

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

### THEME

**Caractérisation physico-chimique et évaluation des effets  
antibactériens, antioxydants et antimutagènes de cinq  
échantillons de miels Algériens**

Présentée par : M<sup>lle</sup> BOUDIAR Inès



Directrice de thèse : M<sup>me</sup>.BOUACHA. Mabrouka

MCA, Université Badji Mokhtar Annaba

CO-Directrice de thèse : M<sup>lle</sup>. ABDI Akila

Prof., Université Badji Mokhtar Annaba

Membres de Jury:

Président : Pr. SOUMATI Boudjema	Prof., Université Badji Mokhtar Annaba
Examinatrice : Dr. BOURZAMA Ghania	MCA., Université Badji Mokhtar Annaba
Examinatrice : BOURFAFA Nadjette	MCA., Université de Souk Ahras
Examinatrice : BOUZAHOUANE Hana	MCA., Université de Souk Ahras

Année universitaire 2023-2024

قال الله تعالى:

بسم الله الرحمن الرحيم

"وأوحى ربك إلى النحل أن إتخذي من الجبال بيوتا  
و من الشجر و مما يعرشون (68) ثم كلي من كل  
الثمرات فأسلكي سبل ربك ذللا يخرج من بطونها  
شراب مختلف ألوانه فيه شفاء للناس إن في ذلك  
لآية لقوم يتفكرون (69)"

صدق الله العظيم

سورة النحل

## **Remerciements**

**الحمد لله حمدا كثيرا كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه،**

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, Dr BOUACHA Mabrouka, pour son soutien constant, ses conseils éclairés et sa confiance en moi tout au long de cette recherche. Sa patience, son expertise et son dévouement ont été inestimables pour la réalisation de cette thèse.*

*Je remercie vivement Pr ABDI Akila mon co-directrice, vivement l'enseignante pour ses conseils avisés, issus de sa vaste expérience dans ce domaine.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr.BEKAI Madjid, enseignant à l'université de Tiaret pour sa précieuse aide et sa contribution inestimable dans l'analyse statistique de ma thèse de doctorat ainsi que de mes articles de recherche. Son expertise en statistique et son disponibilité ont été des atouts majeurs dans la réalisation de ce travail.*

*Mes sincères remerciements vont également à tous les membres de mon jury de thèse, Pr. SOUMATI Boudjema , Dr. BOURZAMA Ghania , Dr. BOURAFA Nadjette, Dr. BOUZAHOUANE Hana, pour leur temps, leur expertise et leurs précieuses remarques qui vont grandement enrichir cette thèse.*

*Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers ma famille pour leur amour, leur soutien indéfectible et leur encouragement constant tout au long de mes études. Leurs contributions ont été essentielles dans la réalisation de cette thèse et ont contribué à faire de cette expérience un moment inoubliable de ma vie.*

*Mes remerciements vont également à mes enseignants, camarades chercheurs et amis pour leur encouragement, leur soutien moral et leurs précieux échanges tout au long de cette aventure académique ainsi que tout le personnel du Département de Biochimie et des services du Laboratoire de Microbiologie, service d'El Hadjar et d'Annaba*

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer la qualité de cinq types d'échantillons de miel algérien, produits par l'abeille *Apis mellifera* et provenant de différentes sources botaniques et géographiques, en comparaison avec un échantillon de miel commercialisé (Manuka). L'évaluation se concentrera sur le profil des sucres et les propriétés physico-chimiques de ces échantillons de miel. D'autre part, l'étude vise à réaliser une analyse qualitative de la mélisosopalynologie, à étudier l'activité de la glucose oxydase (GOx) et à examiner l'effet antibactérien du miel contre des souches bactériennes pathogènes telles que *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Également, l'étude explorera la corrélation entre l'effet antibactérien et antimutagène du miel avec sa teneur en polyphénols, flavonoïdes et couleur. Pour atteindre ces objectifs, cinq échantillons de miel naturel ont été prélevés auprès d'apiculteurs locaux, tandis que le miel de Manuka a été obtenu en France. Pour évaluer l'effet antibactérien, des essais de diffusion en puits et de microdilution ont été réalisés à six dilutions différentes (80%, 40%, 20%, 10%, 5% et 2,5%). L'étude a également mesuré l'activité de la glucose oxydase (GOx) en utilisant du peroxyde d'hydrogène comme étalon, ainsi que du peroxydase et de l'o-dianisidine. En outre, le test AMES a été réalisé en utilisant trois souches de *Salmonella typhimurium* pour déterminer l'effet antimutagène du miel. Les sucres ont été analysés à l'aide de la chromatographie échangeuse d'ions à haute performance avec détection par amperométrie pulsée (HPAEC-PAD), et leurs paramètres physico-chimiques généraux ont été évalués. La méthode HPAEC-PAD a permis l'analyse qualitative et quantitative simultanée de six mono- et disaccharides. L'étude a donné des résultats significatifs, révélant que deux échantillons de miel (M1 : *Hedysarum coronarium*, M4 : *Ziziphus sp*) pouvaient être classés comme monofloraux, tandis que les échantillons de miel M2, M3 et M5 étaient des miels multifloraux. L'analyse statistique a indiqué une corrélation entre l'effet antibactérien et le niveau de GOX et le pH. L'analyse de la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes dans les échantillons de miel a indiqué que l'échantillon de miel M5 présentait les concentrations les plus élevées (307 µg de GAE/mg de miel). De plus, tous les échantillons de miel ont présenté des effets antibactériens et antimutagènes positifs. L'évaluation des propriétés physico-chimiques, y compris l'humidité, le pH, la CE, le HMF et la couleur (Pfund), a donné des valeurs moyennes de  $16.32 \pm 0.04$  ;  $4,36 \pm 0.00$  ;  $0.38 \pm 0.37$  mS•cm<sup>-1</sup> ;  $09.84 \pm 0.19$  mg•kg<sup>-1</sup> et  $75.4 \pm 0.24$  mm, respectivement. Le sucre dominant dans les échantillons de miel était le fructose, suivi du glucose, de la turanose, de l'isomaltose, du maltose et du saccharose.

En conclusion, le miel se révèle être un produit naturel important avec des propriétés antimutagènes et antibactériennes remarquables contre les bactéries pathogènes, en faisant une thérapie alternative potentielle pour traiter les plaies infectées par des souches multirésistantes.

**Mots clés :** Miel, paramètres physico-chimiques, HPAEC-PAD, effet antibactérien, effet antimutagène, effet antioxydant glucose oxydase, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, flavonoïdes, polyphénols

**Abstract**

The aim of this study is to evaluate the quality of five types of Algerian honey samples, produced by the *Apis mellifera* bee and coming from different botanical and geographical sources, in comparison with a sample of commercial honey (Manuka). The evaluation will focus on the sugar profile and physico-chemical properties of these honey samples. In addition, the study aims to carry out a qualitative meliosopalynology analysis, investigate glucose oxidase (GOX) activity and examine the antibacterial effect of honey against pathogenic bacterial strains such as *E.coli*, *S.aureus* and *P.aeruginosa*. In addition, the study will explore the correlation between the antibacterial and antimutagenic effect of honey and its polyphenol, flavonoid and color content. To achieve these objectives, five samples of natural honey were collected from local beekeepers, while the Manuka honey was obtained in France. To assess the antibacterial effect, well diffusion and microdilution tests were carried out at six different dilutions (80%, 40%, 20%, 10%, 5% and 2.5%). Bacterial susceptibility to honey was assessed by well diffusion and agar dilution tests. The study also measured glucose oxidase activity using hydrogen peroxide as a standard, as well as peroxidase and o-dianisidine. In addition, the AMES test was carried out using three strains of *Salmonella typhimurium* to determine the antimutagenic effect of honey. All honey samples were collected from various locations under different climatic conditions. Sugars were analyzed using high-performance ion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), and their general physico-chemical parameters were evaluated. The HPAEC-PAD method enabled the simultaneous qualitative and quantitative analysis of six mono- and disaccharides.

The study yielded significant results, revealing that two honey samples (H1: *Hedysarum coronarium*, H4: *Ziziphus sp*) could be classified as monofloral, while honey samples H2, H3 and H5 were multifloral honeys. All honey samples demonstrated a strong bactericidal effect against pathogenic bacteria, and statistical analysis indicated a correlation between antibacterial effect and GOX level and pH. Analysis of the total polyphenol and flavonoid content in the honey samples showed that honey sample 5 had the highest concentrations (307  $\mu\text{g}$  GAE/mg honey). In addition, all honey samples showed positive antibacterial and antimutagenic effects against pathogenic bacteria. Evaluation of physico-chemical properties, including moisture, pH, EC, HMF and color (Pfund), yielded mean values of  $16.32 \pm 0.04$ ;  $4.36 \pm 0.00$ ;  $0.38 \pm 0.37$  mS-cm<sup>-1</sup>;  $09.84 \pm 0.19$  mg-kg<sup>-1</sup> and  $75.4 \pm 0.24$  mm;  $0.38 \pm 0.37$  mS-cm<sup>-1</sup>, respectively. The dominant sugar in honey samples was fructose, followed by glucose, turanose, isomaltose, maltose and sucrose.

