant délivrées exclusivement en officine. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.
- Une pratique de prophylaxie déjà utilisée dans l'antiquité. Nous sommes tous phytothérapeutes sans le savoir : c'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage de la ciboulette, de l'ail, du thym, du gingembre ou simplement du thé vert ... Une alimentation équilibrée et contenant certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique (Sebai et Boudali, 2012).

II.3. Présentation des Globulariaceae

La famille des Globulariaceae regroupe des plantes dicotylédones. Elle comprend 30 espèces réparties en deux (02) genres (Globularia et Poskea). Ce sont de petites plantes herbacées à feuilles simples, alternées, à fleurs en têtes rondes, des régions tempérées et subtropicales (Gaussen et *al*, 1982 ; Quzel et *al*, 1963).

Le genre Globularia (famille Plantaginaceae ou Globulariaceae) comprend des herbes, arbustes, communs dans les régions méditerranéennes, Europe et Afrique du Nord (Tunisie, Maroc, Libye et Algérie) et appartient à un groupe utile de plantes aromatiques et médicales (Boulos, 1983). Ils représentent une riche source de différents composés bioactifs tels que les polyphénols (Khantouche et *al*, 2015), les flavonoïdes (Chograni et *al*, 2012 ; Bouti et *al,* 2008) les iridoïdes glycosides (Amissis-Ouchemoukh et *al*, 2014 ; Es-Safi et *al,* 2006) et *la* globularine (Merghach et *al*, 2013). Il comprend une espèce en Algérie, *Globularia alypum L* (la marguerite du globe) qui est connue localement sous le nom de Tasselgha (Beniston, 1984) ou Ain Larnab (Hammiche et *al*, 2013).

II.3.1. L'espèce *Globularia alypum* ou Tassalgha

Genre : *Globularia*

Espèce : a*lypum*

Synonyms: (Boullard, 2001. Joachim, 2004)

Globularia alypa St. Lag.

Globularia turbith Wilk

Globularia virgata salisb

Nom en Français : Globulaire, séné, turbith, Herbe terrible, Petit globe, marguerite bleue.

Nom en Anglais : Globe Daisy.

Nom en arabe : Tasselgha, Sana el-baladi, Ainoun.

Nom commun : Ain larnab, Cheba, Zerga, Hallab rwa, (Boullard, 2001, Joachim, 2004) Chelr'a, zeriga, zouitna, alk, haselra, oulbarda (Chograni *et al*., 2011).

II.3.2. Morphologie générale et végétative

L'appareil végétatif c'est un arbrisseau très ramifié, d'une hauteur allant de 30 cm à 60 cm, tiges brun rouge striées, feuilles persistantes très nombreuses, coriaces et glabres, alternes, lancéolées et généralement spatulées et mucronées (terminées par une pointe) (Dellile, 2007).

L'inflorescence est assimilable à un capitule, entourée de bractées brunâtres imbriquées formant une collerette, portée par un court pédoncule naissant à l'aisselle des feuilles supérieures (Geoff et al, 2006).



A



B

Figure II-1 : Aspect morphologique de *Globularia alypum* (A : plan de la plante, B : sommités fleuries). (http://online.marburg.de/biologie/botex/mallorca05/bildgross/Globularia_alypum.jp).

II.3.3. Ecologie et habitat

Globularia alypum L, est une plante vivace qui pousse dans les lieux rocailleux et broussailleux secs, de préférence sur calcaire, parfois aussi dans les maquis. On trouve fréquemment des buissons poussant sur de gros rochers isolés ou sur les falaises.

Cette plante est distribuée pratiquement sur tout le pourtour méditerranéen, surtout à l'ouest du bassin, En Algérie, la globulaire se trouve dans l'atlas saharien, et dans le Hoggar en altitude, dans les garrigues, et les forets (Dellile, 2007).

II.3.4. Classification botanique

La classification de la plante « *Globularia alypum L* » dans la systématique, selon (bock, 2009) est donnée dans **le Tableau II-1.**

Tableau II-1: Classification et systématique de *Globularia alypum L*

Règne	**plante**
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Mgnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Scrophulariales
Famille	Globulariaceae
Genre	Globularia
Espèce	*Globularia alypum*

II.3.5. Principe Actifs majeurs

L'étude de la composition chimique de la plante *Globularia alypum L* a été réalisée dans un but de découvrir les principaux produits naturels responsables des activités thérapeutiques. Plusieurs métabolites secondaires ont été mis en évidence :

Tableau II-2 : Principes actifs présent dans *Globularia alypum* et leurs intérêt biologique.

biomolécule	Référence	Intérêt biologique	Référence
polyphénols	(Khlifi *et al*, 2011)	anti-oxydantes, le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau antibactérienne.	(Halliwell, 1994 Menaa *et al*, 2014 Ferrazzano *et al* 2011).
flavonoïdes	(Khlifi *et al*, 2011)	Anti-tumorale, anti-carcinogène anti-inflammatoire antioxydante, antiallergique antiulcéreuse, antivirale antimicrobienne, hypotenseur diurétique.	(Kebbab, 2014).
anthocyanes	(Ben Hassine et *al*., 1982)	Protectrices capillaro-veineux antioxydant.	(Kebbab, 2014).
tanins	(Chograni *et al*, 2011)	Effet stabilisant sur le collagène antioxydant, anti-diarrhéique effet antiseptique, effet vasoconstricteur.	(Kebbab, 2014).
irridoïdes	(Es-safi *et al,* 2006).	anti allergiques antimicrobiennes, antitumorales Immunostimulantes, diurétique purgative, et cholérétique antioxydantes.	(brandao et *al*, 1997 Baruah et *al*, 1998 Mathad et *al*, 1998 Zhou et *al*, 2007 Suzuki et *al*, 1969 Inoue et *al*, 1984 Takeda et *al* 1980 Toda et *al*, 1985).

II.3.6. Période de récolte

Les feuilles et les fleurs de *Globularia alypum L* peuvent être récoltées pendant toute l'année, surtout durant l'inflorescence, (Octobre/ Avril) (Djerroumi et Nacef, 2004).

II.3.7. Usage

Les pharmacopées traditionnelles algériennes, utilisent les feuilles de la globulaire comme purgatif, cholagogue, stimulant, antiseptique, antimycosique, cicatrisant (Dellile, 2007), et aussi pour traiter la coqueluche (Mhanech , 2002). C'est l'un des remèdes végétaux les plus utilisés dans la médecine traditionnelle algérienne dans le traitement d'un grand nombre de maladies (hypertension, troubles cardiaques, coliques néphrétiques et diverses lésions cancéreuses), estomac, lithiase urinaire, rhumatismes, goutte, fièvre typhoïde, et fièvre intermittente (Skim et *al*, 1999 ; Jouad et *al*, 2002), côlon, foie, œsophage et diabète(Boussoualim et *al*, 2016).

Les pharmacopées méridionales utilisent *Globularia alypum* sous le nom de « séné de Provence » en infusion pour ses vertus astringentes, dépuratives et purgative. Prescrite pour traiter l'arthrite et les crises de goutte, elle est mâchée pour calmer les maux de dents (Schaneberg, Paris, 2011). Les troubles du transit intestinal constituent l'indication majeure sur tout le pourtour méditerranéen. C'est la décoction des parties aériennes ou des feuilles seules, qui est laxative (Prescrire n° 286.8).

Au Maroc, la plante est signalée comme dépurative (remède des furoncles), antiarthritique et purgative (Baba Aissa, 2000). Elle est utilisée aussi comme un agent hypoglycémique, laxatif, cholagogue, purgative, sudorifique, dans les maladies cardiovasculaire, les maladies d'estomac, les infections rénales et la leucémie(Es Safi et al, 2005). En Tunisie, elle est utilisée contre les ulcères (Baba Aissa, 2000).

Les études montrent que la Globulaire est indiquée comme purgative, sudorifique, dépurative, antiseptique, antimycosique, cicatrisante, astringente et diurétique (Bellakhdar et *al,* 1991 ; Fehri et Aiache, 2010).

Des études bibliographiques confirment que les espèces du genre Globularia présentent des activités : anti-tuberculose, cytotoxiques, antioxydants et antidiabétique (Skim *et al,* 1999; Jouad et *al,* 2002 ; Es-safi et *al,* 2006)), et activité anti-inflammatoire. *Globularia alypum* pourrait être également employée comme inhibiteur de la maladie d'Alzheimer (khalifi, 2016), et aussi pour le traitement des maladies rénales (Jouad et *al,* 2002*)*.

II.3.8. L'activité antibactérienne

II.3.8.1. Les antimicrobiens naturels

- **Les polyphénols**

Les phénols simples et acide phénolique : sont les molécules, bioactives issues du métabolisme secondaire des plantes, les plus simples. Ces substances montrent, en effet, une importante toxicité envers les microorganismes par la modification des propriétés physiques en s'intercalant dans la bicouche membranaire (Taylor, 2013). Les sites et le nombre des groupements hydroxyles (-OH) sur les phénols, seraient en relation avec cette toxicité. Cet effet antimicrobien augmente avec le nombre des groupements -OH. Certaines enzymes peuvent être inhibées via des réactions avec leurs groupements sulfhydriles ou par des interactions non spécifiques avec ces dernières (Cowan, 1999 ; Pistelli et Giorgi, 2012).

Les quinones : sont des substances extrêmement réactives, très répandues dans la nature et possèdent des cycles aromatiques avec des groupements cétones. Les protéines d'adhésion

de surface, les polypeptides de la paroi et les enzymes membranaires de la cellule microbienne, sont les cibles probables des quinones (Cowan, 1999).

Les flavonoïdes : Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-γ-pyrone (anneaux A et C). Les flavonoïdes sont subdivisés en 14 classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisés. Ce sont les flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, et les isoflavones (Heim *et al,* 2002 ; Hendrich, 2006). A l'exception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques : deux cycles benzoïques A et B et un hétérocycle C (squelette carboné C6-C3-C6) (Yao *et al,* 2004 ; Shankar *et al,* 2012). Les flavonoïdes exercent leurs effets via trois mécanismes : l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, inhibition de la fonction des membranes cytoplasmiques et aussi l'inhibition du métabolisme énergétique (Tim Cushine et Lamb, 2005).

Certains flavonoïdes ont un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Harbonne et Williams, 2000). Plaper et ses collaborateurs (2003) ont démontré que la quercétine inhibe la synthèse de l'ADN en inactivant l'ADN gyrase. D'autre flavonoïdes comme le sophoraflavone G et l'epigallocatechin gallate inhibe la synthèse de la membrane cytoplasmique, et que les licochalcones A et C empêchent le métabolisme énergétique de certaines bactéries (Tim Cushnie et Lamb, 2005). D'autres études ont rapporté que les flavonoïdes peuvent aussi interférer avec le métabolisme énergétique des bactéries (Pistelli et Giorgi, 2012).

Les tannins : Ils se trouvent pratiquement dans toutes les parties de la plante (bois, écorces, racines, feuilles et fruits). Ce sont des polymères phénoliques, ils forment des complexes avec les protéines et aussi les polysaccharides par des liaisons hydrogènes et hydrophobes (Cowan, 1999 ; Okuda et Ito*,* 2011). Ces composés sont caractérisés par une capacité à bloquer la membrane cytoplasmique par l'inactivation des adhésines de surface, les enzymes et les protéines de transport membranaires (Okuda*,* 2005).

II.3.8.2. Composition chimique et Activités biologiques (Tassalgha)

La littérature mentionne l'isolement et la caractérisation de plusieurs composés de genre *Globularia*. Ce sont essentiellement des flavonoïdes, des polyphénols, des tannins, des anthocyanines (Khlifi *et al*, 2011), glucoside (globularine), résine, mucilages, tanin, choline, chlorophylle, acide-cinnamique, acide globularique (Chograni *et al*, 2011).

Les irridoïdes glycosides constituent également des métabolites secondaires du genre Globularia. Ils comprennent un cyclopentane et des cycles pyraniques. Ces structures sont connues pour leurs diverses activités biologiques (Es-safi *et al,* 2006).

II.3.9. L'extraction solide-liquide

II.3.9.1. Définition

L'extraction veut dire la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impures sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinés à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales (Handa, 2008).

L'extraction solide-liquide, Il s'agit d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant. Les cas les plus simples correspondent à la décoction, l'infusion et la macération. En chimie organique, on utilise parfois un appareil plus efficace, le soxhlet qui fonctionne en semi-continu (Gheorghiade et *al*, 2006).

II.3.9.2 Principe

D'après (Leandro, 2013), L'extraction solide-liquide est une opération physique de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction. Suite au contacte entre le solvant et le solide hétérogène, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide dans la phase liquide. Au cours de l'extraction, leurs teneurs (fraction) dans la phase solide diminuent et leurs concentrations dans la phase liquide augmentent. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire et par convection. L'extraction est un processus non stationnaire qui s'arrête au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide.la solution obtenue est appelée extrait ou extrait sec. La source solide épuisée après l'extraction contient très peu ou pas de soluté, elle est appelée raffinat ou résidu.

Au cours de l'extraction plusieurs étapes successives peuvent être distinguées :

- Pénétration du solvant dans la matrice solide,
- Dissolution du soluté dans le solvant,
- Diffusion du soluté vers l'extérieur de la matrice solide,
- Transfert du soluté vers le cœur de la phase liquide (par diffusion ou convection)

Après l'extraction, l'extrait obtenu est séparé du solide épuisé par sédimentation, filtration ou centrifugation (Leandro, 2013).

Dans certains cas, la matière végétale est prétraitée avant l'extraction pour améliorer le contacte entre les phases. Le séchage, le broyage et le morcellement sont souvent utilisées comme opérations de prétraitement. Parfois des prétraitements enzymatiques sont également utilisés pour faciliter la dissolution des molécules d'intérêt dans le solvant. La rupture des parois cellulaires sous l'action de pectinases et cellulases favorise l'extraction des polyphénols (Bonilla et al, 1999).

II.3.9.3. Méthodes d'Extraction Traditionnelles

C'est au Ve siècle av. J.-C. que l'on trouve les premières traces des tisanes. Le grec Hippocrate (460-377 av. J.-C.) fait l'éloge de la "ptisanè" dans "le Régime dans les maladies aiguës". Il était en fait question d'une décoction d'orge mondée. Le terme "tisane" est en fait une appellation générique qui regroupe plusieurs formes liquides issues de préparations différentes. Elles se préparent exclusivement à l'aide d'une ou plusieurs drogues végétales. Ainsi, suivant le mode utilisé, on peut distinguer l'infusion, la décoction, la macération, la digestion et la lixiviation, moins fréquente. La tisane permet de libérer divers constituants de la plante grâce au milieu aqueux. De natures variées, ils peuvent être des composés polyphénoliques (acides-phénols, flavonoïdes, tannins catéchiques ou galliques, anthocyanosides), des mucilages, des sels minéraux, des oligoéléments, des vitamines B1, B2 et C, des phytohormones (Jean-Yves, 2010).

D'autres techniques traditionnelles étaient aussi utilisées pour la récupération des principes liposolubles et aromatiques comme les huiles infusées (Benzeggouta, 2005). La présence d'un composé ou d'un autre dépend de sa solubilité dans le solvant utilisé, la température et la durée d'extraction et la fragmentation de la plante (Leandro, 2013).

- **Infusion**

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées des plantes: feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles (Baba-Aïssa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004).

- **Décoction**

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dur ou très dur : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinales (Baba-Aïssa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004).

- **Macération**

Elle consiste à mettre une plante ou partie de plante, dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou une huile végétale (macération huileuse), pendant plusieurs heures, voir plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle convient pour l'extraction de plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin ou les graines du plantain des sables, leur forte concentration en amidon ou pectine peut causer une gélatinisation s'ils se préparent dans de l'eau bouillante. Egalement utilisée pour empêcher l'extraction de constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude (Kraft et Hobbs, 2004). Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur par ébullition (Baba-Aïssa, 2000).

Chapitre III :

Usage des molécules à effet antimicrobien

III.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules produites par des champignons, par des bactéries, ou par synthèse capables d'inhiber la réplication d'une bactérie (antibiotique bactériostatique) ou de la détruire (antibiotique bactéricide). (Gras et Choutet, 2010).

Les principales cibles des antibiotiques sont :

– la paroi bactérienne (bêtalactamines, glycopeptides).

– la synthèse de l'ADN (quinolones, nitro-imidazolés).

– la synthèse protéique (macrolides, aminosides, cyclines).

– l'inhibition compétitive (sulfaméthoxazole et triméthoprime).

III.2. Pouvoir antibactérien du miel et des plantes

En raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant des additifs chimiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile (Bouguerra, 2012).C'est le cas du miel et des extraits de plantes.

Cette particularité du miel due à une production enzymatique de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), est considérée comme la principale inhibine contenue dans le miel (Bogdanov et Blumer, 2001). Produit de l'oxydation du glucose, il est lui-même un oxydant, ce qui lui confère une activité antiseptique (Laurent, 2014). Il existe des substances antibactériennes non peroxydiques sont : des lysozymes, des flavonoïdes, des acides aromatiques, le méthylglyoxal (retrouvé en particulier dans le miel de Manuka), la défensines-1 (protéines fabriquées par les abeilles), des substances volatiles et autres composants indéterminés (Bogdanov et Blumer, 2001 ; Boulaaba, 2019), le miel peut donc inhiber la croissance d'un large spectre de bactéries, champignons, protozoaires et virus, sans que ces derniers ne puissent développer de résistance (Delphine, 2010).

De nombreuses études ont démontré que le miel présentait une activité antibactérienne in vitro (Balas, 2015). De par ses propriétés bactéricides ou bactériostatiques démontrées sur certains germes, le miel est approprié pour certaines affections ORL., laryngites, toux et les maladies des sphères intestinales et rénales. Des succès ont aussi été rapportés dans le traitement d'ulcères dus à *Helicobacter pilori* avec un miel de Manuka (Leptospermum sco-*panum,* arbrisseau de la famille des Myrtacées) mais ces travaux restent à valider plus largement et ne peuvent être généralisés (Al Somal et al., 1994).

Par voie topique, de 1984 à 2009, l'équipe du Pr Bernard Descottes du C H R de Limoges, a utilisé sous forme de pansements, sur des plaies chirurgicales ou des plaies rebelles aux traitements classiques, un miel de thym, à forte activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* et Escherichia *coli.* Une prise en charge a eu lieu avec succès sur plus de 3 000 patients, dont des kystes sacrococcygiens, ou des fermetures pariétales après ablation de stomies (Descottes, 2009).