In conclusion, honey is proving to be an important natural product with remarkable antimutagenic and antibacterial properties against pathogenic bacteria, making it a potential alternative therapy for treating wounds infected by multi-resistant strains. Further research is needed to explore the underlying mechanisms and bioactive compounds present in honey.

**Keywords:** Honey, physico-chemical parameters, HPAEC-PAD, antibacterial effect, antimutagenic effect, antioxidant effect glucose oxidase, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, flavonoids, polyphenols

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم جودة خمسة أنواع من عينات العسل الجزائري الطبيعي ، التي تم إنتاجها من قبل نحلة *Apis mellifera* وتأتي من مصادر نباتية وجغرافية مختلفة ، مقارنة بعينة من العسل التجاري (مانوكا). تتركز التقييم على ملف السكر والخصائص الفيزيوكيميائية لهذه العينات من العسل. بالإضافة إلى ذلك، تهدف الدراسة إلى إجراء تحليل نوعي للعسل بالميليسوبالينولوجي، واستكشاف نشاط أوكسيداز الجلوكوز (GOX) ، وفحص التأثير المضاد للبكتيريا للعسل ضد السلالات الممرضة مثل *E.coli* و *S.aureus* و *P.aeruginosa* علاوة على ذلك، ستدرس الدراسة الارتباط بين الأنشطة المضادة للبكتيريا والمضادة للتحويلات الجينية للعسل مع محتواها من البوليفينول والفلافونويدات واللون. من أجل تحقيق هذه الأهداف، تم جمع خمسة عينات طبيعية من العسل من مربى النحل المحليين، في حين تم شراء عسل المانوكا من فرنسا. تم تقييم التأثير المضاد للبكتيريا باستخدام اختبارات انتشار الأبار والتخفيف الميكروبي عند ستة تخفيفات مختلفة ( 80 % ، 40 % ، 20 % ، 10 % ، 5 % و 2.5 %). تم تقييم حساسية البكتيريا للعسل من خلال اختبارات انتشار الأبار وتخفيف المحلول في وسط الجل. شملت الدراسة أيضًا قياس نشاط أوكسيداز الجلوكوز باستخدام بيروكسيد الهيدروجين كمعيار، بالإضافة إلى البيروكسيداز و o-dianisidine. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء اختبار AMES باستخدام ثلاث سلالات اختبار لبكتيريا سالمونيلا تيفيموريوم لتحديد التأثير المضاد للتحويلات الجينية للعسل. تم جمع جميع عينات العسل من أماكن متنوعة مع ظروف مناخية متغيرة. تم تحليل الكربوهيدرات باستخدام الكروماتوغرافيا الأيونية عالية الأداء مع الكشف الأمبيرومترية المتناوب (HPAEC-PAD) ، وتم تقييم المعلمات الفيزيوكيميائية العامة للعسل. أتاحت طريقة HPAEC-PAD التحليل النوعي والكمي المتزامن لستة مونوسكاريدات وديسكاريدات .

أفضت الدراسة إلى نتائج هامة، حيث كشفت أن عينتين من العسل (H1: *Hedysarum coronarium* و H4: *Ziziphus*) (sp) يمكن تصنيفهما كأصناف من الزهور الواحدة، في حين تبين أن عينات العسل H2 و H3 و H5 هي عسل متعدد الزهور.

أظهرت جميع عينات العسل تأثيرًا قويًا مبيدًا ضد البكتيريا الممرضة ، وأشار التحليل الإحصائي إلى وجود ترابط بين التأثير المضاد للبكتيريا ومستوى إنزيم الجلوكوز أوكسيداز ودرجة الحموضة. وأشار تحليل محتوى البوليفينولات والفلافونويد الكلي في عينات العسل إلى أن عينة العسل رقم 5 كانت تحتوي على أعلى تراكيز (307 ميكروغرام من / GAE ملغ من العسل). بالإضافة إلى ذلك، قدمت جميع عينات العسل تأثيرات مضادة للبكتيريا ومضادة للتحويلات الجينية إيجابية ضد البكتيريا الضارة. أظهر تقييم الخصائص الفيزيوكيميائية، بما في ذلك الرطوبة والدرجة الحمضية والتوصيل الكهربائي والهيدروكسي ميثيل فورفيرول واللون (بوند)، قيمًا متوسطة قدرها  $0.04 \pm 16.32$  و  $0.00 \pm 4.36$  و  $0.37 \pm 0.38$  ملي سيمنز / سم<sup>2</sup> و  $0.19 \pm 09.84$  ملغ / كغ و  $0.24 \pm 75.4$  مم على التوالي. كما أظهر السكر السائد في عينات العسل هو الفركتوز تليه الجلوكوز والتورانوز والإيزومالتوز والمالتوز والسكروز. في الختام، يثبت العسل أنه منتج طبيعي مهم بخصائص ملحوظة مضادة للتحويلات الجينية والمضادة للبكتيريا المذهلة ضد البكتيريا المسببة للأمراض، مما يجعله علاجًا بديلًا محتملاً لعلاج الجروح المصابة بسلالات متعددة المقاومة. تتطلب البحوث الإضافية استكشاف التفاصيل الكامنة والمركبات الحيوية النشطة الموجودة في العسل.

**الكلمات المفتاحية:** عسل ، المعايير الفيزيوكيميائية، HPAEC-PAD، تأثير مضاد للبكتيريا، تأثير مضاد للتحويلات الجينية، تأثير مضاد للأوكسدة، جلوكوز أوكسيداز، *E.coli*، *P.aeruginosa*، *S.aureus*، فلافونويد، البوليفينولات

## Liste des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Le miel</b>	
1. Présentation de l'abeille	07
1.1. Définition	07
1.2. Classification	07
2. Le Miel	08
2.1 Définition	08
2.2 Origine du miel	08
2.2.1 Miel de nectar	08
2.2.2 Miel de miellat	09
2.3 Les différents types du miel selon l'origine florale	09
2.3.1 Miel mono-floral	09
2.3.2 Miel poly-floral	09
2.4. La production du miel en Algérie	09
2.5. Le miel de Manuka	10
3. Les propriétés organoleptiques des miels (sensorielles)	11
3.1 Texture	11
3.2 Couleur	11
3.3 L'odeur	12
3.4 Goût	12
3.5 L'arôme	13

4. Caractérisation pollinique des miels	13
4.1 Pollen	13
4.2 Origine des pollens dans le miel	13
4.3 Composition du pollen	14
4.4 Structure et fonction du pollen	14
4.5 Identification du pollen	15
5. Les paramètres physico-chimiques du miel	15
5.1 L'humidité	16
5.2 Acidité libre	16
5.3 La conductivité électrique (CE)	17
5.4 pH (pouvoir de l'hydrogène)	18
5.5 Teneur en sucre	18
5.6 Couleur	19
5.7 Teneur en hydroxyméthylfurfural	20
6. Composition du miel	20
6.1 La teneur en eau	21
6.2 Les glucides	21
6.3 Les protéines	23
6.4 Les enzymes	23
6.4.1 La diastase (amylase)	23
6.4.2 L'invertase (sucrase, $\alpha$ -glucosidase)	23
6.4.3 Glucose oxydase	24
6.5. Les acides aminés	24
6.6. Les acides organiques	25
6.7 Les minéraux	25
6.8 Composés aromatiques	25
7. Les micro-organismes	26
8. Autres composants	26
9. Les antioxydants	27
10. Effets thérapeutiques du miel	27
10.1. Effets antibactérien	27

10.2 Effet antioxydant	29
10.3 Activité antimutagène	29
<b>Chapitre II: Souches bactériennes</b>	
1. Les infections des plaies cutanés	31
2. Les infections urinaires	32
3. <i>Escherichia.coli</i>	34
3.1. Historique	34
3.2 Définition	34
3.3. Habitat	36
3.4. Pathotype et pathogénie	36
3.5 Structure antigénique	38
3.6. Résistance aux antibiotiques	38
3.6.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines	38
3.6.2. Résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones	39
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
4.1 Définition	41
4.2 Habitat	43
4.3 Pouvoir pathogène	43
4.4 Substances élaborées	44
4.5 Résistance aux antibiotiques	44
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	47
5.1 Définition	47
5.2 Historique	48
5.3 Habitat	48
5.4 Caractères généraux	49
5.5 Pouvoir pathogène	49
5.6 La résistance des <i>S.aureus</i> aux antibiotiques	50
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Materiel et méthodes</b>	
I-Materiel	54
I.1.Materiel utilisé au laboratoire	54
I.2.Matériel biologique	54

I.2.1.Souches bactériennes utilisées	54
I.2.1.1 Souches de référence	54
I.2.1.1 Souches cliniques	54
I.2.2.Echantillonnage des miels	58
II. Analyse des échantillons de miel	60
II.1. Examen organoleptique	60
II.2.Analyses physico-chimiques	60
II.2.1 Teneur en eau	60
II.2.2 Détermination du pH	61
II.2.3 Mesure de la conductivité électrique	61
II.2.4 Intensité de la couleur	62
II.2.5 Hydroxy Méthyl Furfural (HMF)	62
II.3. Analyse qualitative de la méliissopalynologie	63
II.4. Détermination de la composition en glucide par HPAEC-PAD	64
II.5.Détermination de la teneur en polyphénole totaux	66
II.6.Détermination des flavonoïdes totaux	66
II.7 Méthode d'évaluation de l'activité glucose oxydase (GOx)	67
III.Isolement et identification des souches bactériennes	68
IV. Etude de la résistance aux antibiotiques	73
IV.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé	73
IV.2 Détection de <i>S.aureus</i> méthicillino-résistant	74
IV.3 Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline	74
V. Evaluation des effets thérapeutiques des échantillons de miels	74
V.1 Evaluation de l'activité antibactérienne	74
V.1.1 Méthode de diffusion en puits	75
V.1.2 Méthode de dilution en milieu liquide	76
V.1.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	77
V.1.4 Détermination de la concentration bactéricide minimale (CMB)	79
V.2 Détermination de l'effet mutagenique et antimutagénique de miel	80
V.2.1 Effet antimutagène des échantillons de miel	80
V.2.1.1 Activation des souches de génotoxicité	80
V.2.1.2 Vérification des caractères génétiques	81

V.2.1.3 Auxotrophie à l'histidine	82
V.2.1.4 Dépendance à la biotine	83
V.2.1.5 Mutation uvrB	84
V.2.1.6 Mutation rfa	84
V.2.1.7 Résistance à l'ampicilline	85
V.2.1.8 Résistance à la tétracycline	85
V.2.2 Test d'Ames	86
VI. L'activité antioxydante	88
VI.1 Pouvoir antiradicalaire	88
VI.2 Méthode de l'émulsion du $\beta$ -carotène-acide linoléique	89
VII. Analyses Statistiques	90
<b>Résultats et Discussion</b>	
1. Examens organoleptiques des échantillons de miel étudiés	92
2. Les résultats des paramètres physico-chimiques	94
2.1 Humidité	94
2.2 pH	95
2.3 Mesure de la conductivité électrique	96
2.4 Mesure de l'intensité de la couleur	97
2.5 Mesure de l'HMF	98
3. Résultats du profil glucidique	100
4. Résultats de l'étude palynologique	108
5. Evaluation de l'activité GOx	114
6. Profil d'Antibiorésistance clinique	115
6.1 Résistance des souches de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques	115
6.2 Détection de <i>S.aureus</i> méthicillino-résistant	115
6.3 Résistance des souches Gram négative aux antibiotiques	119
7. Résultats de l'activité antibactérienne du miel	122
8- Etude de la corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne	130
9- Etude de la corrélation entre le contenu enzymatique en Glucose oxydase (GOX) et l'activité antibactérienne	139
10. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des échantillons de miel	149

11.Activité antioxydante	150
11.1 Pouvoir antiradicalaire	150
11.2 Test de blanchissement du $\beta$ -carotène	151
12.Résultats de l'activité antimutagène	152
13.Résultats de l'étude de la corrélation polyphénol flavonoïdes et couleur	153
<b>Conclusion et perspective</b>	155
Références bibliographiqueError! Bookmark not defined.	157
Annexes	

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 01	L'abeille tellienne : <i>Apis mellifera intermissa</i>	08
Figure 02	Structure d'un grain de pollen	14
Figure 03	Pelotes de pollen	15
Figure 04	<i>E.coli</i> sous Microscope électronique à Balayage	35
Figure 05	Schéma pathogénique des <i>E. coli</i> diarrhéiques	37
Figure 06	Souche de <i>P.aeruginosa</i> ensemencé sur milieu sélectif Cétrimide caractérisé par son pigment bleu-vert pyocyanine.	42
Figure 07	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sous microscope électronique à balayage	42
Figure 08	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique à transmission	46
Figure 09	<i>Staphylococcus.aureus</i> sous Microscope électronique a Balayage (MEB)	48
Figure 10	Représentation schématique de la classe d'antibiotiques et du mécanisme de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	52
Figure 11	Provenance des souches bactériennes d' <i>E.coli</i>	55
Figure 12	Provenance des souches bactériennes de <i>P.aeruginosa</i>	56
Figure 13	Provenance des souches bactériennes de <i>S.aureus</i>	57
Figure 14	Image des échantillons testés et du miel de référence (Manuka)	58
Figure 15	Localisation géographique et sites de récolte des échantillons de miel en Algérie	59
Figure 16	Verres à pied ballon proposés pour l'évaluation sensorielle du miel.	60
Figure 17	Système Dionex GP50 (USA) HPAE PAD	66
Figure 18	Génération de peroxyde d'hydrogène par la réaction catalysée de la glucose oxydase	68
Figure 19	Protocole général d'isolement et identification des souches cliniques selon le type de prélèvement	69
Figure 20	Vérification de la pureté des souches et examen macroscopique et microscopique des colonies	69
Figure 21	Souche de <i>S.aureus</i> sur milieu sélectif Chapman	70
Figure 22	Souche de <i>P.aeruginosa</i> sur milieu sélectif Cétrimide	70

<b>Figure 23</b>	Souche d' <i>E.coli</i> sur milieu sélectif Mac Conkey	71
<b>Figure 24</b>	Illustration du profil biochimique d'une souche <i>S.aureus</i> identifiée par système API staph.	71
<b>Figure 25</b>	Illustration du profil biochimique d'une souche d' <i>E.coli</i> identifiée par système API20E.	71
<b>Figure 26</b>	Illustration du profil biochimique d'une souche <i>P.aeruginosa</i> identifiée par système API 20NE	72
<b>Figure 27</b>	Représentation schématique de la méthode de diffusion sur disque.	73
<b>Figure 28</b>	Représentation schématique de la méthode de diffusion du miel sur agar.	76
<b>Figure 29</b>	Microdilution en bouillon pour les tests antibactériens, conformément au protocole du CLSI.	77
<b>Figure 30</b>	Préparation d'un inoculum microbien de 0,5 McFarland par suspension directe de colonies, conformément aux recommandations du CLSI.	78
<b>Figure 31</b>	Concentration minimale inhibitrice par microdilution	79
<b>Figure 32</b>	Concentration minimale bactericide	80
<b>Figure 33</b>	Protocole du test d'Ames	87
<b>Figure 34</b>	Taux d'humidité dans les échantillons de miels	94
<b>Figure 35</b>	Les valeurs du pH des différents échantillons de miels	95
<b>Figure 36</b>	La conductivité électrique des différents échantillons de miels	96
<b>Figure 37</b>	La coloration des différents échantillons de miels	97
<b>Figure 38</b>	Le contenu d'Hydroxymethylfurfural (HMF) des échantillons de miels	99
<b>Figure 39</b>	Profils chromatographiques HPAE-PAD des sucres dans les échantillons de miel (M1, M2).	101
<b>Figure 40</b>	Profils chromatographiques HPAE-PAD des sucres dans les échantillons de miel (M3, M4)	102
<b>Figure 41</b>	Profils chromatographiques HPAEC-PAD des sucres dans l'échantillons demiel M5 et miel de Manuka	103
<b>Figure 42</b>	Résultats du profil glucidique des échantillons de miel identifié par HPLC (HPAEC-PAD).	104
<b>Figure 43</b>	Photographies en microscopie optique de quelques grains de pollen observés dans des échantillons de miel (X1000)	109-111
<b>Figure 44</b>	Observation microscopique des pollens du Miel de Manuka	112

<b>Figure 45</b>	Histogramme illustrant la répartition des niveaux de glucose oxydase relevés dans les échantillons de miel analysés.	114
<b>Figure 46</b>	Profil de résistance des souches <i>S.aureus</i> aux antibiotiques cliniques.	116
<b>Figure 47</b>	Activité des antibiotiques sur les souches de <i>Staphylococcus.aureus</i>	116
<b>Figure 48</b>	Antibiogramme des souches de <i>S.aureus</i>	117
<b>Figure 49</b>	Profil de résistance des souches d' <i>E.coli</i> aux antibiotiques cliniques	119
<b>Figure 50</b>	Profil de résistance des souches <i>P.aeruginosa</i> aux antibiotiques cliniques	120
<b>Figure 51</b>	(a) Activité antibactérienne (zone d'inhibition en mm) des échantillons de miel multifloral contre <i>Escherichia.coli</i> , évaluée par la méthode de diffusion en puits	124
<b>Figure 52</b>	(a) Activité antibactérienne (zone d'inhibition en mm) des échantillons de miel multifloral contre <i>Pseudomonas.aeruginosa</i> , évaluée par la méthode de diffusion en puits	125
<b>Figure 53</b>	(a) Activité antibactérienne (zone d'inhibition en mm) des échantillons de miel multifloral contre les souches <i>Staphylococcus.aureus</i> , évaluée par la méthode de diffusion en puits.	126
<b>Figure 54</b>	Zone d'inhibition des échantillons de miels vis-à-vis des Souches (a : <i>S.aureus</i> ; b : <i>P.aerogenosa</i> ; c : <i>E.coli</i> )	127
<b>Figure 55</b>	Résultats de la corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches d' <i>E.coli</i>	131
<b>Figure 56</b>	Résultats de la corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches de <i>P.aeruginosa</i> .	134
<b>Figure 57</b>	Résultats de la corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches <i>S.aureus</i>	137
<b>Figure 58</b>	Résultats de la corrélation entre l'enzyme glucose oxydase (GOx) et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches d' <i>E.coli</i> .	139
<b>Figure 59</b>	Résultats de la corrélation entre l'enzyme glucose oxydase (GOx) et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches <i>P.aeruginosa</i> .	141
<b>Figure 60</b>	Résultats de la corrélation entre l'enzyme glucose oxydase (GOx) et	144

	l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches <i>S.aureus</i>	
<b>Figure 61</b>	Résultat de l'activité antibactérienne des miels test et du miel de manuka (M6) vis-à-vis des espèces bactériennes étudiés ( <i>E.coli</i> , <i>P.aerugenosa</i> , <i>S.aureus</i> ) au sein de chaque espèce.	147