D'une manière générale, les espèces les plus sensibles au miel sont: le Streptococcus pyogenes, le Staphylococcus aureus et l'Escherichia coli. Les autres espèces telles que Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus species, Clostridium welchii et Clostridium tetani sont également sensibles au miel. Pseudomonas aeruginosa n'est en revanche pas inhibé par le miel. Le staphylocoque apparait particulièrement sensible au miel, y compris en ce qui concerne les souches résistantes aux antibiotiques (Balas, 2015).

Les plantes médicinales constituent une source importante de molécules bioactives qui font généralement partie des métabolites secondaires (Haddouchi et al., 2014). Il a été démontré *in vitro* que ces composés (tanins, terpénoïdes, alcaloïdes et flavonoïdes) sont dotés de propriétés antimicrobiennes très intéressantes qui font l'objet de plusieurs études (Cowan, 1999).

L'usage des extraits de plantes contenant des constituants bioactifs est devenu une approche très importante dans la médecine préventive, recommandée d'ailleurs par l'OMS. Plus de 6000 antibiotiques d'origine végétale ont été découverts (Klingenstein et al.,2005).Une corrélation positive est observée entre la teneur en polyphénols totaux des extraits de plusieurs plantes et leur activité antibactérienne. En effet, ces molécules présentent une activité bactériostatique ou bactéricide *in vitro*, sur une large gamme de microorganismes (Hamadache, 2011). La camomille romaine essentielle de Provence (France) qui a été testée contre diverses souches de bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) et des bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella* sp). L'extrait de la camomille romaine a montré une activité antimicrobienne élevée contre toutes les souches microbiennes testées (Bail et *al*., 2011).

Dans le cadre de maladies infectieuses, certaines plantes comme l'eucalyptus, le fenouil, la muscade ont des effets antibiotiques. D'autres contiennent des tannins qui ont un effet préventif ou curatif pour les diarrhées, par exemple l'épicéa ou le chêne. De nombreuses revues bibliographiques discutent des propriétés antibactériennes de substances (par exemple le carvacrol ou le thymol) présentes dans les huiles essentielles.

Ces effets observés *in vitro* ne sont pas forcément reproduits directement au niveau de l'intestin du fait des propriétés physico-chimiques de ces molécules. Chez le poisson, l'utilisation de la phytothérapie avec différents extraits et huiles essentielles de nombreuses plantes (par exemple, ail, romarin, curcuma, origan, romarin) contenant des composés phénoliques, polysaccharides, protéoglycanes, flavonoïdes fait l'objet de multiples travaux pour accroître la résistance des poissons aux infections bactériennes (Ducrot et al., 2017).

La plupart des plantes identifiées dans les recettes ont des propriétés pharmacologiques individuelles analogues au miel de combinaison, mais pas toujours avec autant d'efficacité selon le cas. L'association viserait donc une meilleure efficacité du produit final via la synergie entre les différentes composantes du mélange. Ces mélanges, simples, efficaces, peu onéreux et sans effets secondaires méritent d'être mieux connus et intégrés dans la panoplie des thérapeutiques naturelles à usage courant (Nnomo et al., 2009). Comme un antibiotique naturel, la combinaison de miel et de curcuma a été montrée pour tuer facilement de nombreux types de bactéries. Ceux-ci comprennent *H.pylori*, *Staphylococcus aureus*, E. coli, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le remède naturel est un puissant antibiotique qui peut être utilisé pour se débarrasser des types de bactéries résistantes aux antibiotiques tenaces. (http://bonasavoir.net/miel-et-curcuma-est-lantibiotique-naturel-le-plus-fort/). *Nigella sativa* L (Nigelle; Haba sawda, Sanouje) est utilisée sous forme de poudre mélangée à l'huile d'olive ou au miel, toute seule ou ajoutée à d'autres drogues comme remède de différentes pathologies: Affections respiratoires (grippe, bronchite, asthme) et Kystes (Salhi et al., 2010).

III.3. Tests d'évaluation de l'effet antibactérien

III.3.1. Concentration minimale inhibitrice(CMI)

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). Elle correspond à la concentration minimale qui inhibe la croissance visible du germe en 24h.

III.3.2. Méthodes de détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI)

Parmi les méthodes applicables dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne:

III.3.2.1. Méthodes par dilution

Selon plusieurs auteurs (Le Minor et Veron, 1989 ; Vandepitte *et al*, 1994 ; Alzoreky et Nakahara, 2003 ; Zampini *et al*, 2005 ; Berahou *et al*, 2007), les méthodes par dilution permettent une meilleure estimation quantitative de l'activité antibiotique.

- Dilution en milieu gélosé

La méthode de dilution en milieu gélosé Mueller Hinton nécessite l'incorporation de chaque concentration d'antibiotique dans le milieu liquéfié de manière à avoir une dilution au dixième de l'antibiotique dans la gélose. Après solidification, 1 à 10 µl de l'inoculum correspondant à chaque bactérie testée, sont déposés en spot sur la surface de la gélose. La CMI est définie par la concentration minimale d'antibiotique ne laissant subsister aucune ou, au plus, une à trois colonies après 18 h d'incubation à 37°C.

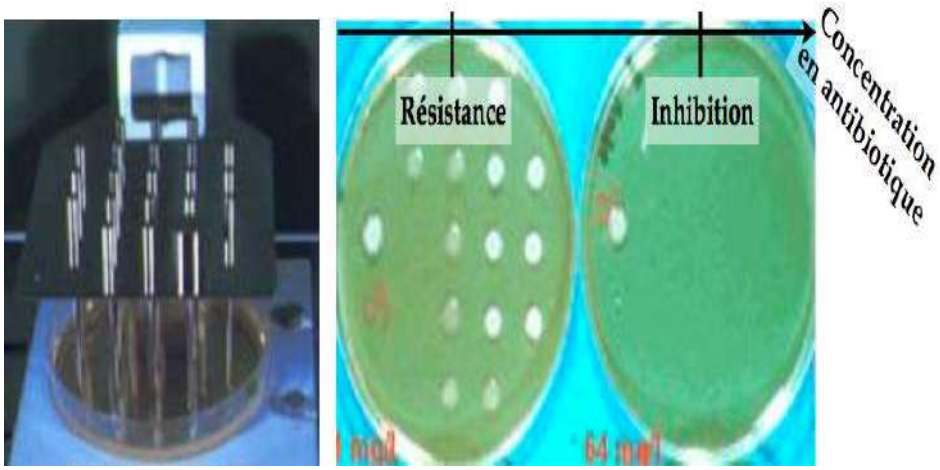


Figure III-1: Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution dans un gel d'Agar. A gauche, l'appareil de steers, à droite, résultats obtenus (Website. http : //www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html).

- Dilution en milieu liquide (bouillon)

Les méthodes de dilution en milieu liquide (bouillon Mueller Hinton) sont réalisées dans des tubes (macro méthode) ou dans des plaques de micro titration (micro méthode). Les micros méthodes sont plus adaptées à la pratique de l'antibiogramme, grâce à une automatisation possible de la préparation des dilutions d'antibiotiques et de la lecture des CMI.

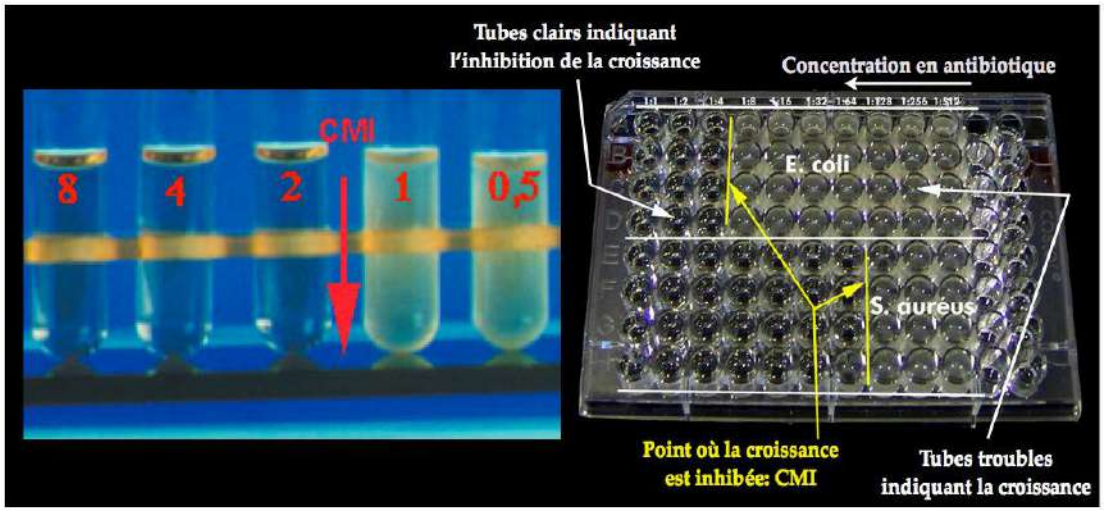


Figure III-2 : Exemple de détermination de la CMI par la méthode de dilution en volume. A gauche, test en volume macroscopique (Website. http://www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html). A droite, résultats obtenus en plaque à micro-titration photographie (Website. http : //muhammadcank.wordpress.com/2010/03/19/ujimicminimum-inhibitory-concentration/).

III.3.2.2. Méthodes par diffusion

- Diffusion en milieu gélosé (Vandepitte *et al*, 1994 ; Ducharme et Martineau, 2001).

A partir d'une source quelconque (dépôt en surface ou dans un puits, disque de papier buvard pré imprégné), un antibiotique diffuse dans un milieu de culture gélosé en réalisant un gradient de concentration. Après une phase de latence durant laquelle la diffusion de l'antibiotique progresse, la multiplication des bactéries va se produire. Une compétition s'installe alors entre la diffusion de l'antibiotique à partir de la source et la croissance des bactéries. La dimension de la zone d'inhibition sera déterminée par la distance que la concentration inhibitrice d'antibiotique pourra parcourir avant que soit atteinte une certaine densité microbienne. L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est un procédé largement répandu du fait de sa simplicité. Cependant, la qualité des résultats peut varier en fonction de plusieurs paramètres qu'il importe de maîtriser par une standardisation des méthodes (Densité de l'inoculum , Minutage de l'application des disques, Température d'incubation, Durée d'incubation, Profondeur de la gélose et espacement des disques imprégnés d'antibiotique, Activité des disques imprégnés d'antibiotique, Composition du milieu de culture).

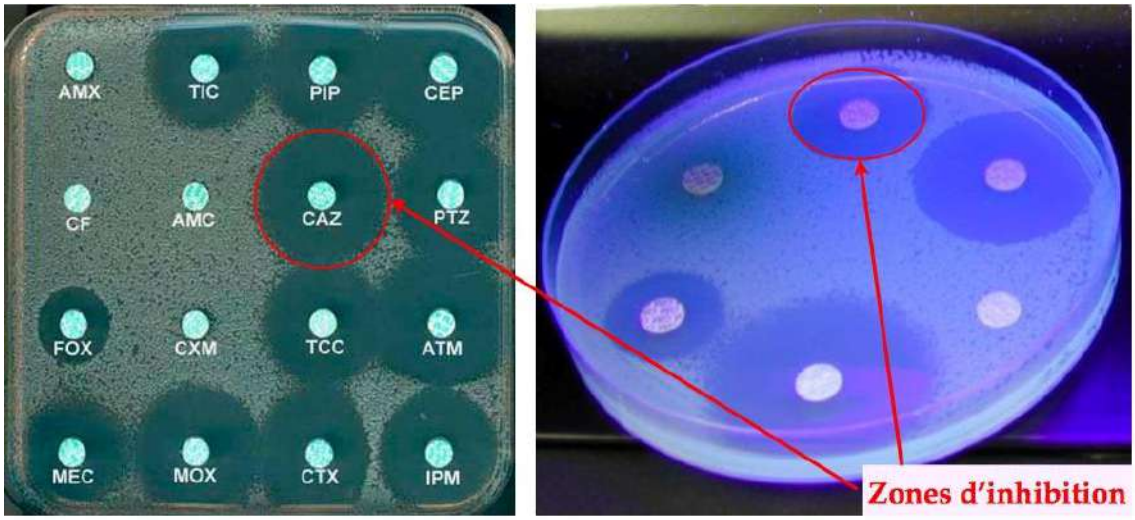


Figure III-3 : Exemples illustrant des résultats d'antibiogrammes. A gauche, boite carré (16 tests au maximum) (Website. http : //www.microbe-edu.org). A droite, boite ronde (6 tests au maximum) (Website. http : //tpegrp13.e-monsite.com).

- E-test (Ducharme et Martineau, 2001)

L'E-test tire profit des avantages du test par diffusion (rapidité et simplicité) et du test par dilution (obtention d'une valeur quantitative de la sensibilité). Des languettes contenant chacune un antibiotique spécifique sont disposées sur le milieu de culture.

Les languettes sont graduées afin d'indiquer la CMI de l'antibiotique pour la bactérie étudiée.



Figure III-4: Exemple standard d'un E-test (Website. http: //www.uniklinik-ulm.de/).

III.3.2.3. Méthodes automatisées

Il existe actuellement 3 méthodes sur le marché offrant des performances sensiblement comparables : le **MicroScan Walk-Away®** (Beckman Coulter), le **PhoenixTM** (Becton Dickinson) et le **Vitek® 2** (bioMérieux). L'automatisation repose sur :

1. la miniaturisation des milieux de culture contenant des concentrations ciblées d'antibiotique dans des systèmes en carte (Vitek®), galerie (PhoenixTM) ou microplaque (Walk-Away®).

2. Sur la lecture de la croissance par turbidimétrie (colorimétrie pour le Walk-Away®).

La préparation de l'inoculum demeure encore une étape manuelle. Les concentrations d'antibiotique testées encadrent les breakpoints et les CMI déterminées par les automates PhoenixTM et Walk-Away® sont des CMI vraies. À l'inverse, le système Vitek® calcule les CMI à partir de plusieurs courbes de croissance en présence de concentrations variables d'antibiotique (+ condition contrôle sans antibiotique) sur la base d'algorithmes de calcul et de correspondance avec une base de données.

Ces automates sont couplés à des systèmes d'identification couvrant les principales espèces isolées à l'hôpital. Ils intègrent des systèmes experts associant les mécanismes de résistance à l'identification bactérienne, permettant de détecter de potentiels mécanismes de résistance impossible après confrontation avec l'identification. Ces systèmes tenant compte des recommandations du CASFM-EUCAST sur les concentrations critiques doivent être mis régulièrement à jour.

Le choix d'une méthode automatisée apporte des avantages par rapport aux méthodes en diffusion notamment : un rendu des résultats plus rapide (6 à 8 h contre 18 h pour les méthodes classiques), un gain de temps technique, une meilleure reproductibilité, la possibilité de passer des échantillons à haut débit, une standardisation forte (temps d'incubation, contrôle des réactifs, lecture), l'utilisation de milieu liquide permettant de mieux détecter certains mécanismes de résistances. Cependant, les méthodes automatisées sont également : plus coûteuses, sujettes aux pannes, ne permettent pas la visualisation des interactions (synergie, antagonisme, induction) et sont lourdes en investissement. De plus, le choix des antibiotiques testés est du ressort du fabricant et n'est pas modifiable.

En plus de ces trois automates, il existe des systèmes d'automatisation des lectures d'antibiogrammes en milieu gélosé comme **SIRscan 2000 automatic®** (i2A) ou **Osiris®/Adagio®** (Biorad). Ces systèmes possèdent aussi des systèmes Expert, mais nécessitent la saisie de l'identification.

Les méthodes utilisant la méthode par diffusion en milieu gélosé utilisant des disques permet une plus grande souplesse dans le choix des antibiotiques (c'est-à-dire des disques) et de leur fournisseur.



Figure III-5 : Photos des différents automates d'antibiogramme et leur support (Tasse, 2017).

III.4. Spectre antibactérien

Le spectre d'activité est la liste des bactéries sur lesquelles l'antibiotique est actif. Il est dit large lorsque l'antibiotique agit à la fois sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et étroit lorsqu'il n'est actif que sur l'un de ces deux types de bactéries.

III.4.1 Bactéries à Gram négatifs

III.4.1.1. Genre *Pseudomonas*

Ce genre appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*. Les bactéries de cette famille sont des bâtonnets, mobiles par cils polaires, aérobies strictes.

P.aeruginosa se cultive facilement sur milieux usuels, en aérobiose, à la température de 30°C. Il est fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal. Il est caractérisé par sa résistance particulière aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier, il est à l'origine de des infections et de suppurations locales ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées…). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre (Leclerc et *al.*, 1995).

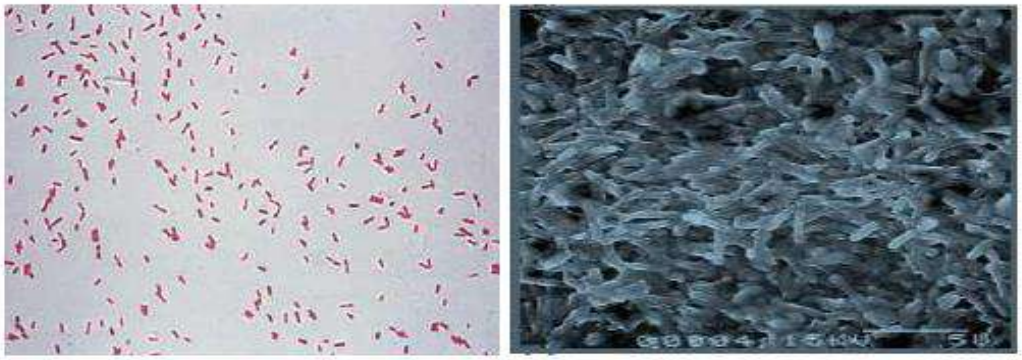


Figure III-6 : *Pseudomonas aeruginosa*: *(a)* coloration de Gram (x100)*, (b)* Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* Après 72 heures de formation (Khalilzadah, 2009).

III.4.1.2. Genre *Escherichia*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *E. coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents. *E. coli*, un hôte commun de l'intestin de l'homme et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination dans l'eau et les aliments. A l'intérieure de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastroentérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *E.coli* entérotoxinogène (turista), *E.coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *E.coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *E. coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur). D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes (Leclerc et *al*., 1995).