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 01	Analyse de la qualité des couleurs de l'abeille	19
Tableau 02	Teneurs en sucres des miels	22
Tableau 03	Origines géographiques et botaniques des échantillons de miel étudiés	58
Tableau 04	Nombre de révertant spontanée par boîte et par souche	82
Tableau 05	Mutagènes standards utilisés pour les trois souches de <i>S. typhimurium</i>	82
Tableau 06	Caractéristiques génétiques des souches de <i>S.typhimurium</i> .	82
Tableau 07	Examen organoleptique des échantillons de miel étudiés	92
Tableau 08	Les types de pollen présent dans les miels testés	108
Tableau 09	Résultats des analyses statistiques de l'activité antibactériennes des échantillons de miels vis-à-vis des souches pathogènes ( <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> )	122
Tableau 10	Résultats de l'étude de corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches d' <i>E. coli</i>	130
Tableau 11	Résultats de l'étude de corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de <i>P. aeruginosa</i> .	132
Tableau 12	Résultats de l'étude de corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de <i>S.aureus</i>	135
Tableau 13	Résultats de l'étude de corrélation entre la teneur en GOX et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches d' <i>E. coli</i>	138
Tableau 14	Résultats de l'étude de corrélation entre la teneur en GOX et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de <i>P.aeruginosa</i>	140
Tableau 15	Résultats de l'étude de corrélation entre Gox et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de <i>S.aureus</i>	143
Tableau 16	Résultats des tests de Chi-Deux de Pearson de l'activité antibactérienne des miels avec les espèces bactériennes étudiés ( <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> ) au sein de chaque espèce	146
Tableau 17	Détermination de la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes dans les échantillons de miel	149
Tableau 18	Résultats du test de balayage du radical libre DPPH	150

<b>Tableau 19</b>	Activité antioxydante des échantillons de miels, du BHT et de l' $\alpha$ -tocophérol dans le système $\beta$ -carotène/acide linoléique	151
<b>Tableau 20</b>	Effet mutagène et antimutagène du miel algérien dans l'essai AMES	152
<b>Tableau 21</b>	Corrélation entre les effets antibactériens, antimutagènes et TPC, FLV et couleur.	153

## Liste des abréviations

**AME in TA98:** antimutagenic effect in *S.tyhimurium* TA98,

**AME in TA100:** antimutagenic effect in *S.tyhimurium* TA100

**AME in TA102:** antimutagenic effect in *S.tyhimurium* TA102

**AOAC :** Association of Official

**ATCC :** the American Type Culture Collection,

**CMI:** Concentration minimale inhibitrice

**CMB:** Concentration minimale bactéricide

**DI :** diamètre d'inhibition

**EC :** Electrical Conductivity (mS/cm)

**EU:** Union européenne

**FLV:** flavonoids ( $\mu\text{g}$  of QE/mg of honey), **ABE:** antibacterial effect (mm),

**GAE :** Equivalent en acide gallique (Gallic Acide Equivalent)

**HMF :** Hydroxymethylfurfural

**HPAE-PAD :** High-Performance Anion-Exchange chromatography with Pulsed Amperometric Detection

**HPLC :** Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

**IHC:** International Honey Commission

**ml :** Millilitre

**mg** Milligramme

**MH:** Mueller Hinton

**min :** Minute

**Ratio :** CMB/CMI

**SARM :** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

**TPC:** Total polyphenolic content ( $\mu\text{g}$  of GAE/mg of honey),

**% :** Pourcent

**°C :** Le degré Celsius

**$\mu\text{l}$  :** Microlitre

# INTRODUCTION

### Introduction

Le miel est la substance sucrée naturelle produite par l'abeille domestique (*Apis mellifera*) à partir du nectar des plantes ou des sécrétions des parties vivantes des plantes ou des excréments des insectes suceurs de plantes sur les parties vivantes des plantes. Les abeilles le récoltent, le transforment en le combinant avec des substances spécifiques qui leur sont propres, le déposent, le déshydratent, le stockent et le laissent dans l'alvéole pour qu'il mûrisse et se développe (Bouacha *et al.*, 2018; Codex Alimentarius, 2001). Cet aliment nutritif et sain est l'édulcorant le plus efficace produit par la nature, qui a toujours été consommé pour ses composants nutritionnels et ses effets bénéfiques sur la santé humaine (Hills *et al.*, 2019 ; Pasupuleti *et al.*, 2017 ; Benaziza-Bouchema et Schweitzer, 2010). Il est également facile à digérer et offre l'énergie nécessaire à l'organisme (Afrin *et al.*, 2019).

Décrit comme une solution sucrée super-saturée, les valeurs nutritionnelles du miel sont dues à sa composition complexe et riche, notamment en sucres (Bogdanov *et al.*, 2008). Cette substance est composée de glucides, d'eau et de plusieurs composants mineurs, en plus d'environ 200 substances reportées également présents dans le miel, dont des acides aminés, des vitamines, des minéraux, des enzymes, etc (Machado *et al.*, 2020 ; White 1962). Au-delà de la valeur énergétique, les propriétés physico-chimiques sont également fournies par les hydrates de carbone. Les abeilles récoltent le nectar d'un seul type de fleurs ou de différents types de fleurs, le miel produit est alors mono-floral ou multi-floral respectivement (Machado *et al.*, 2020).

De nombreux facteurs contrôlent la composition chimique du miel : la source botanique, la situation géographique, la saison, la zone de collecte, l'environnement, du traitement et des conditions de stockage (Bouacha *et al.*, 2022). Ces facteurs contrôlent la concentration et les propriétés de la teneur en sucre dans le miel. Différents types de disaccharides et de trisaccharides ont été identifiés dans le miel selon la technique analytique utilisée (Afrin *et al.*, 2019).

Le miel contient des acides organiques (acide gluconique) et des ions inorganiques (phosphate, chlorure), qui sont responsables de son acidité. L'acidité élevée offre au miel une résistance à l'altération bactérienne. Il s'agit de la transformation des sucres en acides organiques. Ceci lui confère un puissant effet antibactérien ainsi que sa forte osmolarité, et surtout sa teneur en peroxyde d'hydrogène (Boudiar *et al.*, 2022).

Le pollen, autre produit de l'abeille, est reconnu comme un élément important de la médecine traditionnelle dans plusieurs pays. En raison de ses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques, le pollen est considéré comme un aliment fonctionnel dans l'industrie alimentaire. Les composés phénoliques tels que l'acide gallique, caféique et trans-cinnamique sont les composants du pollen qui sont responsables de son effet antibactérien. Des composants tout aussi importants du pollen sont les flavonoïdes comme la quercétine, les flavones et les dérivés de catéchine, les stéroïdes, les dérivés de caroténoïdes et les terpénoïdes (Karadal *et al.*, 2018).

Le pollen est la principale source de protéines, de substances grasses, de minéraux et de vitamines de l'abeille et il est essentiel pour la croissance des larves et des jeunes abeilles et adultes (Gary, 1992; Herbert, 1992). La composition du pollen est très importante pour l'analyse du miel et elle a été utilisée comme méthode traditionnelle pour déterminer l'origine florale du miel. Les taxons du pollen indiquent les sources florales utilisées par les abeilles pour produire le miel (Moore *et al.*, 1991; Sawyer et Pickard, 1988). Le pollen est également une bonne source de glycosides flavonoïdes et les profils de ces derniers par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) ont été utilisés pour caractériser les pollens d'abeilles. Les flavonoïdes sont presque exclusivement présents dans le pollen sous forme de glycosides. Ces flavonoïdes peuvent également caractériser un miel uni-floral. Le groupe espagnol a également montré que les flavonoïdes du miel sont des dérivés de la propolis (Ferrerres *et al.*, 1994).

Outre l'importance nutritionnelle, le miel possède de multiples effets biologiques tels que les propriétés antimicrobiennes (Tesfaye *et al.*, 2022), antioxydantes (Ahmed *et al.*, 2018), anti-inflammatoires (Liao *et al.*, 2018), gastro-protectrices (Djebli *et al.*, 2021), cicatrisante des plaies (Febriyenti *et al.*, 2019), des effets antimutagènes (Saxena *et al.*, 2010) effets anticancéreux (El-kott, 2008).