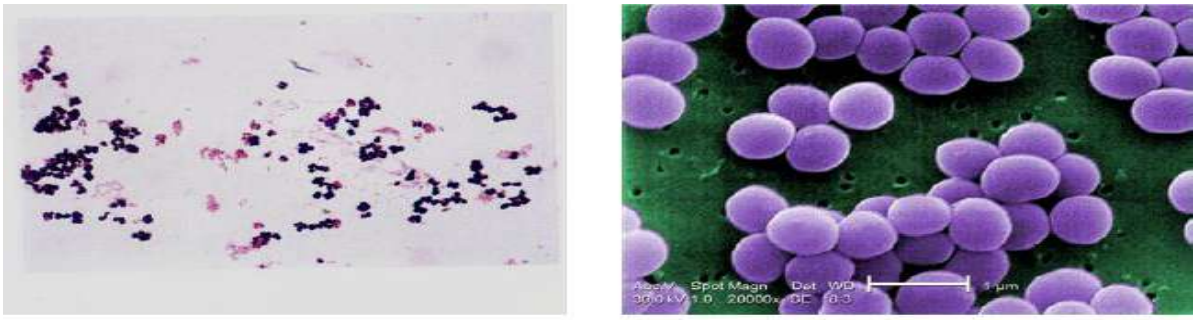


Figure III-7 : *Escherichia coli* observée au microscope électronique (Gx10000) (Mami, 2013).

III.4.2. Bactéries à gram positif

III.4.2.1. Genre *Staphylococcus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin sont immobiles et se cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs. Ils sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères. Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S.aureus* responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses, mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales. Cette espèce bactérienne est l'une des espèces les plus sensibles à l'action antibactérienne du miel ; il a été souvent fait état de la complète inhibition de *staphylococcus aureus* par des miels dilués à des concentrations très basse (Leclerc et *al.*, 1995).



(a) *(b)*

Figure III-8: Aspect de *Staphylococcus aureus* (*a*) : microscope optique ×100 ; *(b)* : Microscopie électronique X 20000) (Aouati, 2009 ; Rebiahi, 2012).

Chapitre IV :

Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau de Hall technologique de l'université Yahia Farès de Médéa. Elle a pour objectif l'étude de l'effet inhibiteur naturel d'un miel de forêt seul puis associé avec les extraits d'une plante médicinale : *Globularia alypum*.

IV.1. Matériel

IV.1.1. Matériel biologique

Le miel : C'est un miel de forêt de type multi-floral provenant de la région d'Oued lahreche-Commune de Bouaïchoune-Wilaya de Médéa. Il a été aimablement fourni par un apiculteur : Mr Hamidia Mohamed (Quartier accacia, Médéa). Il s'agit d'un liquide visqueux partiellement cristallin, brun et ayant un goût indéfini **(Figure IV-1)**.



Figure IV-1 : Photo de miel étudié

La plante : Il s'agit de la globulaire *Globularia alypum* **(Figure IV-2)**. Cette plante a été récoltée en mois de décembre 2019 au niveau de la commune harbile-Wilaya de Médéa. Nous avons utilisé toutes les parties de la plante : tiges, feuilles et fleurs à l'état sec et broyé (Cf. Section Méthodes).



Figure IV-2 : *Globularia alypum*

Les souches bactériennes : Trois espèces de collection ont été utilisées afin de tester l'effet inhibiteur du miel ainsi que les extraits de la plante :

- *Escherichia coli :* référence ATCC11105.
- *Staphylococcus aureus* : référence ATCC6538.
- *Pseudomonas aeruginosa :* référence ATCC27853

Ces souches ont été aimablement fournies par l'Hôpital de Médéa. Leur identification a été confirmée par le personnel du laboratoire de microbiologie de l'Hôpital de Médéa.

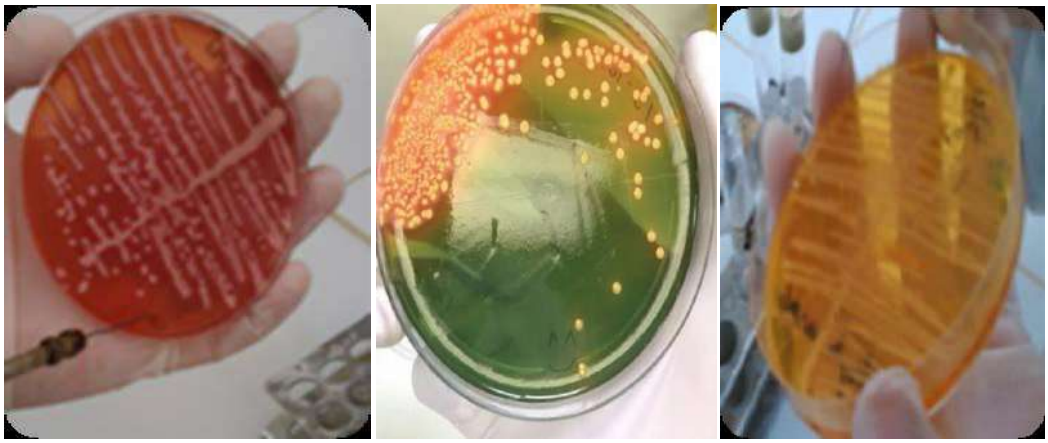


Figure IV-3 : Souches bactériennes : *P. aeruginosa, E. Coli. ,* S. *aureus*.

IV.1.2. Matériel non biologique

Le **Tableau IV-1** résume l'ensemble du matériel utilisé durant la partie expérimentale.

Tableau IV-1 : Matériel utilisé durant la partie expérimentale.

Verreries et petit matériel	• Verreries (Pipettes + Poires, Burettes, Eprouvettes, Tubes à essais, Tubes stériles, Béchers, Fioles, Erlenmeyers, Entonnoir, Flacons …). • Bec Bunsen, Anse de platine, Pipettes Pasteur, boîtes de pétri, Micropipettes, Embouts stériles, Papier buvard, Papier filtre, papier Aluminium, papier film, Cotton…
Appareils	• Autoclave type *Adolf Wolf Sanoclav* • Réfrigérateur type *ENIEM* • Une étuve type *Memmert* • Agitateur type *Heidolph* • Balance type *Sartorius* • Bain marie type *Memmert* • pH mètre type *OHAUS* • Polarimètre type *Laurent* • Conductimètre type *Hann*

Tableau IV-1 (suite) : Matériel utilisé durant la partie expérimentale.

Appareils (Suite)	• Thermomètre type *Chcktemp Hanna* • Chauffe ballon type *Electrothermal* • Spectrophotomètre Infrarouge FTIR-800 type *IN FRARED* • Réfractomètre type *Abbe refractomètre WYA* • *Broyeur type SAYONA*
Produits, Réactifs, solutions	Eau distillé, NaOH, HCl, Liqueur de Fehling, Sulfate ferrique, permanganate de potassuim, acide sulfirique, eau physiologique stérile 9‰.
Milieux de culture	Milieu Mueller-Hinton, Bouillon nutritif, Gélose nutritive. Milieux sélectifs : Hektoen, Chapman.

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Préparation de la plante médicinale

La récolte ainsi que l'identification de la plante *Globularia alypum* a été faite par Mr TURKMAN, herboriste au niveau de la commune de MEDEA. Les parties aériennes de la plante collectée ont subis des opérations de prétraitement pour faciliter le stockage et l'extraction. L'aspect des parties de la plantes apres traitement est illustré sur la **Figure IV-4**:

- **Séparation** des (feuilles+fleurs) seules et tiges seules.
- **Découpage** des tiges en petites morceaux pour diminuer le volume total et faciliter leur séchage.
- **Séchage et conservation :** Le séchage est une opération spécifique du végétal de départ et du produit à obtenir. Il permet une diminution du poids, une augmentation de la stabilité de la plante, une élimination des micro-organismes et un traitement par la suite plus facile sur de la matière réduite en eau **(**Jean-Yves, 2010). De plus, la plante comme tout organisme vivant contient de nombreuses enzymes. Ces enzymes, à la mort de la plante et s'ils sont maintenus en milieu aqueux, vont entraîner de nombreuses réactions de dégradation, qui ne seront plus compensées par des synthèses au sein de la cellule végétale, il s'ensuit donc une détérioration rapide du contenu cellulaire et par voie de conséquence une altération des principes actifs s'y trouvant. L'eau contenue dans la plante permet l'activation des systèmes enzymatiques; pour les stopper plusieurs procédé peuvent être utilisé comme la dessiccation à l'étuve et sous vide (Ben Amor, 2008). Les plantes ne doivent pas être trop serrées pour que l'air circule entre elles afin d'obtenir une dessiccation rapide. Il faut étaler les végétaux sur des plateaux ou des cadres en grillage

non oxydés. Elles peuvent cependant être aussi séchées sur du papier propre ou un plancher en bois très propre et sans odeur. Les plantes doivent être tournées de temps en temps sur toutes leurs faces surtout les premiers jours de la dessiccation. Avant le stockage des plantes, il faut bien vérifier qu'elles sont parfaitement séchées, car la moindre trace d'humidité déclencherait un processus de moisissure qui rendrait la drogue inutilisable (Stary, 1992). Le taux d'humidité est obtenu par pesée différentielle avant et après le séchage (Mettler, 2002).

La température de séchage dans notre cas est de 38°C pendant trois jours, jusqu'au poids constant où les plantes deviennent légères et cassantes. La conservation a été réalisé dans des boites à fermeture hermetique stockées dans un lieu sec, frai et à l'abri de la lumière.



A **B**



C **D** **E**

Figure IV-4 : Photos de préparation de la plante *Globularia alypum* ; A-(Feuilles+fleurs) fraiche, B-tiges fraiches, C-tiges sèches, D-tiges après broyage, E-(feuilles+fleurs) après broyage.

- **Le broyage :** vise à diviser la matière pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant d'extraction et à faciliter l'extraction de l'intérieur des tissus végétaux par cassure des tissus et des parois cellulaires. Les broyeurs à hélice, de type « moulin à café électrique » ou « mixer », donnent de bons résultats dans l'ensemble ; ils sont d'une utilisation pratique, faciles à nettoyer. Le seul inconvénient est que leur capacité est assez restreinte et ils ne peuvent broyer des parties coriaces comme par exemple les grosses racines végétales. Ces broyeurs à hélice peuvent être utilisés soit en milieu sec (broyage classique), soit en milieu humide ou liquide. Cette dernière opération permet de réaliser le broyage d'éléments coriaces qui sont ainsi trempés et rendu plus friables (Ben Amor, 2008).

IV.2.2. Analyse physico-chimique du miel

IV.2.2.1. Mesure de la densité

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

$$d = \rho_{substance} / \rho_{eau} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

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

IV.2.2.2. Le potentiel d'Hydrogène

Le pH ou potentiel d'Hydrogène ou Indice de Sorensen est défini comme le logarithme de la concentration en ions H^+ dans une solution. Pour le miel, c'est un indice de la" réactivité acide" du produit (Louveaux, 1985; Vanhanen et *al.,* 2011). La valeur de cette mesure est l'un des facteurs utilisés pour expliquer la survie et le développement des microorganismes (Garcia, 2001).

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

IV.2.2.3. Détermination de conductivité électrique

Le miel a une propriété intéressante qui est la possibilité de permettre le passage d'un courant électrique. Cette propriété appelée la conductivité électrique qui représente un outil fiable pour la détermination de l'origine botanique du miel, car un miel de nectar a une plus faible conductibilité qu'un miel de miellat. Cet indice est désigné aujourd'hui lors de contrôles de routine du miel (Draiaia, 2016).

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

IV.2.2.4. Détermination de l'indice de réfraction et de la teneur en eau

L'indice de réfraction est une propriété optique qui caractérise toute substance transparente. Il est en fonction de la teneur en eau et de la température.

Selon la pharmacopée européenne (2008), l'indice de réfraction est déterminé en homogénéisant 100g de miel dans un flacon hermétiquement fermé et placé dans un bain-marie à 50±0,2 Cº jusqu'à dissolution totale des cristaux de sucres. Apres refroidissement à 20 Cº, l'échantillon est homogénéisé à nouveau, puis étalé immédiatement de façon uniforme sur le prisme du réfractomètre. L'indice de réfraction est déterminé après 2 min dans le cas d'un réfractomètre manuel (type Abbe dans notre cas), ou 4 min dans le cas d'un réfractomètre numérique. La température du prisme doit être notée, car si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20°C, soustractive dans le cas contraire. Le terme correctif est de 0,00023 par degré c (Arrête n°80-367/CG, 2009). En se référant au tableau de Chataway, nous déduisons la teneur en eau **(Annexe 1).**

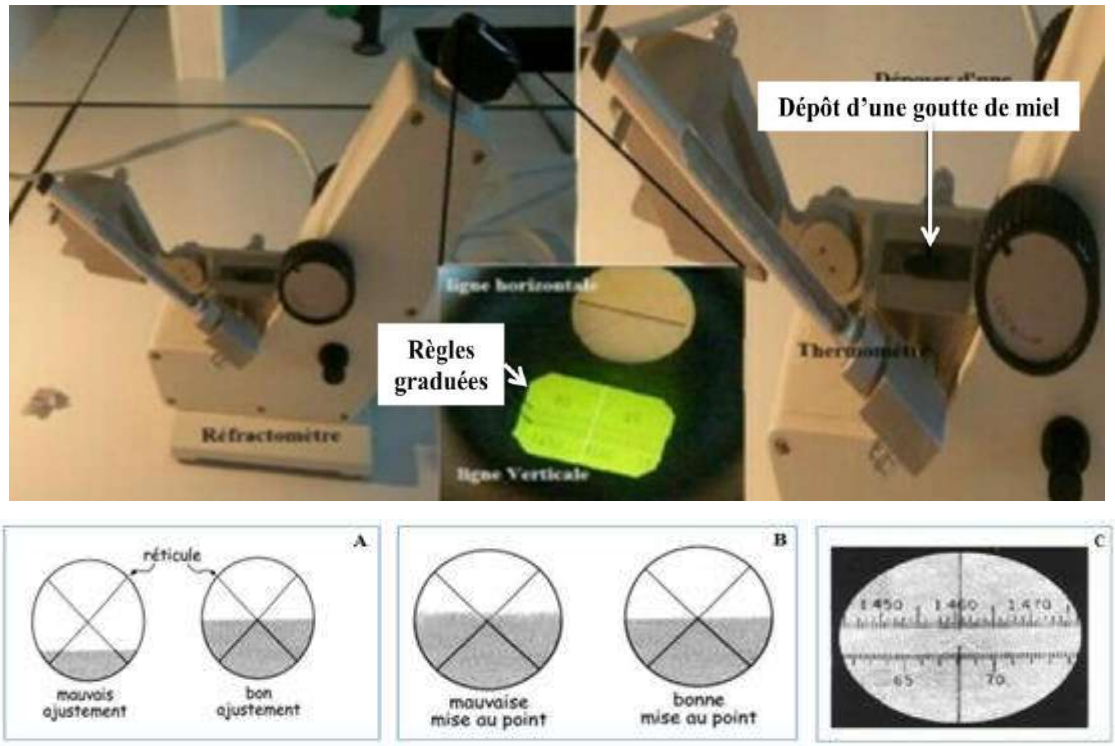


Figure IV-5 : Photo du Réfractomètre utilisé; Mesure de l'indice de Réfraction :

A : Ajuster la position de la frontière entre la partie supérieure claire et la partie inférieure sombre de façon à ce qu'elle se trouve au centre du réticule, à l'aide de la grosse molette d'ajustement. **B :** Ajuster la mise au point de façon à rendre cette frontière la plus nette possible (sans teintes rouge ou bleu), à l'aide de la petite molette. **C :** Lecture de l'indice de réfraction en utilisant l'échelle graduée principale. Le 4ème chiffre est jugé d'après la position du trait vertical par rapport à la plus fine graduation de l'échelle.

IV.2.2.5. Analyse polarimétrique

Le Pouvoir rotatoire des miels concerne leur action sur la lumière polarisée (Prost, 2005). Selon la pharmacopée Européenne (2008), l'angle de rotation optique est déterminé en dissolvant une quantité de miel équivalant à 20g de matière sèche dans 50 ml d'eau à laquelle est ajoutée 0.2 ml d'ammoniaque concentrée. La solution est complétée à 100 ml avec de l'eau. Si nécessaire, le miel pourrait être décoloré avec du charbon actif.



Figure IV-6 : Photo du Polarimètre utilisé dans l'étude du pouvoir rotatoir du miel.

IV.2.2.6. Dosage des sucres réducteurs

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

A) Principe (site1)

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

$$RCOH + 2CuO + HOK \longrightarrow RCOOK + \underset{\text{Rouge brique}}{\underset{\downarrow}{Cu_2O}} + H_2O \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

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

$$Cu_2O + Fe_2 (SO_4)3 + H_2SO_4 \longrightarrow 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

3] Le sulfate ferreux ($Fe SO_4$) qui est proportionnel à la quantité de Cu_2O, est dosé par une solution de permanganate de potassium ($K MnO_4$) selon l'équation suivante :

$$2KMnO_4 + 10\ FeSO_4 + 8H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 5\ Fe_2 (SO_4)_3 + 8H_2O \ldots\ldots (4)$$

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

- Soit n : le nombre de mole, C : la concentration, V : le volume.
- D'après l'équation (4) : $n_{FeSO4} = 5.\ n_{KMnO_4}$.
- D'après l'équation (3) : $n_{Cu_2O} = (1/2).n_{FeSO_4}$.
- Sachant que n=C*V Donc : $n_{Cu_2O} = (1/2).\ 5.\ n_{KMnO_4} = (1/2).\ 5.\ C_{KMnO_4}.\ V_{KMnO_4}$

- $n_{Cu} = 5. C_{KMnO_4}. V_{KMnO_4}$.
- $m_{Cu} = 5. M_{Cu}. C_{KMnO_4}. V_{KMnO_4}$ où $M_{Cu} = 63.54$ g/mol.

5] En utilisant la table de Bertrand **(Annexe 3)**, nous pouvons déduire la masse de sucres réducteurs correspondant. Le pourcentage en sucre réducteur est calculé comme suit :

$$\frac{\text{la masse des sucres réducteurs}}{\text{la masse de la prise d'essais}} * 100 \dots\dots\dots\dots\dots\dots . (5)$$

B) Mode opératoire (site 1)

1]. Réduction de la liqueur de Fehling :

- Peser 0.5g de miel à l'aide d'une balance analytique.
- Mettre dans un ballon un excès de la liqueur de Fehling (entre 80 ml et 120 ml), l'échantillon de miel pesé, 20 ml d'eau distillée.
- Agiter le mélange jusqu'à la dissolution totale du miel.
- Porter à l'ébullition douce pendant exactement trois minutes.

2].Isolement du cuivre formé

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

3].Dosage du cuivre

- Dissoudre le précipité dans 85 ml de solution de sulfate ferrique acide 0.1M.
- Titrer avec une solution de permanganate de potassium 0.1M jusqu'à l'obtention d'une coloration rose pâle stable 10 à 20 secondes et noter le volume de $KMnO_4$ correspondant.

IV.2.3. Etude de l'effet antibactérien du miel

Pour atteindre cet objectif, nous avons commencé par une étude de l'influence de deux paramètres sur l'effet inhibiteur du miel, à savoir : la température et le pH. Par la suite, une détermination de la concentration minimale inhibitrice du miel a été réalisée aux optima de pH et de température. L'effet antibactérien a été testé sur trois espèces bactériennes de collection : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa.*

VI.2.3.1. Effet de la température

- Dans les conditions d'asepsie, 6 tubes stériles sont remplis chacun par 3 ml de miel.
- Un des échantillons de miel ne subit aucun traitement thermique, alors que les autres sont chauffés dans un bain marie chacun à l'une des températures suivantes : 40°C, 55°C, 70°C, 85°C et 95°C. Après stabilisation de la température du bain marie, le tube est submergé dans l'eau pendant 15 minutes de façon à ce que le niveau d'eau soit supérieur au niveau du miel.
- Ajouter à chaque tube 1 ml d'eau distillé stériles a fin d'obtenir une concentration de 75% (v/v), bien homogénéiser et laisser refroidir sous le jet du robinet.
- Préparer les suspensions bactériennes : pour chaque souche isolée en culture pure, une parcelle de la culture (correspondante à 2-3 colonies) est prélevée aseptiquement pour inoculer 3ml d'eau physiologique stérile. Agiter afin d'homogénéiser la suspension bactérienne.
- Pour chaque souche, déposer aseptiquement un volume de 1ml de la suspension sur le milieu Mueller et Hinton coulé en boite. Etaler avec une pipette râteau du centre vers les bords. Laisser reposer 5-10 min afin que la milieu absorbe la suspension bactérienne.
- Des disques de papier de 9 mm de diamètre sont déposés de façon espacée sur les boites ensemencées. Imprégner chacun par 50µl d'une dilution chauffée à une température donnée.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.2.Effet du pH

- Dans les conditions d'asepsie, préparer cinq dilutions de miel à 75% dans des tubes stériles.
- Mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre.

- Amener le pH de chaque préparation à l'une des valeurs suivantes : 2, 4, 6, et 9 en utilisant des solutions de NaOH ou de HCl.
- Préparer les suspensions bactériennes correspondantes aux souches testées et ensemencer les en nappe sur Mueller-Hinton en utilisant la technique de la pipette râteau. .
- Déposer les disques de papier sur les tapis bactériens de façon espacée puis imbiber les avec 50µl des préparations de miels aux différentes pH.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.3. Détermination de la concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

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

Technique

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

IV.2.4. Etude de la plante et de l'association Miel-Extraits de la plante

Cette partie cible la mise en évidence de l'effet antibactérien des extraits de *Globularia alypum* et de l'effet synergique des composants d'une association Miel-Extraits. L'organigramme illustré sur la **Figure IV-7** résume le travail qui n'a pas été réalisé à cause des circonstances de la pandémie COVID-19.

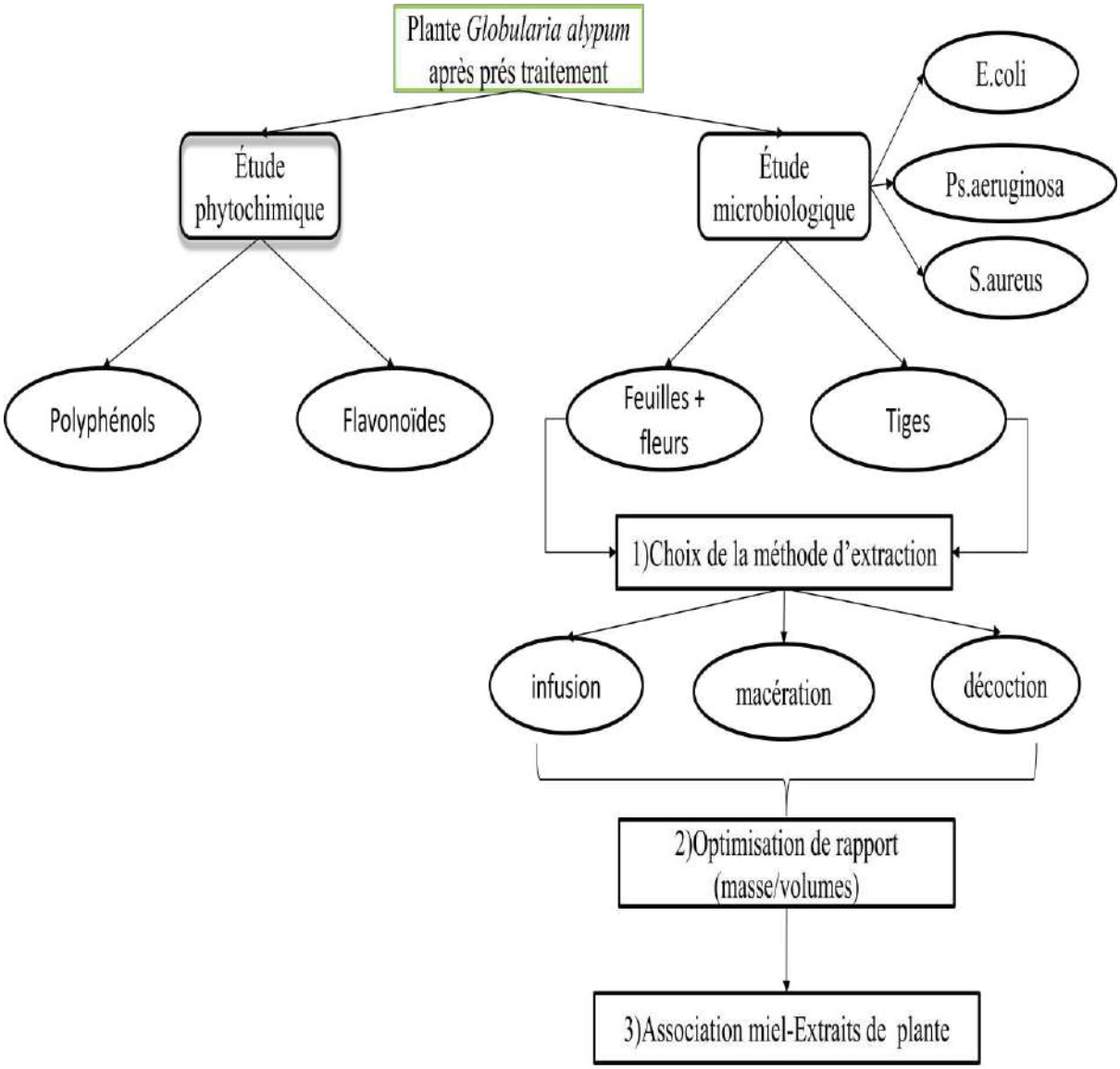


Figure IV-7 : Schéma expérimentale concernant l'étude envisagée sur la plante et l'association miel-Extraits de la plante.

Dans un premier volet, une étude phytochimique sur notre plante a été envisagée. Les deux principales familles ciblées des inhibines sont les Polyphénols et les Flavonoïdes.

Dans le deuxieme volet (étude microbiolgique), nous avons programmé en premier temps l'étude de l'effet antibactérien des tiges et du mélange (feuilles + fleurs) séparemment en utilisant trois méthodes d'extraction (macération, décoction, infusion) afin de fixer la méthode d'extraction optimale. Une étude visant le mélange total de toute les parties de la plante a été aussi envisagé en optimisant le poucentage de chaque partie. En utilisant la

méthode d'extraction optimale, le deuxième parametre visé est le rapport (masse de la matière végétal/volume du solvant) afin de fixer la quantité de la matière végétale donnant un effet maximal sans interferer la diffusion des inhibines naturelles dans le solvant d'extraction. Les deux parties ont été programmé avec deux solvant différents. L'évaluation des optimals (méthode d'extraction, rapport m/v) pour chaque solvant et chaque partie de la plante a été réalisé en mesurant les zones d'inhibitions des extraits obtenues sur les trois souches : *E.coli, S.aureus* et *P. aeruginosa*.

Enfin, l'étude de l'effet antibactérien de l'association « miel- extraits » a été programmé pour atteindre finalement notre objectif : « Etude de l'effet inhibiteur d'une formule miel-plante » en respectant le poucentage de chaque partie dans l'association « miel-extrait » donnant un effet synergique.

Chapitre V :

Résultats et discussion

V.1. Caractérisation physico-chimique du miel

V.1.1. La densité

Le **Tableau V-1** résume les différentes données expérimentales qui ont permis de calculer la densité du miel de forêt.

Tableau V-1 : valeur de la densité d'échantillon de miel

Echantillon	m (g)	v (ml)	ρ (g/ml)	d
Eau distillée	4.778	5	0.95	1
Miel de forêt	6.601	5	1.32	1.39

La valeur de la densité obtenue pour notre miel est 1.39 à 20 C°. On peut dire que l'échantillon analysé est conforme aux normes fixées par l'association française de normalisation où la densité se situe entre 1,39 et 1,52. Le miel est donc un produit relativement dense. La densité de miel dépend de la teneur en eau et à moindre degré de la composition chimique du miel (Nair, 2014).

V.1.2. Le pH

La valeur du pH de notre échantillon de miel est 3.89 à 22.7 Cº. Le miel étudié est donc acide et son pH est conforme aux normes (Codex Alimentarius, 2001). Généralement, les miels de nectar ont un pH faible (de 3,3 à 4,5), tandis que, les miels de miellat ont un pH un peu plus élevé (Pesenti *et al,* 2008). Notre miel est donc d'origine nectarifère. Achouri et al., 2015, indiquent que les miels sont généralement acides, en raison de la présence d'acides organiques, tels que les acides gluconiques provenant des sécrétions digestives des abeilles pendant l'élaboration du miel : l'acide pyruvique, l'acide malique et l'acide citrique. On trouve aussi l'acide tartrique, succinique, butyrique, lactique, oxalique et des traces d'acide formique, d'acide chlorhydrique et d'acide phosphorique. Ainsi, le miel contient des ions inorganiques tels que les phosphates, les chlorures et d'autres composés tels que les lactones dont la présence est constante et qui ont également une fonction acide (Nanda et al., 2003 ; Huchet et al., 1996). A côté des acides non aromatiques, les acides aromatiques, tels que les acides phénoliques sont présents en grande quantité dans les miels sombres qui contribuent à leurs acidités (Alvarez, 2010).

La variation du pH dépend aussi de différents facteurs tels que, l'origine géographique, les conditions du sol, la sécrétion salivaire de l'abeille et le processus enzymatique qui se produit pendant la transformation de la matière première et la teneur en minéraux (Khiati, 2014; El-Metwally, 2015).

V.1.3. la conductivité électrique

La conductivité électrique du miel dépend largement de la teneur du miel en matière ionisable, matières minérales, acides organiques, protéines et la composition de sucres dans le miel (Ulloa, 2012). Ainsi, la mesure de la conductivité permet de différencier le miel de nectar des miels de miellat et elle est désignée aujourd'hui comme un paramètre de qualité fiable lors des contrôles de routine, qui remplace la teneur en cendres (Bettar et al., 2015).

Notre miel a une conductivité électrique égale à 0,691 Ms/cm à 20 Cº, cette valeur cadre avec les normes internationales et qui sont ≤ 0.8Ms/cm pour les miels de nectar et ≥0.8 Ms/cm pour le miel de miellat (Bogdanov et al., 2004). D'après ces résultats, notre miel est considéré une fois de plus comme un miel de nectar. Sa conductivité élevée est dû à sa richesse en matières minérales. On pourrait aussi déduire l'importance de sa conductivité en se basent sur sa couleur relativement foncée. Selon Kaskoniene et al., 2010, les miels foncés conduisent mieux le courant électrique que les miels clairs.

V.1.4. Indice de réfraction et teneur en eau

La teneur en eau du miel est l'un des critères primordiaux lorsqu'on veut mettre sur le marché un produit de qualité. Un miel trop sec montre une viscosité élevée et peut poser des problèmes lors de la cristallisation, un miel humide risque la fermentation (Dally, 2008). Le contenu du miel en humidité dépend de la saison de la récolte, les conditions climatiques, le degré de maturité dans la ruche et l'humidité de la plante d'origine (Finola et al., 2007; Fallico et al. 2004). Ce paramètre est indiqué par la mesure de l'indice de réfraction.

L'indice de réfraction obtenu est 1.4975 à 20 Cº. Cette valeur observée sur la table de Chataway correspond une teneur en eau de 15.6 % qui se situe bien dans l'intervalle préconisé par le Codex Alimentarius, 2001, et qui ne dépasse pas 21%.

Selon Draiaia (2016), la fermentation devient presque rare dans les miels ayant une teneur en eau inférieure à 19%. Notre échantillon analysé est donc considéré comme étant un miel d'une très bonne qualité vis-à-vis de la conservation et du stockage. Sa teneur en eau indique qu'il est mature, probablement dû a une bonne pratique d'extraction par l'apiculteur en donnant le temps qu'il faut pour cette opération avec une utilisation des ruches modernes qui permettent une bonne maturité.

En outre, la cristallisation des miels est directement liée à quelques paramètres sensibles tels que la teneur en eau. Les miels avec une teneur en eau de 15 à 18% ont une bonne cristallisation (Manikis et Thrasyvoulou, 2001). C'est le cas de notre échantillon étudié.

V.1.5. L'analyse polarimétrique

Afin d'obtenir un pouvoir rotatoire mesurable 20g de matière sèche sont dissouts dans un volume total de 100 ml afin d'obtenir une solution mère de miel à une concentration de 200g/l. Cette dernière a été dilué pour obtenir trois solutions filles, additionnées d'ammoniac. Les solutions préparées et leurs pouvoirs rotatoires sont présentées sur la **Figure V-1** et le **Tableau V-2**.

Tableau V-2 : Angles de rotation des dilutions préparées

Concentration (g/l)	100	50	25
Angle de rotation (α)	/	/	-0.5

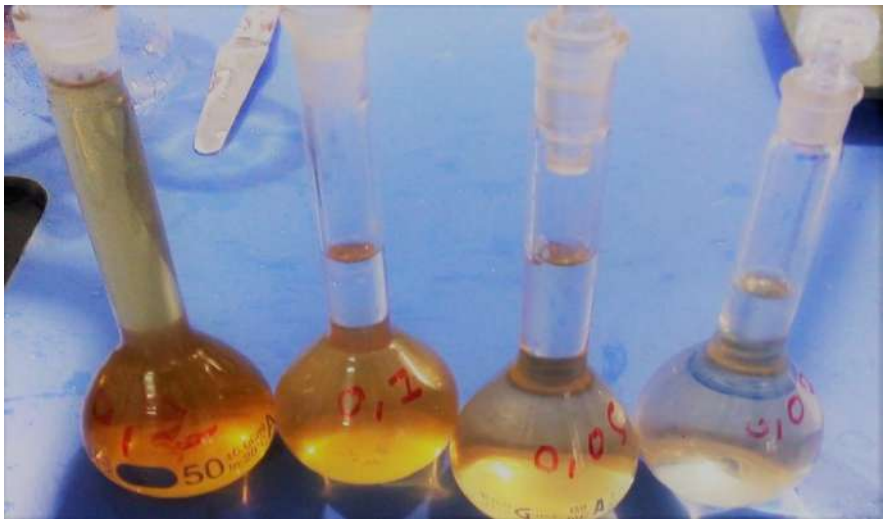


Figure V-1 : Photo des dilutions de miel préparées à partir d'une solution mère de 200g/l.

Le pouvoir rotatoire, également appelé « activité optique », est la caractéristique optique que possèdent les sucres en déviant le plan de la lumière polarisée (Nair, 2014). Les composés induisant une déviation du vecteur vers la droite sont qualifiés de « dextrogyres » (c'est le cas du saccharose) tandis que les composés induisant une déviation du vecteur vers la gauche sont dits « lévogyres » (le fructose en fait partie) (Lequet, 2010). Le pouvoir rotatoire du miel est utilisé pour distinguer entre les miels de nectar et les miels de miellat et la majorité des miels de miellat ont des valeurs positives, tandis que, les miels de nectar ont des valeurs négatives (Nair, 2014).

La dilution correspondante à 25g/l a été lévogyre avec une déviation de -0.5. Selon le pouvoir rotative négative, l'origine nectarifère de notre miel est donc confirmée une 3ème

fois de plus. Ceci pourrait être une conséquence de la prépondérance normale du fructose dans ce miel.

V.1.6. Dosage des sucres réducteurs

Le volume de KMNO4 0.1 M obtenu au point d'équivalence est de 15 ml, ce qui donne selon l'**Annexe 2** une masse en sucre réducteurs de 300.03mg et en équivalent glucose de 329.8mg. Ceci correspond selon l'équation 5 (chapitre IV) à un taux en sucre réducteur de 60 % et en équivalent glucose de 65.96% (≈ 66%).

Les sucres représentent les principaux composants de tous les types de miel. Les réducteurs (sucre inverti) ; principalement le fructose et le glucose ont été jugé comme constituants majeurs du miel (Küçük *et al*, 2007). Louveaux (1968), précise que la composition en sucres permet dans certains cas d'identifier l'origine botanique de quelques miels monofloraux et la proportion des différents sucres présents dans un miel est très variable. Elle dépend, en effet, directement du type de fleurs butinées par les abeilles. Les sucres représentent de 95 à 99% de la matière sèche des miels. Chaque miel est susceptible de contenir une bonne dizaine de sucres : se sont des mono, di, tri, ou polysaccarides qui représentent les 80% du poids total de miel. Deux d'entre eux; le glucose et le fructose, dominent nettement et représentent prés de 80 % (Gleiter et al., 2006). Les proportions en glucose et fructose ne sont jamais équilibrées, ceci et dû à la composition des nectars en sucre réducteurs avec des quantités variables (Miriam et al., 2005). D'autres sucres tels que le maltose 7,2%, le saccharose 1,5% et quelque oligosaccharide 4,2% sont présents dans le miel (Shin et Ustinol, 2005).