Le miel est utilisé depuis les temps anciens comme un remède traditionnel pour les infections microbiennes (Al-Kafaween *et al.* 2020; Mandal et Mandal, 2011). Plusieurs auteurs ont prouvé le fort effet antibactérien du miel contre les infections bactériennes causées par des souches pathogènes multirésistantes (Abolhassani *et al.*, 2022; Cilia *et al.*, 2020; Bucekova *et al.*, 2019; Bouacha *et al.*, 2018). L'activité antibactérienne du miel a été testée contre de nombreuses espèces bactériennes pathogènes dans différents environnements pour traiter les plaies et les infections de brûlures souvent causées par les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et *Pseudomonas* (Hazrati *et al.*, 2010). De même, il a été testé contre les infections des voies urinaires chez les femmes enceintes causées par des souches multirésistantes telles

que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc (Almasaudi, 2021 ; Bouacha *et al.*, 2018; Lusby *et al.* , 2005). Le pH est l'un des facteurs du miel qui inhibe la croissance bactérienne. C'est pourquoi on parle "d'inhibines". Ces éléments améliorent considérablement le pouvoir antibactérien du miel en agissant seuls ou en synergie (Wahdan, 1998 ; Oka *et al.*, 1987). Le miel est naturellement acide qu'elle que soit son origine géographique, avec un pH compris entre 3,2 et 4,5, Ce faible niveau de pH inhibe la croissance de la plupart des micro-organismes (Bouacha et Benbouzid, 2020; Molan, 1992). Ibrahim *et al.* (2012) ont remarqué que ce faible pH constitue un milieu hyper-osmotique, une propriété puissante agissant comme un inhibiteur de croissance pour de nombreuses bactéries pathogènes. En absorbant l'eau vitale de ces pathogènes, il fournit un milieu où ces bactéries ne peuvent pas se multiplier (Kone *et al.*, 2016; Bogdanov et Blumer, 2001).

En effet, le miel possède aussi un bon effet antimutagène, ce qui signifie qu'il peut protéger l'ADN des effets négatifs potentiels de réactions induisant des mutations. Bien que le mécanisme impliqué dans l'effet antimutagène du miel ne soit pas bien identifié, cependant, il pourrait être lié à de nombreuses substances biologiques telles que comme les acides phénoliques, les flavonoïdes, les vitamines, les enzymes et les sels minéraux (Wang *et al.*, 2002).

Les flavonoïdes et les polyphénols, des pigments naturels présents dans les plantes, jouent un rôle crucial en assurant une protection contre les radicaux libres, les rayons ultraviolets et la photo-oxydation (Taormina *et al.*, 2001). Ces composés aux propriétés antioxydantes sont également présents dans le miel, contribuant ainsi à ses bienfaits pour la santé. Le pouvoir antioxydant du miel est étroitement lié à sa couleur. En effet, plus le miel est foncé, plus il est riche en pigments protecteurs tels que les flavonoïdes. Les abeilles, en récoltant le nectar de différentes sources florales correspondant à des taxons de pollen variés (Mercan *et al.*, 2007), introduisent ainsi une diversité de flavonoïdes et des polyphénols dans le miel.

Le pollen des plantes pollinifères, nectarifères et anémophiles est souvent présent dans le miel, reflétant les facteurs environnementaux et les ressources végétales butinées par les abeilles. Cette diversité de composés antioxydants confère au miel ses propriétés bénéfiques pour la santé, renforçant son potentiel en tant que source naturelle de protection contre le stress oxydatif (Da Luz *et al.*, 2020).

L'Algérie est classée comme le plus large pays d'Afrique en termes de superficie ; elle est bordée au nord par la mer Méditerranée, ce qui se traduit par tous les bioclimats méditerranéens du

pays (humide, subhumide, semi-aride, aride et saharien). Les montagnes caractérisent l'Algérie et divisent le pays en trois types de climats qui se distinguent par leur relief et leur morphologie, d'où une importante diversité biologique. L'Algérie dispose d'importantes ressources génétiques végétales en raison de sa situation géographique entre deux empires floraux : Holarctis et Paleotropis. Cela lui confère une flore très diversifiée décrivant 3 139 espèces végétales algériennes, dont beaucoup sont visitées par les abeilles domestiques (Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture, 2013; Quézel et Santa, 2000).

Par conséquent, la capacité de production du miel algérien est extrêmement élevée (Rebiai et Lanez, 2015). Le miel algérien est très diversifié d'une plante à une autre au sein d'une même flore et d'une flore à une autre ainsi que d'une zone géographique à une autre. Les miels algériens sont très différents en termes d'arôme et de goût, chaque région produisant son propre type de miel.

Plusieurs articles ont été publiés sur les caractéristiques physico-chimiques et la composition pollinique du miel provenant de différentes sources (Mercan *et al.*, 2007). Cependant, les rapports sur la composition chimique et la teneur en sucre des différents types de miel algérien sont rares en raison de leur grande diversité et de leur énorme production. Malgré cela, un intérêt croissant a été porté à la détermination des effets thérapeutiques des échantillons de miel provenant de différentes régions. Pourtant, les données disponibles sur le profil pollinique et l'activité antibactérienne du miel algérien sont très peu nombreuses par rapport à l'importante diversité botanique, climatique et géographique de l'Algérie. Ceci souligne la nécessité d'approfondir l'exploration de ces aspects afin de mieux comprendre les propriétés et les bénéfices potentiels du miel produit en Algérie.

Par conséquent, la présente étude vise à contribuer à la connaissance du miel algérien et à évaluer sa qualité. Elle vise également à déterminer et à quantifier la composition en sucres (les monosaccharides, disaccharides et tri-saccharides), par chromatographie d'échange d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD), et les paramètres physico-chimiques du miel algérien provenant de cinq régions aux climats et aux origines botaniques différents. Le miel utilisé comme référence dans cette étude était celui du Manuka provenant de la Nouvelle-Zélande.

Les effets thérapeutiques des échantillons de miel (antibactérien, antimutagène et antioxydant) ont également été examinés dans cette étude, mettant en lumière leur importance. La corrélation

entre le pH, l'activité enzymatique de la glucose oxydase (GOx) et l'effet antibactérien du miel algérien contre les bactéries pathogènes multirésistantes a été évaluée. Simultanément, l'origine botanique du miel algérien a été déterminée grâce à une analyse qualitative méliisso-palynologique visant à identifier ses profils polliniques. La détermination de ces paramètres et propriétés permet d'évaluer sa qualité et de s'assurer qu'elle est maintenue dans les normes internationales et dans les valeurs de la législation.

REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I:

Le miel

## Revue bibliographique

### Chapitre I : Le Miel

#### 1. Présentation de l'abeille

##### 1.1. Définition

L'abeille « *Apis mellifera* » est un insecte qui appartient au genre *Apis* et à la famille des *Apidae*. Les abeilles sont des insectes sociaux, capables de récolter de la nourriture et de la mettre à la disposition des habitants de la ruche. L'espèce « *Apis mellifera* » est la plus adéquate à l'élevage et réponds aux besoins des apiculteurs et scientifiques, et s'adapte aux conditions climatiques (Guillon, 1996).

##### 1.2. Classification (position systématique)

L'abeille algérienne appartient à la lignée Africaine A comportant deux sous espèces ; *Apis mellifera intermissa* (Buttel-Reepen 1906) et *Apis mellifera sahariensis* (Baldensperger, 1924).

En 1906, Buttel Reepen a décrit et classé, l'abeille *Apis mellifera intermissa* (figure 01), appelée aussi l'Abeille tellienne (Ruttner *et al.*, 1978). Se trouve au Nord de l'Afrique (Maroc, Tunisie et Algérie) le long de la côte méditerranéenne (Grissa *et al.*, 1990; Cornuet *et al.*, 1988). La race intermissa est la plus répandue s'étend sur toute l'Afrique du Nord, du Maroc à la Tunisie (Loucif-Ayad *et al.*, 2015 ; Hepburn et Radloff, 1996).

Sa position systématique est la suivante :

Embranchement :	Arthropodes
Sous embranchement :	Mandibulates
Classe :	Insectes
Sous-classe :	Ptérygotes
Ordre :	Hyménoptères
Sous-ordre :	Apocrites
Section :	Aculéates
Famille :	Apidés
Genre :	<i>Apis</i>
Espèce :	<i>Apis mellifera</i>
Sous-espèce :	<i>Apis mellifera intermissa</i> (Buttel-Reepen, 1906).



**Figure 01** : L'abeille tellienne : *Apis mellifera intermissa* (Clément *et al.*, 2002)

## 2. Miel

### 2.1 Définition

Le miel a été défini comme : « la substance sucrée naturelle produite par les abeilles « *Apis mellifera* » à partir du nectar des plantes ou des sécrétions des parties vivantes des plantes ou des excréments des insectes suceurs de plantes sur les parties vivantes des plantes, que les abeilles collectent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qui leur sont propres, déposent, déshydratent, stockent et laissent dans les rayons de miel pour mûrir et se développer » ( Codex Alimentarius, 2001).

### 2.2 Origine du miel

Selon l'origine sécrétoire, deux variétés de miel existent ; le miel de nectar et le miel de miellat :

#### 2.2.1 Miel de nectar

Le nectar est la sécrétion de la glande à nectar ou nectaire situé généralement dans les fleurs, ou à la base de certaines feuilles. C'est un organe qui sécrète la sève sucrée ; l'une des caractéristiques des fleurs pollinisées par des insectes ou des oiseaux (Nicolson et Thornburg , 2007; Marchenay et Berard, 2007 ). Sa composition complexe varie selon les espèces, Il se compose d'eau, sucres, substances aromatiques et colorantes, des acides, des sels minéraux ou quelques substances diverses et rares comme des vitamines ou des protéines. les propriétés du miel sont influencées par la qualité et la composition du nectar (Lequet, 2010; Bessas, 2008).