Le Codex Alimentarius exige une teneur minimum en sucre réducteur de 60 % pour le miel de miellat ou mélanges avec miel de fleurs. Le taux de sucre dans notre miel (60%) est dans les limites ce qui indique que son origine peut être un mélange de miellat et de nectar. Ceci nous montre que le taux en sucre non invertis est important en négligeant les autres composés non glucidiques (100%-15% (teneur en eau)-60% (sucre réducteur)=25%).

V.2. Etude de l'effet antibactérien du miel

L'émergence de bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques a amené les chercheurs à essayer de trouver de nouvelles stratégies pour les combattre (Homrani, 2020). Il est actuellement reconnu que le caractère inhibiteur du miel est lié à ses propriétés physico-chimiques, ainsi qu'à la présence de plusieurs autres composants antimicrobiens (Yue Yew, 2015). L'activité inhibitrice de ces derniers peut être influencée par certains facteurs physicochimiques (pH et température) liés au traitement du miel lors de son utilisation en

thérapeutique. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'influence de ces deux paramètres sur le pouvoir inhibiteur du miel. Par la suite, l'estimation de la concentration minimale inhibitrice peut être réalisée une fois les optimals de température et de pH sont fixés. Il faut signaler que l'influence de la température et du pH a été testé avec *P. aeruginosa* (bactérie Gram-) et *S. aureus* (bactérie Gram +).

V.2.1. Effet de la température

Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) des deux souches obtenues pour le miel à une dilution de 75% traité aux différentes températures sont rapportés dans le **Tableau V-3** et présentés sur les **Figures (V-2, V-3)**.

Tableau V-3 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition sur les deux souches obtenues pour le miel dilué à 75% et traité à différentes températures.

Température (°C)	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*
20	15	12
40	15	12
55	15	12
75	14	12
85	12	9
95	10	9

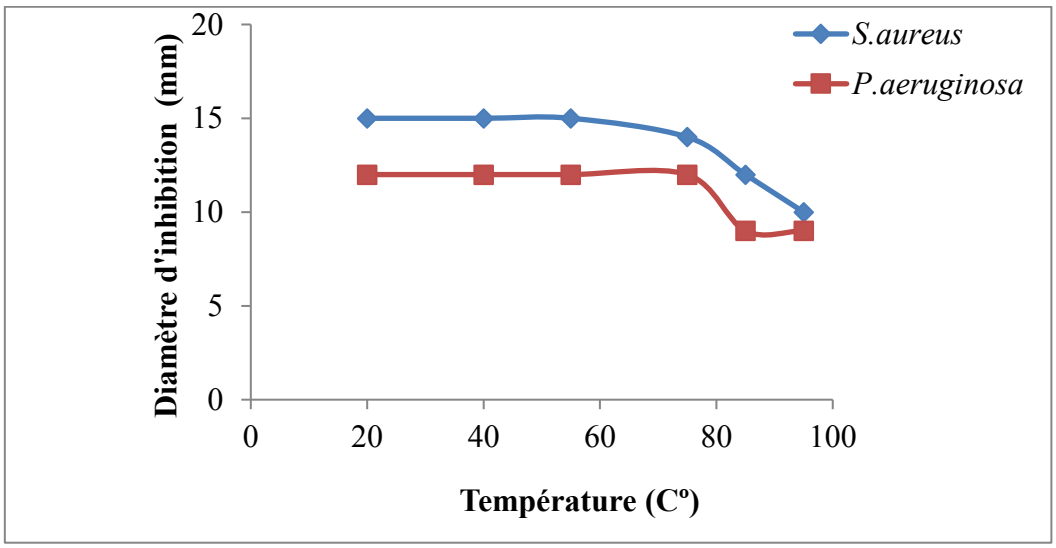


Figure V-2 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des deux souches obtenues pour le miel dilué à 75% en fonction de la température du traitement.



A B

Figure V-3 : Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75 % aux différentes températures : A- *Staphylococcus aureus ;* B- *Pseudomonas aeruginosa.*

Selon les résultats de l'antibiogramme obtenus, on constate que le miel dilué à 75% possède un effet sur les bactéries étudiées. Les deux souches sont sensibles vis-à-vis ce miel avec une zone d'inhibition variables selon la température (**Tableau V-3, Figure .V-2**).

Les souches testées sont sensibles à l'action du miel à l'état natif (sans chauffage). Ce dernier représente un milieu défavorable pour le développement des germes pathogènes grâce à sa composition: le pH acide de notre échantillon (3,89), est un inhibiteur de la croissance de nombreuses bactéries; l'hyperosmolarité du miel provoque une déshydratation des micro-organismes inhibant toute prolifération bactérienne, également le peroxyde d'hydrogène, qui est l'agent le plus responsable de l'effet bactéricide du miel [(Leshaf et Alahoum, 2018) ; (Brudzynski, 2006)]. L'eau oxygénée est produite par réaction enzymatique ; c'est la glucose oxydase, sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel qui permet sa production selon la réaction suivante **(site1)**:

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow[\text{Glucose-oxydase}]{} \text{Gluconolactone} + H_2O_2 \xrightarrow[\text{Catalase}]{} \text{Acide gluconique}$$

La réaction montre que la production d'eau oxygénée et d'acide gluconique résulte de l'oxydation de l'eau et du glucose. La catalase réduit l'eau oxygénée, ainsi la concentration en peroxyde dépend donc de l'activité de ces deux enzymes (site 1). Dans le miel mûr, la glucose

oxydase n'est plus active mais reste intacte. Si le miel est dilué avec un peu d'humidité (comme dans notre cas à 75%), l'enzyme est réactivée, puisque elle utilise l'eau dans son processus d'oxydation. Cette idée a été annoncée depuis plus de 14 siècles par notre prophète Mohamed qui insiste sur « boire du miel dilué ».

Le miel traité à 40 ºC, possède un effet antibactérien pratiquement identique au miel non chauffé (**Tableau V-3, Figure V-2**). Le traitement thermique du miel aux environs de 40°C n'altère pas son pouvoir inhibiteur, au contraire, il peut favoriser certaines réactions enzymatiques.

Le miel traité à 55 Cº montre encore une activité inhibitrice contre les microorganismes testés : les deux les souches avaient des zones d'inhibition de même ordre de grandeur que celle enregistrées avec les températures précédentes, ce qui signifie que le chauffage du miel n'a pas encore altéré son pouvoir antibactérien. La zone d'inhibition la plus élevée a été enregistré chez *Staphylococcus aureus* (**Tableau V-3, Figure V-2**).

Dans l'ensemble, le miel chauffé à 75ºC sauvegarde le même niveau d'activité inhibitrice contre les deux souches. Cependant, le traitement au-delà de 85°C provoque une diminution des zones d'inhibition de la croissance des deux souches (**Tableau V-3, Figure V-2**).

Des travaux antérieurs sur plusieurs types de miel (multifleurs, Harmel, jujubier, euphorbe, foret) dans les mêmes conditions (degrés de dilution, température et temps d'incubation) ont signalé une bonne stabilité du miel avec un effet stable maximal jusqu'à 55°C. Au-delà de cette température, l'effet inhibiteur diminue jusqu'à ce qu'il s'annule à 75°C [(Kebaili, 2005) ; (Bensaber et Zahraoui, 2012) ; (Cheikh Touhami, 2013) ; (Khelfi, 2016)]. Notre miel est donc plus stable et plus résistant aux fortes températures car son effet est encore maximal à 75°C et il n'est affecté qu'à partir de 85°C.

L'influence des fortes températures sur l'activité du miel a été signalé par plusieurs auteurs. Tosi. E et al., 2007, signalent que les changements dans l'activité antibactérienne est peut être due à la modification de l'activité enzymatique. Le miel perd ses propriétés (de moitié pour un chauffage à 80°C pendant 30 min, d'un quart pour un chauffage à 65°C pendant 5 minutes). Il est par conséquent préférable d'utiliser en thérapeutique un miel qui n'a pas été chauffé à plus de 40°C (Lequet, 2010). En effet, le miel contient des enzymes ; les plus connues sont la gluco-invertase, les alphas et bêta amylases, la catalase, la phosphatase, et la gluco-oxydase. Ces enzymes sont détruites par la chaleur. Leur présence ou leur absence peut servir d'indicateur de surchauffe du miel lorsqu'il est monté en température, pour faciliter sa manipulation, ce qui peut provoquer une dénaturation si la température utilisée est

excessive (Bonté et Desmoulière, 2013). Une étude menée par Tosi et *al*., 2004, a montré que la destruction de toute l'activité amylasique a nécessité un chauffage du miel à 80 ° C pendant 1,2 h, alors qu'il n'a fallu que 8,6 min pour l'inactivation de l'invertase. Ainsi, il a été aussi signalé que la glucose oxydase n'est pas seulement thermolabile, mais aussi photolabile (Balas, 2015). Selon Gonnet et Lavie (1960), si on chauffe le miel à plus de 90ºC, les résultats deviennent ininterprétables à cause d'un début de caramélisation qui transforme la nature même du miel. Il est apparent que la température et la période de chauffage doivent être contrôlées, car un taux excessif d'HMF est considéré comme indicateur de surchauffage et provoque la perte de la fraîcheur des miels (Draiaia, 2016).

Dans notre étude, l'effet antibactérien du miel chauffé au-delà de 75ºC sauvegarde encore son pouvoir inhibiteur contre *S aureus* à 85°C avec un effet minimum à 95°C. Une remarque similaire a été signalé par Khelfi (2016), pour le miel de foret vis-à-vis d'*E.coli* de collection. Ceci peut être attribué au fait que les substances peroxydes ne sont pas les seules responsables de l'effet antibactérien du miel (Bogdanov et Bulmer, 2001), Car l'activité antibactérienne à été retrouvé même, lorsque, la glucose oxydase est neutralisée aux fortes températures (85°C et 95°C), ceci suppose la présence d'autres facteurs ou molécules capables d'inhiber la croissance bactérienne. Donc il existe des inhibines non peroxydes qui contribuent à l'activité antibactérienne du miel (Nair, 2014).

V.2.2. Effet du pH

Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) des deux souches de collection enregistrés pour le miel à une dilution de 75% en variant le pH sont rapportés sur le **Tableau V-4** et la **Figure V-4**. Un aspect des résultats est présenté sur la **Figure V-5**.

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

pH	*Staphylococcus aureus*	*Pseudomonas aeruginosa*
2	10	11
4	15	12
6	14	12
9	12	12

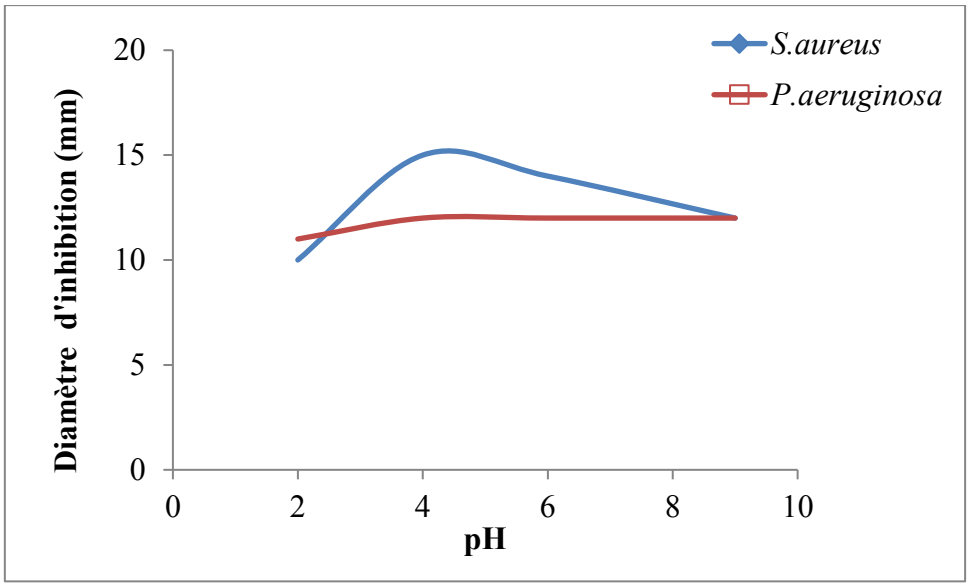
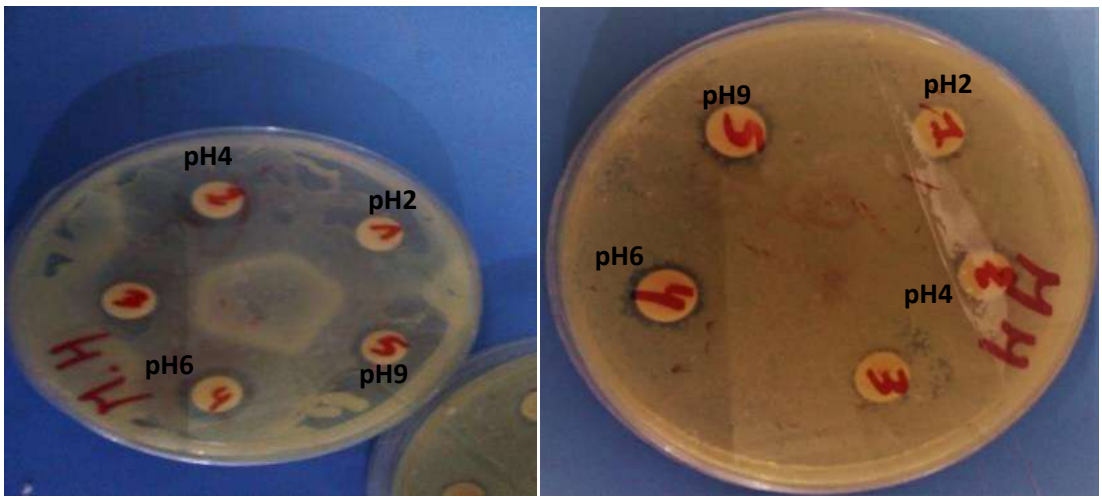


Figure V-4 : Variation des diamètres des zones d'inhibition des deux souches testées en fonction du pH du miel dilué à 75%.



A B

Figure : V- 5: Photos des zones d'inhibition obtenues pour le miel dilué à 75% aux différents pH : A- *Staphylococcus aureus ;* B- *Pseudomonas aeruginosa.*

D'après ces résultats, on constate que **(Tableau V-4**, **Figure V-4)**:

- A un pH=2, le miel (dilué à 75%) inhibe la croissance des deux souches testées mais avec des diamètres des zones d'inhibition très faibles à celles du pH natif (=4). Selon Draiaia (2016), le pH influence fortement la vitesse de dégradation des sucres et des enzymes : elle est plus rapide pour un pH faible (<3.5).
- En augmentant le pH à une valeur de 4 (pH natif du miel dilué à 75%), l'activité antibactérienne augmente avec des diamètres supérieurs aux précédents.
- A un pH=6, qui s'approche de la neutralité, le pouvoir antibactérien du miel est pratiquement identique à celui du pH natif.
- A un pH basique (pH=9), les souches étaient sensibles à l'action du miel: pour *P. aeruginosa*, la sensibilité est la même que celle enregistrée à pH4 et pH6. Les zones d'inhibions de *S. aureus* sont inférieurs à celle enregistrées aux pH 4 et 6.

Des travaux antérieurs ont été mené sur plusieurs types de miel de la région de Médéa (multifleurs, Harmel, jujubier, euphorbe et foret) et dans les mêmes conditions (pH et degré de la dilution). Ces travaux ont signalé des résultats similaires :

- ✓ pour le miel multifloral, Harmel et foret, un effet minime a été signalé aux pH acide qui augmente et deviens maximale aux pH natifs. Cet effet est stable jusqu'à la neutralité puis diminue aux pH basique [(Kebaili, 2005) ; (Cheikh Touhami, 2013) ; (Khelfi, 2016)].
- ✓ Pour le miel de Jujubier et Euphorbe, un effet minime a été signalé aux pH acide qui augmente et deviens maximale aux pH natifs. Cet effet est stable et maximal jusqu'aux pH basiques (Bensaber et Zahraoui, 2012).

En conclusion, le miel peut agir par:

- **Son acidité :** Le pH d'un miel varie en fonction de la quantité d'acide ionisable qu'il renferme (ions H^+) ainsi que de sa composition minérale (ions OH^-) (Halimi, 2018). Lorsqu'il est situé entre 3,2 et 4,5, il renforce l'activité antibactérienne du miel, cette acidité est principalement due à sa teneur en acide gluconique et en gluconolactone (Ryad, 2017). En effet, les miels à pH bas inhibent mieux la croissance et la prolifération des micro-organismes et donc présentent un meilleur pouvoir antibactérien (Julika et al., 2019). De plus, la production de 5-HMF est plus rapide dans les miels à pH faible (compris entre 3 et 3.5) (Nair, 2014). L'activité antibactérienne de notre miel reste la même après la neutralisation de son acidité (Leshaf et Alahoum, 2018). Il agit donc très peu « directement par son acidité ».

- **Sa glucose oxydase :** Enzyme productrice de H_2O_2 à effet antimicrobien. La glucose oxydase est particulièrement inactive dans le miel mur, elle n'est opérationnelle que lorsque le miel est dilué. Son pH optimal est plus basique que celui mesuré dans le miel non dilué (Hoyet. C, 2005). Il est de 6,1 avec néanmoins une bonne activité enzymatique entre 5,5 et 8 (Ryad, 2017). Le mécanisme d'action peut être donc :
  - ✓ Non péroxydasique, car le pouvoir inhibiteur de notre échantillon de miel est maximal dans une plage de pH située entre 4 (ou la glucose oxydase est supposée être inhibée) et 6 (ou l'activité enzymatique de la glucose oxydase est optimale).
  - ✓ Péroxydasique avec une glucose oxydase active dans une plage de pH plus étendue (entre pH4 et pH6). Faiblement active à pH acide (pH=2) et dont l'activité est acceptable à pH basique (pH=9).
- **Son effet osmotique et les inhibines non peroxyde:** car, la sensibilité des deux souches au miel à pH=9 peut être expliquée par d'autres facteurs qui contribuent à faire du miel un produit antibactérien, soit par l'effet de l'osmolarité qui est la conséquence de la forte teneur en sucre du miel. Le miel agit donc de manière osmotique, en provoquant une forte déshydratation des germes qui n'ont plus alors suffisamment d'eau pour survivre (Olaitan et al., 2007). Il peut aussi agir par d'autres molécules non altérées au pH basique, les plus importants sont les composés phénoliques (généralement les tanins et les flavonoïdes), les inhibines dites « non peroxydes » telles que des lysozymes et les substances volatiles et aromatiques du miel (Bendahou et Hasnat, 2002).
- **Un mécanisme mixte et qui est le plus probable:** Les substances peroxydes ne sont pas seules responsables de l'effet antibactérien du miel, nous avons un mécanisme synergique entre :
  - ✓ l'action de la peroxydase qui est optimale entre pH4 et pH6 (et aussi dans une plage de température située entre 20°C et 75°C) où l'activité du miel est maximale,
  - ✓ l'effet de l'osmolarité et les inhibines non peroxyde, car l'activité antibactérienne a été retrouvée même, lorsque, la glucose oxydase est inhibée : aux pH2 et pH9 et aux fortes températures (contre *S aureus*) (Cf. effet de la température, Figure V-3).
  - ✓ l'effet de l'acidité du miel qui renforce l'activité enzymatique de la glucose oxydase à pH4.

V.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice(CMI)

L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice a été réalisé dans les conditions optimales de pH et de température (pH natif et Température ambiante) en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Pour cela nous avons évalué le pouvoir inhibiteur du miel à des concentrations différentes sur trois espèces bactériennes de collection : une à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et deux à Gram négatif *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Une inhibition de la croissance bactérienne a été observé sur les trois souches bactériennes avec des diamètres qui varient avec les dilutions **(Tableaux V-5, V-6, V-7)**. Nous avons remarqué la présence de deux types d'inhibition pour *S. aureus* et *E. coli* :

- ✓ une inhibition partielle qui apparait sous forme d'un tapis moins dense autours des disques. Ce tapis est plus clair aux bords des disques (Exemple *S. aureus* **Figure. V-7)**.
- ✓ Une inhibition totale qui se manifeste par des zones transparentes **(Figure. V-7)**.

Le diamètre des zones d'inhibition (totales et partielles) diminue avec la diminution de la concentration du miel jusqu'aux basses concentrations (<33% pour *S. aureus* et <66% pour *E.coli*) où l'inhibition totale disparait avec apparition de zones d'inhibition partielles très claires juste autours des disques. Cependant, ces dernières ne sont pas considérées dans l'estimation de la CMI : la croissance au niveau de ces zones est minime mais elle n'est pas totale. Contrairement à *E.coli* et *S.aureus*, le phénomène d'inhibition partielle n'apparait pas pour *P.aeruginosa.* Une zone inhibition totale apparait aux fortes concentrations (75% et 66%). Elle est minime à 50% et 33% et absente aux faibles concentrations (25% et 16%).

L'eau est indispensable au processus d'oxydation, c'est ainsi que le peroxyde d'hydrogène se forme uniquement dans le miel non-mur ou dilué, dans le miel mur, le processus est bloqué, avec possibilité de réactivation par dilution (Bogdanov et Blumer, 2001). Dold et Witzenhausen ont inventé le terme « numéro inhibine » en 1955 pour décrire le degré de dilution auquel un miel conservera son activité antibactérienne. Les travaux de Rüegg et al., 1981, ont utilisé l'activité d'eau (la valeur *aw* et non la teneur en eau). Les valeurs *aw* du miel varient entre 0,55 et 0,75. Les miels dont l'*aw* est < 0,60 peuvent être, du point de vue microbiologique, qualifiés de stables (Bogdanov et al., 1987).

La présence de deux types d'effet du miel a été signalé par Merah *et al*, 2010 sur les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli, et Pseudomonas aeruginosa*): un effet bactéricide sur les zones les plus proches des disques imprégnés du miel et un effet bactériostatique sur les zones relativement loin des disques. Dans le premier cas, la croissance est inhibée

définitivement puisque les bactéries sont tuées, alors que dans le deuxième cas, un tapis bactérien réapparait après l'inhibition puisque les microorganismes ne sont pas tués.

Tableau V-5 : Effet des dilutions de miel sur *Staphylococcus aureus*.

	16.66%	25%	33%	50%	66.6%	75%
Observation générale	Présence de grandes zones « d'inhibition partielle » dont le diamètre diminue avec la concentration.					
Diamètre d'inhibition (mm)	11	10	12	13	14	15
Nature des zones d'inhibition	Zones d'inhibition partielle plus claires		Zones d'inhibition totale			
Conclusion : Diamètre d'inhibition totale (mm)	9mm (Diamètre du disque)		12	13	14	15

Tableau V-6 : Effet des dilutions de miel sur *Escherichia coli*.

	16.66%	25%	33%	50%	66.6%	75%
Observation générale	Présence de grandes zones « d'inhibition partielle » dont le diamètre diminue avec la concentration					
Diamètre (mm)	10	10	11	11	10	12
Nature des zones d'inhibition	Zones d'inhibition partielle plus claires				Zones d'inhibition totale	
Conclusion : Diamètre d'inhibition totale (mm)	9mm (Diamètre du disque)				10	12

Tableau V-7: Effet des dilutions de miel sur *Pseudomonas aeruginosa*.

	16.66%	25%	33%	50%	66.6%	75%
Diamètre d'inhibition totale (mm)	9	9	9-10	9-10	11	12

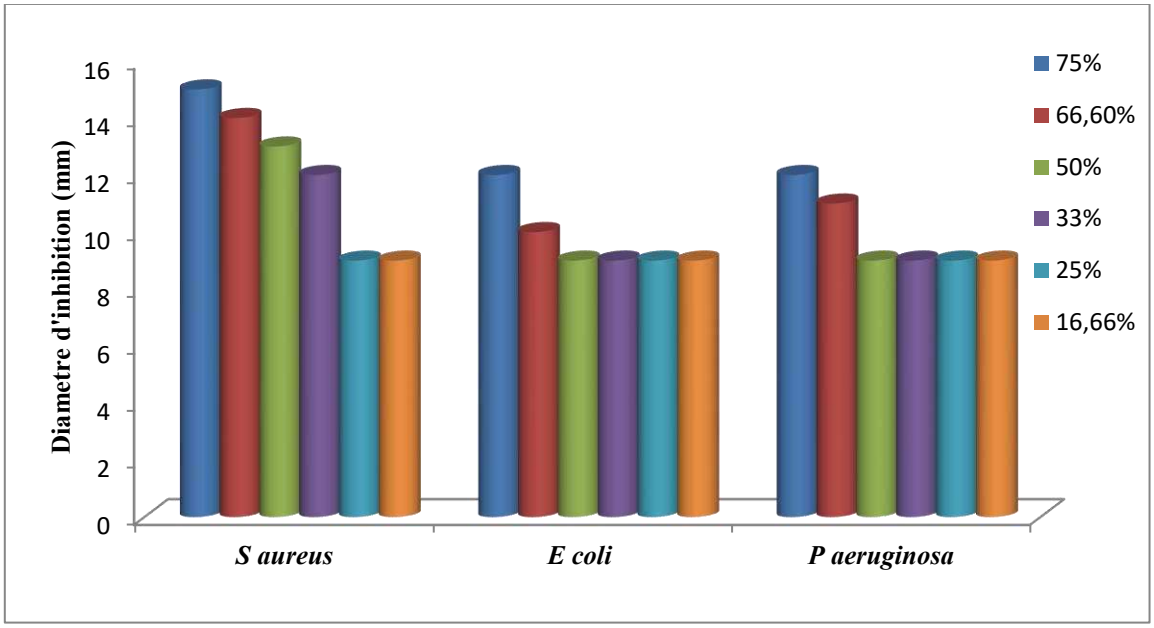
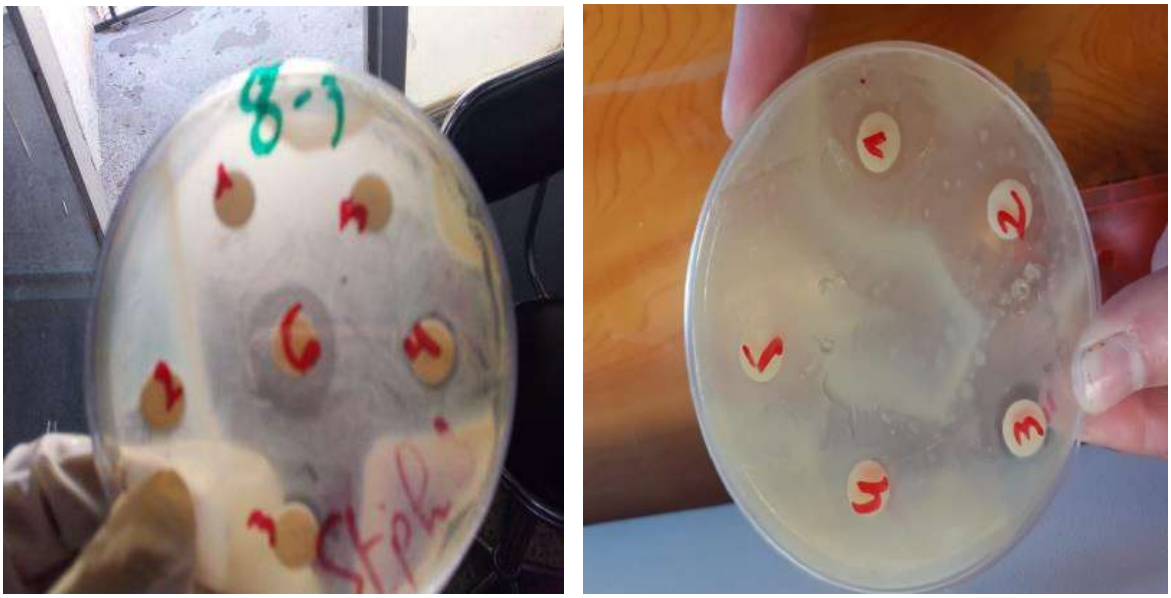


Figure V-6 : Variation des diamètres des zones d'inhibition totale des souches testées selon les dilutions de miel.



[1-6] = [16%-75%] **[1-5] = [75%-25%]**

Figure V-7 : Détermination de la CMI du miel pour *Staphylococcus aureus* ATCC : Résultats de deux essais.

En considérant les zones d'inhibition totales **(Figure V-6)**, nous pouvons dire que La CMI:

- ✓ pour *S. aureus* est située entre 25% et 33%.
- ✓ pour *E. coli* est située entre 50% et 66% .
- ✓ est estimée de 50% pour *P. aeruginosa*.

Staphylococcus aureus est la souche la plus sensible suivie de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli.* Notre miel est actif sur les Gram+ et les Gram-, ce qui indique son large spectre antibactérien. Il est plus actif sur les Gram+ que les Gram-.

Nos résultats sont comparables à ceux de Hammoudi et Bouderhem (2009), qui ont trouvé que *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible vis-à-vis des miels algériens alors qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont moyennement sensibles. Feddaoui et Kerdouci (2013) ont travaillé sur des miels de Guelma classés selon la nutrition comme multi floraux. Ils ont trouvé que ces miels sont dotés d'un large spectre d'activité inhibitrice sur les souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif où ils présentent un fort pouvoir sur *staphylococcus aureus*, moyen sur *Pseudomonas aeruginosa* et un pouvoir faible sur *Escherichia coli,* car les plus grands diamètres d'inhibition ont été observé sur *Staphylococcus aureus* alors que *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* présentent des zones d'inhibition d'un diamètre plus faible. D'après Djaafri et *al.,* (2014), *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible vis-à-vis du miel de Ghardaïa alors qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont moyennement sensibles. Notre étude est aussi comparable à l'étude de Kebaili (2005), qui a travaillé sur le miel de forêt de la wilaya de Médéa : *S. aureus* est la souche la plus sensible à l'effet inhibiteur du miel par rapport à *E.coli***.** Hamoumane et Achite (2018) ont signalé la même remarque en testant des miels algériens mono et multi multifloraux provenant de diverses régions (Ain Defla, Tipaza, Blida, Médéa). Ces auteurs ont attribué cette différence de sensibilité à la différence de structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-. De plus, il existe dans le miel un facteur de croissance pour les souches d'*E.coli*. Ce facteur neutralise dans certaines conditions l'action du facteur antibiotique, notamment lors de l'emploi des extraits à des doses faibles dans le milieu de culture (Gonnet et Lavie, 1960).

Enfin, la CMI estimée pour *S.aureus* de collection (25%-33%) est identique avec celle trouvé par Khelfi (2016), qui a étudié le miel de forêt de la région de Benchikao, wilaya de Médéa. Cependant, elle est plus importante par rapport à la CMI trouvé par Kebaili (2005) (< 25%) qui a travaillé sur un miel de forêt récolté de la commune de Derrag, wilaya de Médéa. Concernant *E.coli*, notre CMI (50-66%) est proche de celle trouvée par ces deux

études (33% -50%). Ces différences sont dues à l'origine florale des miels au sein de la même région. La qualité de la méthode est aussi un facteur important à prendre en considération : selon Vandepitte *et al* (1994) ; Ducharme et Martineau (2001), l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est un procédé largement répandu du fait de sa simplicité. Cependant, la qualité des résultats peut varier en fonction de plusieurs facteurs :

- **Densité de l'inoculum :** Si l'inoculum est trop petit, les zones d'inhibition seront plus étendues. Des souches relativement résistantes peuvent alors être considérées comme sensibles. A l'inverse, si l'inoculum est trop important, la zone d'inhibition sera réduite et des souches sensibles peuvent alors être considérées comme résistantes.
- **Minutage de l'application des disques :** Si les boîtes de Pétri, après avoir été ensemencé avec la souche à tester, sont laissées à la température ambiante pendant longtemps qu'il n'est recommandé, la multiplication de l'inoculum peut avoir lieu avant l'application des disques. Cela entraîne une diminution du diamètre de la zone d'inhibition et peut faire qu'une souche sensible soit considérée comme résistante.
- **Température d'incubation :** Les tests de sensibilité sont normalement réalisés à 35°C pour obtenir une croissance optimale. Si l'on abaisse la température, la durée nécessaire pour obtenir la croissance s'allonge et il en résulte des zones plus grandes.
- **Durée d'incubation :** La plupart des techniques requièrent une durée d'incubation située entre 16 et 18 heures. Cependant, en cas d'urgence, un rapport provisoire peut être établi au bout de 6 heures.
- **Profondeur de la gélose :** Des zones d'inhibition excessivement importantes peuvent se former sur des milieux trop fins ; l'inverse est valable pour des milieux trop épais. Des variations mineures de la profondeur de la couche de gélose ont un effet négligeable. La profondeur doit être d'environ 4 mm soit environ 25 ml de milieu pour une boîte de Pétri de 90 mm.
- **Activité des disques imprégnés d'antibiotique :** Le diamètre de la zone d'inhibition est lié à la quantité de médicament présente dans le disque.
- **Composition du milieu de culture :** Le milieu influe sur la taille de la zone d'inhibition par son effet sur la vitesse de croissance du germe, la vitesse de diffusion de l'antibiotique et l'activité de l'agent utilisé. Pour cela une confirmation des ces résultats est souhaitable par la méthode de la dilution en milieu liquide.

Conclusion

Conclusion

Les thérapies de médecine traditionnelle, que l'on appelle aussi médecine douce, complémentaire, naturelle, alternative, parallèle, non conventionnelle ou parfois la médecine holistique qui se sont développées différemment, ayant été en grande partie influencé par la culture et les conditions historiques dans lesquelles leurs évolutions ont commencé, afin de maintenir le bien-être et traiter, diagnostiquer ou prévenir la maladie (Site1 ; Adamo, 2012). Cependant, la recherche et l'éducation sont des éléments fondamentaux à prendre en compte dans la gestion de cette médecine (Maddalena, 2005). Dans cet objectf, notre travail vise à faire une étude de l'effet inhibiteur naturel d'un miel de forêt associé aux extraits de la Globulaire.

L'étude réalisée sur le miel de forêt de la région de MEDEA révele sa conformité vis-à-vis ses caractères physicochimiques (densité=1.39, pH=3.89, teneur en eau=15.6%, conductivité éléctrique=0.691 ms/cm) témoignant l'appartenance probable à une origine néctarique. Cette dernière a été également confirmé par son pouvoir rotatoire Lévogyre et son taux en sucres réducteurs (aux environ de 60%). Le dosage des sucres nous donne une appréciation de l'osmolarité du miel qui participe en grande partie dans le pouvoir antibactérien. L'étude de l'effet inhibiteur du miel sur des souches bactériennes de collection montre que, *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible avec une CMI située entre 25% et 33% suivie de *Pseudomonas aeruginosa* avec une concentration minimale inhibitrice estimée de 50%. *Escherichia coli* est la souche la plus résistante avec une CMI située entre 50% et 66%. Le miel de forêt possède donc un spectre antibactérien large qui s'étend sur les bactéries Gram(-) et Gram(+) ; il est plus actif sur les Gram (+). L'étude de l'influence de la température sur l'activité antibactérienne du miel a montré que, ce dernier dilué à 75% et chauffé au-delà de 75°C perd une partie de ses propriétés antibactériennes suite à la dénaturation de ces enzymes thermolabiles. Le pH optimal de la glucose oxydase du miel est situé entre 4 et 6.

L'effet inhibiteur de notre miel découle le plus possible d'un mécanisme mixte entre l'action des substances peroxydes (action de la peroxydase), l'effet de l'osmolarité ainsi que les inhibines non peroxydes et l'effet de son acidité qui renforce l'activité enzymatique de la glucose oxydase à pH4.

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

En termes de perspective et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant :

- D'approfondir l'étude de l'activité antimicrobienne du miel de forêt sur d'autres espèces pathogènes bactériennes et phongiques.
- Effectuer des analyses physico-chimiques sur une large gamme d'échantillons de miels du pays afin de déterminer la nature des composés à activité antimicrobienne selon l'origine florale du miel.

Compte tenu de la pandémie Covid-19, nous n'avons pas réalisé une partie importante du protocole expériemental envisagé. L'étude de l'effet antibacteriens des extraits de *Globularia alypum* étais aussi un deuxieme objectif ciblé. Les parametres à optimiser sont : la méthode et le solvant d'extraction, le rapport (m/v) ainsi que la composition de la matiere végétale à extraire. Une étude phytochimique de la plante a été aussi programmé. Un troisième objectif non atteint aussi est la recherche d'un effet synergique en associant le miel avec les extraits de la plante afin d'aboutir à une formule optimale « miel-extrait » donnant le meilleur effet antibactérien.