Le nectaire peut se trouver dans de nombreuses parties différentes de la fleur, de nombreux détails sont donnés par Bohmker (1917), Feldhofen (1933), Daumann (1928-30) ; Bonnier (1878). La glande sécrétant le sucre peut être sur le réceptacle, les pétales ou les sépales, ou à la base des filaments, du carpelle et du pistil, ou dans l'ovaire.

### 2.2.2 Miel de miellat

Certaines espèces d'insectes sont capables de prélever la sève élaborée dans le phloème (les canaux où elle circule) à l'aide d'une pièce buccale piqueuse (Koechler, 2015). La sève subit des transformations dans le système digestif de l'insecte. Des microorganismes vivant en symbiose dans l'appareil digestif très spécifiques de l'abeille comme *Snodgrassella* et *Gilliamella* et d'autres connus tel que les *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* *Bacillus* etc. Celle-ci est enfin produite sous forme d'une sécrétion liquide et sucrée (Guerriat, 1996).

### 2.3 Différents types de miel selon l'origine florale

Des facteurs tels que le type de fleurs butinées ainsi que la région florale affectent le type de miel produit (ses propriétés sensorielles ; sa saveur, son aspect etc).

Selon le nombre d'espèces de fleur butiné par les abeilles ; unique ou bien multiple, le miel produit est alors mono-floral ou polyfloral respectivement (Cuvillier, 2015).

#### 2.3.1 Miel mono-floral

Les miels monofloraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques (Bogdanov et Blumer, 2001).

#### 2.3.2 Miel poly-floral

Ce type de miel provient souvent de plusieurs espèces végétales, les abeilles butinent le nectar et/ou le miellat de ces végétaux. Leurs origines géographiques permettent de valoriser leur spécificité et mettre en évidence leur caractère dominant aux consommateurs (Gonnet, 1997).

### 2.4 Production du miel en Algérie

Le Pays contient de nombreuses ressources mellifères variées ce qui détermine l'activité apicole en Algérie. L'apiculture est prédominante dans les régions suivantes :

- ❖ Zone de littoral : miel d'agrumes et eucalyptus.
- ❖ Zone de montagne : Kabylie : miel de toutes fleurs, lavande, carotte sauvage et bruyère.
- ❖ Hauts plateaux : miel de sainfoin, romarin et jujubier.

❖ Maquis et forets : miel toutes fleurs et miellat.

L'Algérie a produit 33000kg en 2011( 4 à 8 kg/ruche),ce niveau de production est faible par rapport aux potentialités mellifères du pays.L'importation du miel arrive a 150 000 tonnes par an ( chine, Inde, Arabie Saoudite et d'autres pays (Guerzou *et al.*, 2021).

### 2.5 Miel de Manuka

Le Manuka (*Leptospermum scoparium*) est un arbuste appartenant à la famille des Myrtaceae. Cette plante est originaire de la Nouvelle-Zélande et du sud-est de l'Australie. Le nom "Manuka" est dérivé de la langue maori, le peuple indigène de la Nouvelle-Zélande.Cette plante est connue comme une source de miel monofloral sain. Les abeilles récoltent le nectar des fleurs et le transforment en miel. La plupart de ce miel est produit en Nouvelle-Zélande, puis expédié dans d'autres pays.

Parmi les miels monofloraux, ce miel de manuka, un miel foncé, a fortement attiré l'attention de la communauté scientifique internationale pour ses propriétés biologiques, notamment pour ses capacités antimicrobiennes et antioxydantes. Dans la médecine traditionnelle, différents extraits du manuka sont utilisés comme sédatifs et comme remèdes pour la cicatrisation des plaies. En outre, le miel de manuka lui-même est utilisé depuis longtemps pour éliminer les infections, y compris les abcès, les plaies chirurgicales, les plaies traumatiques, les brûlures et les ulcères d'étiologies diverses (Patel et Cichello 2013).

La valeur sanitaire inégalée de ce miel est attribuée à sa teneur en substances phytochimiques, principalement du méthylglyoxal, mais aussi de peroxyde d'hydrogène et de D-glucono- $\delta$ -lactone qui sont dérivés du glucose (oxydation) et de la propolis (Anthimidou et Mossialos, 2013; Sherlock *et al.*, 2010).

Ces principaux composés bioactifs du miel de manuka et les mécanismes responsables de leurs activités biologiques font actuellement l'objet d'études. Ces études soutiendraient l'utilisation accrue du miel de manuka dans la médecine cutanée et pourraient également servir de base à l'isolement et à la purification de composés pour le développement de produits biopharmaceutiques aux propriétés antimicrobiennes et cicatrisantes ; ces nouvelles découvertes pourraient représenter une valeur économique ajoutée qui favoriserait également les apiculteurs dans leurs productions (Alvarez-Suarez *et al.*, 2014).

Le terme "IAA" signifie "International Antimicrobial Activity" (activité antimicrobienne internationale). Il s'agit d'un système de notation utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne

du miel de Manuka. L'IAA mesure le niveau d'un composé spécifique appelé méthylglyoxal (MGO) dans le miel, qui est responsable de ses propriétés antimicrobiennes (Sherlock *et al.*, 2010). Un indice IAA de 5+ indique que le miel de Manuka a une activité antimicrobienne modérée. Plus l'indice IAA est élevé, plus les propriétés antimicrobiennes du miel sont importantes (Bagnyuk *et al.*, 2021).

### 3. Propriétés organoleptiques des miels (sensorielles)

Le miel est une solution sucrée super-saturée, mais contient également de nombreuses substances secondaires. Les ingrédients du miel ont un effet sur les propriétés sensorielles. Les analyses sensorielles du miel ont des objectifs différents. Il s'agit ici de décrire et de communiquer les propriétés sensorielles, d'évaluer la typicité de la variété, de déterminer la popularité auprès des consommateurs ou d'identifier les défauts.

La détermination des variétés est donc effectuée par une combinaison d'analyses polliniques, paramètres chimiques et analyses sensorielles (Piana *et al.*, 2004). Les caractéristiques suivantes sont évaluées de manière visuelle et tactile :

#### 3.1 Texture

Il peut être liquide, si les sucres sont dissous, ou cristallisés, lorsque les sucres précipitent en formant des cristaux de manière plus ou moins complète. (Marcazzan *et al.*, 2018)

À basse température, les miels à faible teneur en eau cristallisent, le composant glucose développant d'abord une texture cristalline. Les miels de fleurs qui cristallisent rapidement sont par exemple le miel de colza et de tournesol. Le miel de miellat, le miel de châtaignier et le miel de robinier restent fluides plus longtemps. Le miel de forêt cristallise beaucoup plus lentement que le miel de fleurs. Les miels qui ont tendance à cristalliser rapidement sont le plus souvent remués pour produire un miel crémeux après centrifugation. Les cristaux grossiers sont considérés comme un défaut du miel (Piana *et al.*, 2004).

#### 3.2 Couleur

La couleur du miel est en corrélation avec sa teneur en composés phénoliques, en pollen et en substances minérales. Elle change au cours du stockage (Piana *et al.*, 2004).

Au cours du stockage, le miel devient plus foncé en raison des réactions de Maillard (Annexe 01) et de la réaction des polyphénols. La rapidité avec laquelle le miel fonce dépend des conditions de stockage. Les températures élevées favorisent le noircissement.

La plus grande différence réside dans l'intensité de la couleur qui peut varier de très claire (pâleur) à très foncée. Elle peut être évaluée selon l'échelle suivante : (très clair, clair, moyen, foncé, très foncé) (Marcazzan *et al.*, 2018).

La plupart des miels liquides ont une couleur qui correspond à une solution obtenue avec du colorant caramel. Cependant, ils peuvent prendre différentes teintes parfois : jaune vif, grisâtre, rougeâtre, avec un ton orange ou vert fluorescent, parfois terne, parfois vif (Marcazzan *et al.*, 2018).

Dans les miels cristallisés, la couleur varie en fonction du type de cristallisation et peut aller du blanc au brun foncé en passant par toutes les nuances de beige, si un miel cristallise, il apparaît plus clair . - clarté (pour le miel liquide) ; - impuretés ; - bulles d'air ou mousse..Ces changements de couleur peuvent être enregistrés et quantifiés par une analyse sensorielle ou instrumentale (Marcazzan *et al.*, 2018) .

### 3.3 Odeur

En évaluant l'intensité de l'odeur, nous nous référons à l'intensité globale de la sensation perçue lors de l'odorat du miel. L'échelle proposée est utilisée comme référence quantitative : - absent - faible - moyen – fort. Les descripteurs olfactifs peuvent être classés en familles et sous-familles. Celles-ci sont présentées en annexe 8 (Marcazzan *et al.*, 2018).

### 3.4 Goût

La teneur en hydrates de carbone du miel est de 80 à 85 %. La plus grande partie de cette teneur est constituée par les deux monosaccharides fructose (27 à 44%) et glucose (22 à 40%).Cependant, les disaccharides maltose (3 à 16 %) et saccharose (0 à 8 %) ou les trisaccharides (0 à 8 %) ou le trisaccharide melcitose sont également présents dans le miel. Environ 20 glucides différents ont été trouvés dans le miel. Dans les miels de fleurs, la proportion de sucre est typique de l'espèce végétale concernée, avec une prédominance du fructose et du glucose, mais dans des proportions différentes. Le fructose ayant un goût plus sucré glucose, tous les miels ne sont pas aussi sucrés les uns que les autres sucré. La composition du miel de miellat est différente. Le miel de miellat contient environ 25 à 55% dede saccharose et de faibles quantités de melcitose, un trisaccharide composé d'une molécule de fructose et de deux molécules de glucose.Les acides contenus dans le miel - acide gluconique, acide formique,

acide oxalique, acide acétique, acide tartrique, etc influencent également le goût. Toutefois, un goût acide peut également apparaître en cas de fermentation (Piana *et al.*, 2004).

### 3.5 Arôme

L'une des tâches de l'analyse sensorielle du miel consiste à évaluer la typicité de la variété. Celle-ci est également déterminée par l'analyse de l'arôme. Jusqu'à présent, pas moins de 300 substances aromatiques ont été détectées dans le miel. L'arôme est la "combinaison complexe des sensations olfactives, gustatives et trigéminales perçues lors de la dégustation (Marcazzan *et al.*, 2018; ISO 5492, 2008).

L'intensité de la sensation gustative sucrée, aigre, salée et amère est quantifiée comme suit : - absent - faible - moyen - fort (Marcazzan *et al.*, 2018) .Si le miel cristallise, l'eau qui était auparavant liée au glucose est libérée. L'activité de l'eau et donc le risque de fermentation qui devient perceptible dans un off-aroma fermentaire - augmente.

La chaleur laisse également des traces détectables et indésirables dans le miel. Lorsqu'il est chauffé, l'hydroxyméthylfurfural (HMF) qui donne au miel un arôme de type caramel. La teneur en HMF du miel est donc un paramètre de qualité mesurable (Derndorfer, 2015).

## 4. Caractérisation pollinique des miels

### 4.1 Pollen

Le pollen est la principale source de protéines, de substances grasses, de minéraux et de vitamines pour l'abeille et il est essentiel pour la croissance des larves et des jeunes abeilles adultes (Gary 1992; Herbert, 1992).Le pollen est également une bonne source de glycosides flavonoïdes (Mercan *et al.*, 2007). La composition du pollen est très importante pour l'analyse du miel et elle a été utilisée comme méthode traditionnelle pour déterminer l'origine florale du miel. Les taxons du pollen indiquent les sources florales utilisées par les abeilles pour produire le miel (Moore *et al.*, 1991; Sawyer et Pickard, 1988).

### 4.2 Origine des pollens dans le miel

Le miel naturel contient une petite quantité de pollen qui dépend de l'origine géographique et botanique de l'échantillon, ces facteurs influence la quantité ainsi que la qualité du pollen retrouvé dans le miel. Il provient des fleurs visitées par les abeilles.

Le pollen peut tomber mûr sur le nectar dans certaines morphologies florales ou provient de la pilosité de l'abeille butineuse en contact avec les étamines (Mercan *et al.*, 2007b; Louveaux *et al.*, 1978)

### 4.3 Composition du pollen

La composition du pollen dépend fortement de source végétale, avec d'autres facteurs tels que les conditions climatiques, le type de sol et des activités d'apiculteurs (Morais *et al.*, 2011).

### 4.4 Structure et fonction du pollen

Un grain de pollen est constitué de deux cellules non cloisonnées et possède donc deux noyaux haploïdes (végétatif et reproducteur), le tout est recouvert d'un manteau sous forme de double enveloppe (Figure 02-03). La première couche externe appelée « exine », parcourue de petits trous qui permettent lors de la reproduction, l'émission du tube pollinique conçu pour féconder l'ovule (Stanley et Linskens, 1974).

Le pollen a pour rôle d'assurer la reproduction par son transport de l'étamine (l'élément mâle) vers le pistil (élément femelle) de la fleur. Après la fécondation, l'ovaire se transforme en fruit et les ovules en graines (Boukendour, 2011).

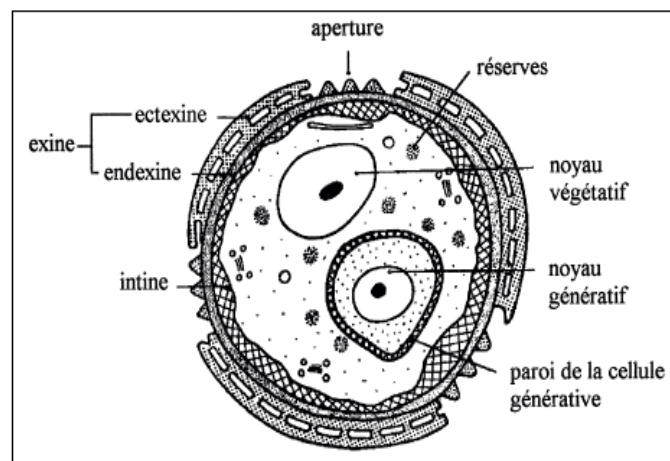


Figure 02 : Structure d'un grain de pollen (Laaidi *et al.*, 1997).



**Figure 03 :** Pelotes de pollen (Bogdanov, 2006).

#### 4.5 Identification du pollen

La couleur du pollen est très variée selon les fleurs butinées par l'abeille ; jaune, orangé, rouge sang, violet, verts, très sombre (noir presque) (Simenel *et al.*, 2015; Somme *et al.*, 2015).

Le microscope optique permet d'observer la forme du pollen et son aspect général, pour observer l'ornementation des grains de pollen et plus de détails le microscope électronique à balayage doit être utilisé (Boukendour, 2011).

La diversité et la fréquence des grains de pollen sont considérées en premier lieu lors de l'analyse des sédiments du miel, et constituent l'analyse pollinique du miel. Par conséquent, l'analyse pollinique des produits de l'abeille (miel, pollen et propolis) prend en compte les grains de pollen, leurs caractéristiques morphologiques qui conduisent à l'indication de l'espèce ou les taxons botaniques de leur origine, ainsi que la quantité qui peut être un indicateur de qualité. L'analyse palynologique des produits de l'abeille prend en compte, outre les grains de pollen, d'autres éléments structurés comme les spores et les hyphes de champignons, les algues, poils de plantes, soies d'insectes, silice, argile et terre, amidon et cire, qui enrichissent les données et les connaissances sur la qualité du produit, de son origine à sa transformation (Homrani, 2020).

#### 5. Paramètres physico-chimiques du miel

Habituellement, les miels sont acides en raison de leur faible pH (~pH 4), et sont composés de 80 % de sucres et de 17 % d'eau, tandis que les 3 % restants sont constitués de divers enzymes, acides et minéraux (Kahraman *et al.*, 2010). Cependant, la composition du miel diffère selon la source florale et l'origine (Lusby *et al.*, 2005).

### 5.1. Humidité

La teneur en eau est un paramètre de qualité, important avant tout pour la durée de conservation du miel, mais d'une importance mineure pour la caractérisation des miels unifloraux. La teneur en eau du miel dépend des facteurs environnementaux pendant la récolte et le stockage. Un miel à forte teneur en eau se traduit par un potentiel de fermentation plus élevé, ce qui rend la conservation et le stockage plus difficiles (Babarinde *et al.*, 2011). La mesure de l'indice de réfraction du miel avec une température de 20°C est utilisée pour déterminer la teneur en eau du miel, qui donne des informations sur la stabilité et la résistance du miel à la fermentation (Zulkhairi *et al.*, 2018 a). Si la teneur en eau du miel est supérieure à 19 %, la fermentation du miel est indésirable. Ainsi, un faible taux d'humidité est un bon signe pour une meilleure et plus longue durée d'utilisation du miel (Vit, 2012). Le seuil fixé par la commission internationale du miel pour un miel de bonne qualité en termes d'humidité est de 20 g/100 g, ce qui s'applique au miel d'*Apis mellifera* (Chuttong *et al.*, 2016).

### 5.2 Acidité libre

L'acidité libre du miel est liée à la présence d'acides organiques dans le miel. L'acidité libre élevée résulte de la fermentation des sucres en acides organiques par les enzymes sécrétées par les abeilles (Bensefia, 2019). La teneur en acidité libre du miel décrit la quantité ou la présence d'acides organiques tels que les acides butyrique, acétique, formique, lactique, succinique, pyrogutamique, malique et citrique en équilibre avec leurs lactones correspondants, ou leurs esters internes, et certains ions inorganiques, tels que le phosphate (Mesele 2021; Codex Alimentarius, 2001)

La teneur en acides organiques du miel est utilisée pour déterminer la fraîcheur du miel et séparer les miels en fonction de leur origine botanique et géographique (Zulkhairi *et al.*, 2018 b). Le miel de miellat et le miel de fleurs, ainsi que pour la classification du miel unifié.

Les valeurs acceptables de l'Union européenne (UE), et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) de l'acidité libre du miel sont fixées à une limite de < 0,05 pour l'acidité libre (meq/kg) (Conseil de l'Union européenne, 2002; Codex Alimentarius, 2001). L'acidité libre dans le miel d'abeille a été signalée comme variant de 5,9 meq/kg à 592 meq/kg. Les données d'acidité libre doivent être conformes aux normes établies par l'IHC à savoir une acidité libre ne dépassant pas 50 meq/kg (Bogdanov, 2002 a).