En perspective, nous espérons pouvoir terminer cette recherche dans un futur proche afin de répondre totalement à notre problématique : la science de s'arrêtera pas et elle n'a pas de limites.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abousseddik, B. (2008). «Les miracles du miel. Merveilles Coraniques». Texte parus dans El Moudjahid.

Achouri, I. Aboussaleh, Y. Sbaibi, R. Chemissi, H. Bengueddour, R. (2015). Comparison of the physico-chemical quality of honey Ziziphus sp (Sider) and Acacia sp (Samar) consumed in the United Arab Emirates. International Journal of Innovation and App.

Adamo, B. (2012). Perception et utilisation de la médecine non conventionnelle par les médecines généralistes. Thèses pour l'obtention de diplôme d'Etat en médecine générale. Université paris 13, faculté de médecine de Bobigny''Léonard de Vinci''. P7.plied Studies, 10 (1), 184.

Ali-Raeessi, F. M. Aslani, J. Raeessi, N. Ali-Akbar, H.K.Z. Raeessi, F. (2013). «Honey plus coffee versus systemic steroid in the treatment of persistent post-infections cough: a randomized controlled trial». Primary Care Respiratory, vol.22, n°3, p.325-330.Pubmed.

Al Somal, N. Coley, KE. Molan, PC. Hancock, BM. (1994). Susceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. J R Soc Med. 87: 9-12.

Alvarez, LM. (2010). Honey Proteins and their Interaction with Polyphenols. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science, Univ. Brock, 93 p.

Al-waili, N. Salom, K.H. Butler, G.L. Al ghamdi, A.A. (2011). Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control, j med food 14 (10), 1079–1096.

Alzoreky, N.S. Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int J Food Microbiol; 80:223-30.

Amissis-Ouchemoukh, N. Abu-Reidah, I.M. Quirantes-Piné. R. Rodguez-Pérez, C. Mdani, K. Fernandez-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, A. (2014). Phytochem Analysis, 25, 105.

Amri, A. (2006). Evaluation physico-chimique et détermination de l'origine botanique de quelques variétés de miel produites à l'Est d'Algérie. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en Biochimie. Université Badji Mokhtar-Annaba. P : 11.

Amri, A. (2011). Contribution à l'étude approfondie de Quelques miels produits en Algérie : Aspect physico-chimique et botanique. Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat. Université Baji Mokhtar-Annaba. *p* 221.

Anand, J. Sun, Y. Zhao, Y. Nitiss, K.C. Nitiss, J.L. (2018). Detection of Topoisomerase Covalent Complexes in Eukaryotic Cells. *Methods Mol Bio.* 1703:283-299.

Aouati, H. (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire de magister. Université Mentouri. Constantine. P : 8.

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

Arnaudon, N. (2011). Le miel utilisé comme thérapeutique. Mémoire en pharmacie. 19p.

Baba Aissa, F. (2000). Les planes médicinales en Algérie Edit. Bouchéne et AD. Diwan, Alger, p 368.

Bail, S. Buchbauer, G. Jirovetz, L. Denkova, Z. Slavchev, A. Stoyanova, A., Schmidt, E. Geissler, M. (2011). Antimicrobial activities of roman chamomile oil from France and its main compound [en ligne]. Vol 21, N° 3, p : 286.

Balas, F. (2015). Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale revue de la littérature, thèse pour un diplôme d'état de docteur en médecine, la faculté de médecine de Nice, p : 27-29-30.

Baruah, C. C. Gupta, P. P. Nath, A. Patnaik, L. G. K. Dhawan, B. N. (1998). Pharmacological Research, 38, 6.

Bassetti, M. Ginocchio, F. Mikulska, M. (2011). New Treatment Options against Gram negative Organisms. Dans: Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine. Springer Science Business Media LLC .pp 501-515.

Bazoche, M. (2011). «Les produits de la ruches». Edition GFA. Paris, 159 p.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée traditionnelle marocaine: Médecine arabe ancienne et savoir faire. ISBN 2-910728-03-X. Ibis Press.

Bellakhdar, J. Claisse, R. Fleurentin, J. Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology. 35: 123-143.

Beloued, A. (2001). Médicinal plants in Algeria. University publications office, Algiers, ISBN: 9961.0.0304.4, pp: 277.

Ben amor, B. (2008). Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extractions de principes actifs ; testuration par Détente instantanée contrôlée DIC. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de la ROCHELLE.

Bendahou, H. Hasnat, N. (2002). Contribution à l'étude de l'influence de durée de conservation sur la qualité du miel dans la wilaya de Mascara ; Mémoire d'ingéniora en sciences alimentaires, centre universitaire de Mascara.

Ben Hassine, B. Bui, A. Mighri, Z. Cave , A. (1982). Plantes Médicinale et phytothérapie.16(3). 197-205.

Beniston, N. T. Beniston, W. S. (1984). Fleurs d'Algérie. Ed Entreprise nationale du livre, Alger, Algérie, p53.

Bensaber, I. Zahraoui, F. (2012). Etude de l'activité antibactérienne de certains types de miel à une association avec certain extraits de plantes. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés. Université Dr YAHIA Fares De Médéa. P : 82-83-84.

Benzeggouta. N, (2005). Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine.

Berahou. A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A., Jana M, Gadhi C.A. (2007). Antibacterial activity of Quercus ilex bark's extracts. J Ethnopharmacol; 112:426-9.

Bessas, A. (2008). «Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le Sud Algérien». Mémoire d'obtention de diplôme d'ingénieur d'état en biologie. Université Djilali Liabes-Sidi Bel Abbes, Algérie. En français.

Bettar, S. Gonzalez-Miret, L.M. Hernanz, D. Marconi, A. Heredia F.G. Terrab, A. (2015). Characterisation of maroccan Spurge (*Euphorbia*) honeys by their physico-chemical characterics, mineral contents and colour.Arabian Journal of Chemistry. https://doi:10.1016/j. arabjc.2015.01.003.

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

Blanc, M. (2010). Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Limoges, France. 141p.

Bock, B. (2009). Tela botanicas : base de données nomenclature de la flore de France.

Bogdanov, S. Rieder, K. Rüegg, M. (1987). Neue Qualitätskriterien bei Honiguntersuchungen, Apidologie, 18, 267-278.

Bogdanov, S. (1999). International Honey Commission. Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey commission. Bee-World. .80(2):61 69.

Bogdanov, S. Blumer, P. (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel : centre suisse de recherche apicoles. Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld. CH- 3003 Berne.

Bogdanov, S. Lullmann, C. Martin, P. (2001). Qualité du miel et norme international relative au miel. Rapport de la commission international du miel. Abeille Cie N° 71-4.1 2p.

Bogdanov, S. Bieri, K. Gremaud, G. Iff, D. Kanzig, A. Seiler, K. Stockli, H. et Zurcher, K. (2003). Produits Apicoles. 23 A Miel, 1-37.

Bogdanov, S. Ruoff, K. Oddo, P.L. (2004). Physicochemical Methods For The Characterisation Of Unifloral Honeys .Apidologie .35:17p.

Bogdanov, S. Gallmann, P. Stangaciu, S. Cherbuliez, T. (2006). Produits apicoles et santé. Département fédéral de l'économie DFE. Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, CH-3003 Berne P : 6.traduction Evelyne Fasnacht.

Bogdanov, S. Tomislav, J. Sieber, R. Gallmann, P. (2008). «Honey for Nutrition and Health». American Journal of the College of Nutrition, vol. 27, p. 677-689.

Bonilla, F. Mayen, M. Merida, J. Medina, M. (1999). Extraction of compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. Food Chemistry, 66, 209-215.

Bonté, F. Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. *Actualites Pharmaceutiques*, *52*(531), 18–21. https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.10.004.

Bouderherm, A. Hammoudi .E . (2009). L'effet antimicrobien du miel, thèse d'étude supérieures en biologie , Université Kasdi –Merbah ouargla.pages:47.

Bouguerra, M. (2012). Etudes de l'activité biologique de l'huile essentielle extraite des graines de Foeniculum vulgare MILL. Enrue de son utilisation conservatrice alimentaire. Thèse Magister. Biotechnologie. Université Montsouris, contiens p14.

Boulaaba, I.A. (2019). Place Du miel à l'officine, Thèse de doctorat, Faculté De Pharmacie De Marseille.

Boullard, B. (2001). Dictionnaire des plantes médicinales du monde, Edition Estem.

Boulos, L. (2015). Médicinal Plants of North Africa, Reference Publications Inc. Algonac, Michigan, Unied States, p286.

Bouti, A. Benguerba, A. Kitouni, R. Bouhroum, M. Benayache, S. Benayache, F. (2008). Chem. Pharma. Compd, 44, 543.

Brandao, M.G. Krettli, A.U. Soares, L.S. Nery, C.G. Marinuzzi, H.C.J. (1997). Ethnopharmacol, Vol 57, 131–138.

Brudzynski, K. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. Canadian Journal of Microbiology.

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

Bush, K. (2009). The importance of β-lactamases to the development of new β-lactams. Chapitre 12. Dans: Antimicrobial Drug Resistance, Humana Press, a part of Springer Science Business Media, LLC. pp. 135-141.

Cetam (Centre d'Etudes Techniques Apicoles de Moselle). (2010). Les analyses. Disponible sur : http://www.cetam.info/site/2010/07/24/les-analyses/ (page consultée le 17/11/2014).

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

Chaudhuri, R.K. Sticher, O. (1979). Structure of two highly oxygenated irridoïdes glucosides from *Globularia alypum*, Tetrahedrom Letters *54,* 3149-3152.

Chevallier, A. (2001). Encyclopedia des plantes médicinales. Edit. La rousse, Paris, pp16, 293, 295.

Cheikh Touhami, S. (2013). Etude de l'activité antibactérienne de certains types de miel en association avec certains extraits de plantes. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés. Université Dr YAHIA Fares De Médéa. P : 63-64-65-66-67.

Chograni, H. Riahi, L. Zaouali, Y. Boussaid, M. (2011). Polyphones, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum L*. (Globulariaceae). African Journal of Ecology 51: 343-34.

Chouia, A. (2014). Analyses polliniques et caractérisations des composés phénoliques du miel naturel de la région d'Ain zaâtout. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en .Biologie. Université Mohamed Khider- Biskra. *p* 62.

Clément, H. (2011). Le traité Rustica de l'apiculture. Rustica Ed. 528 p.

Codex Alimentarius Commission. (1993). Revised Codex Standards for Sugars and Honey; CX 5/10.2; CL (1993)/14-SH; via delle Terme di Caracalla, Rome.

Codex Alimentarius. (2001). Revised codex standard for honey. Codex standard 12 1981, Revue, 1(1987). Vol (12): 1-10.

Cornaglia, G. Giamarellou, H. Rossolini, GM. (2011). Metallo-b-lactamases: a last frontier forblactams .Lancet Infectious Diseases, 11: 381-393.

Couquet, Y. (2013). Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. Actualités pharmaceutiques. 22-25.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12 (4), 564- 582.

Dally, H. (2008). Le refractomètre un outil essentiel technique. Abeille. Cie N°122, p30.

Dancy, A. (2015). Le Tao du Pollen et L'Art des aiguilles et du Feu. Mémoire de fin d'études au Centre Imhotep. P 57.

Daoudi, S. (2015). Mécanique des fluides, manuel des cours, Université de Bordj Bouarréridj, 52p.

Dellile, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie, Edition Berti, Alger, PP : 240(P : 131-132).

Delphine, I. (2010). « Le miel et ses propriétés thérapeutiques». Thèse du doctorat.

Descottes, B. (2009). Plaies et cicatrisation par le miel. La Phytothérapie Européenne, N° 49 Phytothérapie, 7, 112-116.

Desmoulière, A. (2013). Le miel, de remarquables propriétés cicatrisantes. Actualités pharmaceutiques. N° 531 : p17.

Djaafri, F. Rezzougn, S. Ounis, K. (2014). Caractérisation physico-chimique et effet antibactérien de quelques types des miels. Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Agronomie. Spécialité : Technologie alimentaire. Université Kasdi Merbah Ouargla. P : 1.

Djerroumi, A. Nacef, M. (2004). 100 plantes médicinales algériennes, Edition Kasr al Kitab, PP : 160(80-81).

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

Donadieu, Y. (2008). Les Produits De La Ruche. Thérapeutiques naturelles. Edit, Maloine S. A, Paris.

Draiaia, R. (2016). Caractérisation physico-chimique et appellation botanique des miels Algériens (Cas des ruches langstroth). THÈSE En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat. Sciences En Biochimie .P : 47-82-83-88-96.

Ducharme, M.P. Martineau, P. (2001). Principes d'utilisation des antibiotiques. Dans : Association nationale des enseignants de Pharmacie clinique et thérapeutique, eds. Pharmacie clinique et thérapeutique. 2éme édition. Paris : Masson, 876-94.

Ducrot, C. Fric, D. Lalmanach, A.C. Monnet, V. Sanders, P. Schouler, C. (2017). Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage. INRA Prod. Anim., 30, 77-88.

El-Metwally, A.A.E. (2015). Factors Affecting the Physical and Chemical Characteristics of Egyptian Bee honey. Ph.D. Thesis, Fac. Agric. Cairo Univ., 320p.

Élodie, C. (2013). Le miel : composition et technique de production. Mémoire de master de traduction italien-français .Université Sorbonne Nouvelle – Paris 3. *p* 103.

Emmanuelle. (1996). Les Constituants Chimiques du Miel. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. Apiservices, Galerie Virtuelle apicole.

Emmanuelle, H. Julie, C. Laurent, G. (1996). Les Constituants Chimiques du Miel. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. APISERVICES, Galerie Virtuelle apicole.

Es Safi, N. Khalifi, S. Kerhoas, L. Kollmann, A. El Abbouyi, A. Ducrot, H. (2005). P.Nat.prod. 68(8), 1293-1296.

Es-Safi, N. Khalifi, S. Kerhoas, L. Kollman, A. El Abbouyi, A. Ducrot, P.H. (2006). Irridoïdes glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum L. (*Globulariaceae).Chem. Pham .Bul, 54:85-8.

Es-Safi, N. Kollman, A. Khlifi, S. Ducrot, P.H. (2007). Antioxidative effect of Compounds isolated from *Globularia alypum L*.Structure-activity relatioshipe.LWTFood. Sci.Technol, 40:1246-52.

F.A.O. (2011). (Food and Agriculture Organization).Database result; FAO-STAT.

Fallico, B. Zappala, M. Arena, E. Verzara, A. (2004). Effect of conditioning on HMF content in unifloral honeys. Food chemistry.85: 305–313.

Feddaoui, C. Kerdouci, S. (2013). Effet antibactérien du miel. Mémoire de master pour l'obtention de diplôme « Microbiologie de l'environnement ». Université 8Mai 1945.

Fehri, B. Aiach, M. Mueem, K. (2012). Active spermatogenesis induced by a reiterated administration of *Globularia alypum* aqueous leaf extract, Pharmacognosie research 4(3):138-14.

Ferrazzano, G.F. Amato, I. Ingenito, A. Zarrelli, A. Pinto, G. Pollio, A. (2011). Plant polyphénols and their anti-cariogenic properties: a review. Molecules, 16, pp 1486-507.

Finola, M.S. Lasagno, M.C. Marioli, J.M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. Food chem. 100:1649-1653.

François, L. (2017). «La texture du miel. Journal aliments naturels et biologiques». En ligne www.essentielle-coop. Consulté le 5 mai 2017.

Garcia, M.C. Perez, A.C. Harrara, A. (2001). Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. Food Sci. Tech. Int., 7: 155 - 158.

Gaussen, H. Leory, H. F. (1982). Précis de botanique (Végétaux supérieures), 2ème édition, p412.

Geoff, B. Sue, F. Denise, G. Sarah, G. (2006). Botanica : Encyclopédie de botanique et d'horticulture, Edition : Place des victoires, p 751.

Gheorghiade, M. Van Veldhuisen, D. Colucci, W. (2006). Contemporary Use of Digoxin in the Management of Cardiovascular Disorders, 113: 2556 – 2564.

Gheldof, N. Engeseth, N.J. (2002). Antioxidant capacity of honey from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. J Agric Food Chem 50:3050–5.

Ghnimi, W. (2015). Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Thèse de Doctorat en Cotutelle : Université de Lorraine(France) et université de Carthage (Tunisie). Domaine: Chimie/ biologie. P: 1.

Gleiter, R. A. Horn, H. Isengard, H. D. (2006). Influence of type and state of crystallization on the water activity of honey. Food Chemistry, 96: 441-445.

Gonnet, M. Lavie, P. (1960). Influence du chauffage sur le facteur antibiotique Présent dans les miels. Les Annales de l'Abeille, INRA Editions, 3 (4), pp.349-364. hal-00890141.

Gonnet, M. (1982). le miel, composition, propriétés et conservation.2éme ed, opida echauffour, france. 1982 ; 31 pages.

Gras, G. Choutet, P. (2010).Prescription et surveillance des antibiotiques. La Revue du Praticien ; 60: 573-579.

Guerriat, H. (2000). « Etre performant en Apiculture». Édition Rucher du Tilleul. 415p.

Haddouchi, F. Chaouche, TM. Ksouri, R et al. (2014) Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of aqueous-extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *Saxatile*. Chin J Nat Med 12(6): 415–22.

Halimi, H. (2018). Etude Melissopalynologique, Physiquochimique et antibactérienne de quelques échantillons de miels du sud Algérien. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat ès Sciences en Sciences Agronomiques.
Université Kasdi Merbah – Ouargla. P : 70.

Hamadache, N. (2011). Criblage des extraits phénoliques d'origine végétale doués d'activité antibactérienne : recherche des inhibiteurs naturels de β-lactamases. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en biologie. Université A/ Mira de Béjaia.

Hammiche, V. Merad, R. Azouz, M. (2013). Plantes toxiques à usage Médicinal du Pourtour Méditerranéen. Ed Springer-Verlag. Paris, France 133-136.

Hamoumane, H. Achite, A. (2018). Analyses physico-chimique et activité antibactérienne de quelques échantillons du miel Algérien. Mémoire fin d'étude en vue de l'obtention du

diplôme de Master en Microbiologie Appliquée. Université de Djilali Bounaama de Khemis Miliana.

Handa, S. S. Khanuja, S. P.S. Longo, G. Rakesh, D. D. (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. (Eds) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy. p 21-54.

Harborne, JB. Williams, CA. (2000). Advances in falvonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.

Hashemi, B. Bayat, A. Kazemei, T. Azarpir, N. (2011). Comparison between topical honey and mafenide acetate in treatment of auricular burn. Am J Otolaryngol. 32: 28-31.

Heim, KE. Tagliaferro, AR. Bobilya, DJ. (2002). Falconoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry* 13: 572-584.

Heller. (1996). Physic Nut. Jatropha curcas L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Henri, F.M. (2010). Bienvenue au rucher de la huberdiére.

Homrani, M. (2020). Caractérisation physico-chimique, spectre pollinique et propriétés biologiques de miels algériens crus de différentes origines florales .Thèse Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat. Université Abdelhami Ibn Badis Mostaganem. p : 164.

Hoyet, C. Le miel de la source à la thérapeutique. Thèse de diplôme d'état de « Docteur en pharmacie », université Henri Poincare, Nancy 1P.

Huchet, E. Coustel, J. Guinot, L. (1996). Les constituants chimiques du Miel. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires.

Inoue, H. Takeda, K. Uobe, K. Yamauchi, K. Yabuuchi, N. Kuwano, S. **(1984).** Planta. Med, 25, 285.

Institue Technique de L'Apiculture et l'Office pour L'Information et La Documentation en Apiculture. (2004). Edition office pour l'information et la documentation en apiculture, université de Cornell, Vol 31-33.

Irlande, D. (2010). Le miel et ses propriétés thérapeutiques. Mémoire en pharmacies. Université de Paris. France.4-14.

Jean-Yves, C. (2010). « Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie » .Thèse pour l'obtention de diplôme d'Etat de docteur en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1.P99.

Jessica, Y- Y. (2015). «Etude de l'effet de quatre composés contenant du miel sur deux bactéries cariogènes : *Streptococcus mutans et Lactobacillus rhamnosus»*. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en chirurgie dentaire .Université de Bordeaux. En français.

Joachim, W. Kadereit. (2004). Flowering plants, dicotyledones, Edition Springer.

Jouad, H. Maghrani, M. Eddouks, M. (2002) .Hypoglycaemic effect of Rubus fructicosis L. and *Globularia alypum L*. In normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethno pharmacology 81: 351-35.

Julika, N.W. Ajit, A. Sulaiman, A.Z. Naila, A. (2019). Physicochemical and Microbiological Analysis of Stingless Bees Honey Collected from Local Market in Malaysia. Indones. J. Chem. 19 (2): 522-530.

Kaskoniene, V. Venskutonis, P.R. Ceksteryte, V. (2010). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. Lwt—food sci. Technol. 43:801–807.

Katrina, B. Calvin, S. (2014). Antibacterial compounds of Canadian honeys target bacterial cell wall inducing phenotype changes, growth inhibition and cell lysis that resemble action of b-lactam antibiotics. Plos one 9 (9), e106967.

Kebaili, T. (2005). Etude de l'activité antibactérienne des miels de forêt, carline et d'oranger. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie des procédés. Centre Universitaire Yahia Farès de Médéa.

Kebbab, R. (2014). Etude du pouvoir antioxydant des poly-phénols issus des margines D'olives de la variété Chamlal : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri (Tizi-Ouzou), 116p.

Khalilzadah, P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentielsdu Quorum Sensing. Thèse de doctorat. L'université Paul Sabatier (Toulouse III). P: 39.

Khantouche, L. Motri, S. Mejri, M. Ben Abderabba,M.J. (2015). New Sci, 24, 1086.

Khelfi, D. (2016). Etude de l'effet inhibiteur naturel d'une formule à base de miel et d'extraits de plantes à usage pharmaceutique. Mémoire de fin d'études en vue d'obtention du diplôme master en Génie des procédés. Université Dr Yahia Farès-Médéa.

Khiati, B. (2014). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of raw honey from Algeria. J Microb Biochem Technol. 1(1):1–6.

Khlifi, D. Hamdi, M. El Hayouni, A. Cazau, S. Souchard, J.P. Couderc, F. Bouajila, J. (2011). Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves. Molecules 16: 10592-10603.

Klingenstein, Frank, Suanne Honnef, Danna J. Leaman et Uwe Schipmann. (2005). Sustainable wild collection of medicinal and aromatic plants: practice standars and performance criteria. Bonn, Ottawa ET Frankfurt: German Federal Agency for Nature Conservation, IUCN Medicinal Plants Specialist Group.

Koechler, S. (2015). « Le miel dans la cicatrisation des plaies : un nouveau médicament ? ». Thèse d'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Lorraine. En français.

Kraft, K. Hobbs, C. (2004). Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. p16.

Küçük, M. Kolayh. KaraogIu, S. Ulusoy, E. Baltaci, C. Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chem. 100: 526-530.

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

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

Laurent, C. (2014). L'abeille et le conseil à l'officine. Thèse de Doctorat. Université de Poitiers.

Lavoine, N. Desloges, I. Dufresne, L. Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review.Carbohydr .Polym. 90,735– 764.

Lay-Flurrie, K. (2008). Honey in wound care: effects, clinical application and patient benefit .Br J Nurs.25: S30, S32-6.

Leandro, G. D. (2013). « Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'Aronia melanocarpa et ses co-produits ». Thèse d'obtention de diplôme d'état de docteur en Ingénierie des fonctions biologiques. Université Lille 1. À Villeneuve d'Ascq. P21-22.

Leclerc, H. **Gaillard, J.L. Simonet, M. (1995).** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

Le Minor, L. Veron, M. (1989). Bactériologie médicale. 2éme édition. Paris: Flammarion 298-306.

Lequet, L. (2010). «Du nectar a un miel de qualité : contrôle analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur». Thèse d'obtention de garde de docteur vétérinaire. Université Claude-Bernard, LYONI.

Lina, S.M. Molan, P.C. Curson, R.T. (2011). The controlled in vitro susceptibility of Gastrointestinal pathogens to the antibacterial effect of Manuka honey.Eur J Clin Microbiol infect dis 30 : 569-574.

Leshaf, H. Alahoum, A. (2018). L'effet cicatrisant et antibiotique du miel d'Eucalyptus Etude prospective au niveau du service de Chirurgie générale « B » CHU Tlemcen. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie. Université Abou Beker Blkaid Faculté de Médecine Dr. B. BENZERDJEB – Tlemcen. P : 29-75

Louveaux, J. (1968). Composition, propriétés et technologie du miel. In: CHAUVIN R. Traité de biologie de l'abeille. Editions Masson et Cie, Paris, Tome 3, 277-324 Makhloufi C. (2001).

Louveaux, J. (1985). Le Miel. Cah. Nutr. Diét., 20: 57-70.

Louveaux, J. (1989). Les abeilles et leur elevage. Opida, pp : 125-207.

Maameri, Z. (2014). Pistacia lentiscus L. Evaluation pharmaco toxicologique.Thè.doc en Sciences. Constantine.

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

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

Maio, G.D. Panizzi, L. (1966) . Structura della globularina**,** La Ricerca Scientifica 36,845-850.

Majinda, R. R. T. Abegaz, B. Bezabih, M. Ngadjui, B.T. Wanjala, C.C. W. Mdee, L. K. et *al*. (2001).Recent results from natural products research at the University of Botswana. *Pure*. *Appl*. *Chem*, 73, pp 1197-1208.

Makhloufi, Ch. (2010). «Melissopalynologie et étude des élément bioactifs des miels Algérienne». Thèse d'obtention du diplôme de doctorat en science agronomiques. Université Alger. En français.

Mami, A. (2013). Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocine à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaire en Algérie. Thèse de doctorat. Université d'Oran. P: 19.

Manikis, I. Thrasivoulou, A. (2001). The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters. Apiacta.36:106–112.

Marcet, M. (2017). La cicatrisation des brulures par le miel, thèse de doctorat en pharmacies. U.F.R Des sciences pharmaceutiques. 75-98.

Mathad, V. T. Raj, K. Bhaduri, A. P. Sahai, R. Puri, A. Tripathi, L. M. Srivastava, V. M. L. (1998). Bioorganic and Medicinal Chemistry.6, 605-611.

Mazrou, K. (2008). « L'effet de la température sur l'évolution de l'HMF dans les miels Algériens». Mémoire d'obtention de diplôme d'étude supérieure en biologie. Université Ibn Khaldoune, Tiaret, Algérie. En français.

Menaa, F. Menna, A. Tréton, J. (2014). Polyphénols against akin aging in polyphénols in human health and disease. 1, pp 819-830.

Merah, M. Bachagha, M. Bouderhem. (2010). Etude de l'effet antimicrobienne de trois échantillons du miel naturel récoltés du territoire algériennes ; Article. Laboratoire de Bioressources Sahariennes : Préservation et Valorisation, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla.

Merghache, S. Zerriouh, M. Merghache, D. Tabti, B. Djaziri, R. Ghalem, S. J. (2013). App. Pharm. Sci. 3, 001.

Messaudi, S. (2008). Les plantes médicinales. 3ème édition, Dar el fikr-Tunis, PP (14 ; 15).

Mettler, T. (2002). Brochure d'application détermination du taux d'humidité, Méthodes de détermination du taux d'humidité Halogen MoistureAnalyzer METTLER TOLEDO, p15.

Mhanech, A.A. (2002). Traitement par les plantes médicinales. Edition: Dar al Hoda, PP: 120.

Miriam, O. Iurlina, Rosalia Fritz. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honyes from different sources. International Journal of Food Microbiology 105 (2005) 297-304.

Molan, P.C. **(1992)**.The antibacterial activity of honey: 1.The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. Vol 73(1):5-28.

Moussaoui, N. (2011). Analyse sensorielle de quelques miels du sud Algérien. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat: Université Kasdi- Merbah Ouargla. *p* 81.

Mutai, C. Vagias, C. Abatis, D. Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of Acacia mellidera extract and triterpens, J. Ethnopharmacol.

Nanda, V. Sarkar, B. C. Sharmab, K. Bawa .A .S. (2003). Physicochimicol properties and estimation of miniral content in honey produced from different plants in northen India. Journal of food composition and analysis. 16: 613-619.

Nair, S. (2014). Identification des plantes mellifères et analyses physicochimiques des miels Algériens .Thèse de doctorat en biologie. Université d'Oran. 235p.

Nicolay, J. (2014). Perspectives d'avenir en Apithérapie à l'officine. Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Angers. En français.

Nnomo, R.D. Tchouamo, I.R. Pinta, J.Y. (2009). Apiphytothérapie à base du miel au Cameroun. Ethnopharmacologia, n°44, P: 56.

Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry 66: 2012-2031

Okuda, T. Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphénols Related to Tannins. Molecules 16: 2191-2217.

Olaitan, P.B. Adeleke, O.E. Ola, IO. (2007). «Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes». African Health Sciences, vol. 7, n°3, p. 159-165.

Oskouei, T. O. Moslem, N. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases. *Iran J Basic Med Sci*. 16(6): 731–742.

Oudjet, K. (2012). Le miel une denrée à promouvoir. Infos-CACQE, p.1-3.

Pesenti, M.E. Spinelli, S. Bezirard, V. Briand, L. Pernollet, J.C. Tegoni, M. Cambillau, C. (2008). Structural basis of the honeybee PBP pheromone and pH- induces conformational change. Journal of Molecular Biology. Vol 380, 158-169.

Philippe, J .M. (1991). «La pollinisation des abeilles». Edition Edisud la calade. 13090 Aix .Provence.

Pistelli, L. Giorgi, I. (2012). Antimicrobial Properties of Flavonoïdes. Chapitre 2. Dans: Dietary Phytochemicals and Microbes, Springer Science+Business Media Dordrecht. pp. 33-91.

Prescrire. (2007). Bien utiliser les plantes en situations de soins, T.27, n◦ 286.8.

Prost, P.J. (2005). Apiculture, connaitre l'abeille –conduire le rucher. Lavoisier, paris, p. 382.

Quezel, S. Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, CNRS, Paris, p860.

Rebiahi , S. (2012). Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen. P: 4.

Rémy, B. Plenerb, L. Eliasc, M. Daudéb, D. Chabrièrea, E. (2016). Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques ? Ann Pharm Fr, http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2016.06.005.

Rossant, A. (2011). «Le miel un composé complexe aux propriétés surprenantes». Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Limoges. En français.

Rüegg, M. Blanc, B. (1981). The water activity of honey and related solutions, Lebensmitt. Wiss. Technol. 14, 1-6.

Ryad, M. (2017). L'utilisation du miel en chirurgie pédiatrique: quelques champs d'application. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Médecine. Université Mohammed V-Rabat. P: 83-84-86.

Shin, H. S. Ustunol, Z. (2005). Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison .Food Research International, 38:721-728.

Salhi, S. Fadli, M. Zidane, L. Douira, A. (2010). Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). Revue Lazaroa 31: 133-146.

Sanborn, A. Howard, S. (2012). Conversion of carbohydrates to hydroxyméthylfurfural (HMF) and derivatives. Office européen des brevets.

Schaneberg, P. Paris, F. (2011).Guide des plantes médicinales, Edition Délachaux & Niestlé, pp8-9.

Schramm, DD. Karim, M. Schrader, HR, et al .(2000). Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. J Agric Food Chem 51:1500–5.

Sebai, M. Boudali, M. (2009/2012). La phytothérapie a la confiance et méfiance. Mémoire professionnel. Institut de formation paramédical CHETTIA, P6.

Site 1: http://www.desgoutsetdescouleurs.com/le-miel-de-forêt /.

Site 2: http://www.miel-du-rucher.fr/produit/miel-de-foret-1kg/.

Site 3: http://bonasavoir.net/miel-et-curcuma-est-lantibiotique-naturel-le-plus-fort/.

Site 4 : http://www.tela-botanica.org/eflore/BDNFF/4,02/nn/3.

Site 5 : http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa%2010.

Site 6 : http://stl-bjb.ac-dijon.fr/Data Tronc commun/Cours/Cours6-spectres-IR-RMN2 2016.PDF.

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

Skim, F. Kaaya, A. Jaouhari, J.T. Lazrek, H.B. Jana, M. El Amri, H. (1999). Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. Fitoterapia. 70: 382-389.

Stary, F. (1992). Plantes médicinales. Grün, Paris.

Suzuki, Y. Haj me, F. Ikko, Y. (1969). Folia pharmacol Japan, 64, 93.

Takeda, S. Yuasa, K. Endo, T. Aburada, M. J. (1980). Pharmacobio-Dya, 3, 485.

Tasse, J. (2017). Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilme dans la prise en charge des infections osteo-articulaires a staphylocoques. Thèse de doctorat de l'université de Lyon. P73-74.

Taylor, PW. (2013). Alternative Natural sources for a new generation of antibacterial agents. International Journal of Antimicrobial Agents 42:195-201.

Tim Cushnie, TP. Lamb, AJ. (2005). Antimicrobial activity of flavonoïds. International Journal. Antimicrobial Agents 26: 343-356.

Toda, S. Miyase, T. Arichi, H. Tanizawa, H. Takino, Y. (1985). Chem. Pharm. Bull, 33, 1270.

Tosi, E.A. RE´, E. Lucero, H. Bulacio, l. (2004). Effect of honey high temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallization phenomena and fungal inhibition.lebensm.-wiss. U.-technol. 37 (6): 669–678.

Tosi, E. Martinet, R. Ortege, M. Lucer, H. (2007). Honey diastase activity modified by heating.206: 217-221.

Ulloa, F. P. A. (2012). Studies on honey from the Algarve in view of its valorization. Thesis submitted to the Universidad do Algarve to attain the degree of PhD in Chemistry. 277p.

Vandepitte, J. Engbaek, K. Piot, P. (1994). Bactériologie clinique : techniques de base pour le laboratoire. Genève : Organisation Mondiale de la Santé, 1994:117.

Vanhanen, L. Emmertz, A. Savage, G. (2011). Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey, Food Chemistry, 128: 236–240.

Velghe, C. (2016). «Miel valeurs nutritionnelle et bienfaits». Santé-MGC- Prévention. En ligne < www.mgc-prevention.fr › Nutrition › Aliments et santé >. Consulté le 17 février 2017. Website.http://muhammadcank.wordpress.com/2010/03/19/ujimicminimum-inhibitory concentration/.

Website.http: //tpegrp13.e-monsite.com.

Website.http: //www.microbe-edu.org.

Website.http: //www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html.

Website.http: //www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html.

Website.http: //www.uniklinik-ulm.de/.

Yao, LH. Jiang, YM. Shi, J. Toma, S-Barbera, FA. Datta, NN. Singanusong, R. Chen SS. (2004). Flavonoïde in food and their health benefits. Plant Foods and Human Nutrition 59: 113-122.

Yue Yew, J. (2015). Etude de l'effet de quatre composés contenant du miel sur deux bactéries cariogènes: *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus.* Thèse de doctorat chirurgie dentaire. Université de Bordeaux. p 23.

Zampini, I.C. Vattuone, M.A. Isla, M.I. (2005). Antibacterial activity of Zuccagnia punctata Cav. Ethanolic extracts. J Ethnopharmacol; 102:450-6.

Zeghad, N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale) Option : Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine. P : 1.

Zhou, X. Q. Bi, Z. M. Li, P. Tang, D. Cai, H. X. (2007). Chinese Chemical Letters, 18, 1221-1223.

Annexes

Annexe 1

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

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

Annexe 2 (Site 1)

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

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

Annexe 3 (suite) (site 1)

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

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

Annexe 4 (suite) (site 1)

Utilisation des tables de Bertrand

Il n'y a pas de proportionnalité entre les masses de cuivre formé et le glucose (ou les sucres). De plus, on trouve rarement une masse de cuivre qui est écrite dans le tableau.

Une Interpolation Linéaire est donc envisageable selon l'exemple suivant ou on trouve une masse de cuivre de 22 mg.

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

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

AB/AC = DE/DF ⟶ ((X-10) / (11-10)) = ((22-20,6) / (22,6-20,6)) ⟶ X = 10,7mg

Application de notre cas :

$V_{(KMnO_4)}$= 15 ml, ce qui correspond à une masse de cuivre m= 5. 15. 0,001. 0,1. 63,5=0,47655mg=476,55mg.

Ce qui est une valeur qui n'existe pas sur le tableau :

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

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

(AB/AC) = (DE/DF) ⟶ ((100-99)/(X-99)) = ((176,5-175) / (476,55-175)) ⟶ X= 300,03mg.

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

((AB/AC) = (DE/DF)) ⟶ ((100-99)/(X-99)) = ((177,8-176,5) / (476,55-176,5)) ⟶ X= 329,8mg.