La variation importante de la quantité d'acides libres pourrait être due à une réflexion sur le temps nécessaire à la transformation complète du nectar en miel dans différentes conditions d'environnement, de force des colonies et de concentration en sucre du nectar (Mesele, 2021; Muli *et al.*, 2007). En effet, les valeurs de pH/acidité peuvent également varier en raison des techniques et des conceptions d'extraction et de stockage, et des types d'équipements et de matériaux utilisés pour le traitement (Nanda et Nakao, 2003; Terrab *et al.*, 2002). Lorsque l'acidité devient élevée, le miel est fermenté à un moment donné, et l'alcool qui en résulte est converti en acide organique. Ainsi, le miel devient aigre au goût, et par conséquent, il est moins acceptable car il est de mauvaise qualité (da Silva *et al.*, 2016).

### 5.3 La conductivité électrique

La conductivité électrique est un critère de distinction entre le miel de fleurs et le miel de miellat. La conductivité électrique est un indicateur utile de l'origine botanique. Elle joue un rôle important dans l'authentification du miel mono-floral et dans l'évaluation des caractéristiques physiques du miel (Serrano *et al.*, 2004; Mateo et Bosch-Reig, 1998).

La qualité du miel est évaluée en mesurant l'HMF (5-hydroxyméthylfurfuraldéhyde) ; l'HMF est généralement absent du miel nouvellement récolté. Pendant le stockage, l'emballage ou l'exposition à la chaleur, son niveau augmente. Les sucres du miel (hexoses) sont convertis en hydroxyméthylfurfural par un mécanisme de déshydratation catalysé par un acide (Solayman *et al.*, 2023; White, 1994). Pour s'assurer de la pureté du miel, on détermine sa teneur en HMF, qui est donc un paramètre crucial (Pasias *et al.*, 2022). De nombreux facteurs rendent très difficile la standardisation de la composition du miel et l'attribution de critères de qualité spécifiques. La qualité du miel est généralement basée sur des caractéristiques chimiques, sensorielles, physiques et microbiologiques (Geană *et al.*, 2020).

En général, les valeurs doivent être inférieures à la limite maximale de 0,8 mS/cm fixée par le Codex Alimentarius et la FAO/OMS du miel de fleurs est inférieure à 0,8 mS/cm, alors que celle du miellat doit être supérieure à 0,8 mS/cm (Codex Alimentarius, 2001). La conductivité électrique du miel est directement liée à sa concentration en minéraux, sels, d'acides organiques et de protéines (Živkov-Baloš *et al.*, 2018). Ce paramètre complète les autres paramètres utilisés dans la détermination de l'origine florale du miel (Acquarone *et al.*, 2007).

### 5.4 pH (potentiel d'hydrogène)

Le pH du miel est compris entre 3,4 et 6,4, bien que la limite du pH n'ait pas encore été décrite par les comités de réglementation, un niveau de pH entre 3,2 et 4,5 et l'acidité naturelle du miel inhibent la croissance des micro-organismes, car le pH optimal pour la plupart des organismes se situe entre 7,2 et 7,4 (Chuttong *et al.* 2016). Un pH plus faible est lié à la fermentation des sucres présents dans le miel en acide organique. Le miel de fleurs a un pH compris entre 3,5 et 4,5, mais le miel dont le pH est supérieur à 5 est de mauvaise qualité (Berhanu *et al.*, 2022).

### 5.5 Teneur en sucre

Dans le miel, la teneur en sucre et en eau est estimée à 95 - 99 %. Les types de sucre sont principalement le fructose, le glucose, le maltose, le raffinose et le saccharose. Les principaux sucres réducteurs du miel sont le glucose et le fructose qui représentent 65-75% des sucres totaux (Farh, 2016; Terrab *et al.*, 2002).

Les sucres contenus dans le pollen sont principalement le saccharose, le glucose et le fructose, mais leurs proportions relatives sont généralement assez variables ; mais très fiables pour certaines familles botaniques (Pozo *et al.*, 2015). En outre, le fructose et le glucose dans le miel sont crédités pour prédéterminer les phases de maturité du miel, les sources de nectar dans les différentes zones géologiques, et ils contribuent à décider de la composition en sucre du miel (Berhanu *et al.*, 2022). Un miel de bonne qualité doit avoir la valeur de sucre réducteur (somme de fructose et de glucose) inférieur à 65g/100 g. Cette limite minimale a été fixée par les réglementations européennes et le Codex (Conseil de l'Union européenne, 2002 ; Codex Alimentarius, 2001). Le glucose détermine la vitesse de cristallisation du miel tandis que le fructose détermine le niveau des caractéristiques hygroscopiques du miel (Mesele, 2021).

Connaître les principaux sucres réducteurs du miel permet de détecter et de différencier le miel de fleurs et le miel de miellat (Motari, 2010). En effet, le miel de miellat contient moins de monosaccharides (sucre réducteur) mais plus de di, tri et oligosaccharides que le miel de fleurs (Diez *et al.*, 2004).

En général, les types de miel provenant des plantes riches en nectar (miel floral) ont habituellement une teneur élevée en sucres réducteurs (Motari, 2010). Cela implique également que le système de gestion pendant la récolte, l'extraction et le traitement était bon (Maurizio, 1959). En outre, le sucre réducteur dans le miel permet de déterminer à l'avance les stades de

maturité du miel et les sources de nectar dans différents lieux géographiques et de déterminer la composition en sucre du miel (Da Silva *et al.*, 2016).

La détermination de la quantité de saccharose est un paramètre très important dans l'évaluation de la maturité des miels, l'identification de toute manipulation incorrecte du miel, ou l'alimentation artificielle prolongée des abeilles avec des sirops de saccharose (Codex Alimentarius, 2001). Selon les normes établies par l'IHC, un miel de bonne qualité doit avoir une teneur en saccharose qui n'est pas supérieure à 5 g/100 g (Bogdanov, 2002 b).

## 5.6 Couleur

La couleur est un des critères d'apparence très importants dans le commerce du miel et elle a une grande importance dans la définition botanique du miel. La plus grande différence réside dans l'intensité de la couleur qui peut varier de très claire (pâleur) à très foncée. Elle peut être évaluée selon l'échelle suivante - très clair - clair - moyen - foncé - très foncé (tableau 01).

La plupart des miels liquides ont une couleur qui correspond à une solution obtenue avec du colorant caramel. Cependant, la couleur du miel peut varier du jaune paille au presque noir. Ils peuvent parfois s'écarter de cette couleur caramel pour prendre différentes teintes : jaune vif, grisâtre, rougeâtre, avec un ton orange ou vert fluorescent, parfois terne, parfois vif. Dans les miels cristallisés, la couleur varie en fonction du type de cristallisation et peut aller du blanc au brun foncé en passant par toutes les nuances de beige (Marcazzan *et al.*, 2018).

**Tableau 01** : Analyse de la qualité des couleurs du miel de l'abeille (Ward, 2014).

Couleur	Indice de Pfund (mm)
Blanc d'eau	<08
Extra blanc	09-17
Blanc	18-34
Ambre extra clair	35-50
Ambre clair	51-85
Ambre	86-114
Ambre foncé	>114

Cette propriété dépend de la teneur en minéraux, en pollen et en composés phénoliques du miel (Solayman *et al.*, 2016). La couleur du miel varie fortement en fonction de son origine géographique (Bakchiche *et al.*, 2018). La méthode de production et les pratiques agricoles peuvent également influencer la couleur du miel ( De Almeida-Muradian *et al.*, 2013).

Le miel est classé par couleur, particulièrement les miels monofloraux, selon les normes de couleur approuvées par l'USDA (United States Standards for Grades of Extracted Honey, 1985).

### 5.7 Teneur en hydroxyméthylfurfural

La teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF) est largement reconnue comme un paramètre de la fraîcheur du miel. L'HMF est considéré comme un paramètre de qualité dans l'évaluation de la fraîcheur du miel et de sa détérioration, ce qui est en fait un indicateur approprié de la qualité du miel (Mesele, 2021; Rattanathanalerk *et al.*, 2005). L'HMF dans un miel récemment récolté est généralement absent, pendant la conservation, l'emballage ou l'exposition à la chaleur, son niveau augmente. Les sucres du miel (hexoses) sont convertis en hydroxyméthylfurfural par un mécanisme de déshydratation catalysée par un acide (Zappalà *et al.*, 2005; Belitz *et al.*, 1999). L'HMF est corrélé aux propriétés chimiques du miel telles que le pH ; il augmente à un faible pH (Khalil *et al.*, 2012; Zappalà *et al.*, 2005). L'HMF est un produit de dégradation des sucres simples, en particulier du fructose. Plusieurs facteurs ont été rapportés pour affecter la teneur en HMF, notamment le chauffage, les conditions de stockage, le pH des sucres simples provenant d'une source externe. L'HMF est formé par la décomposition des sucres réducteurs dans le miel en présence d'acide avec l'augmentation de la température et du temps de stockage par la réaction de Maillard (annexe 1) ; il peut également être créé en raison de mauvaises méthodes de traitement et de conditions de stockage. La teneur en HMF a été fixée à 40 mg/kg maximum dans un miel *Apis mellifera* de bonne qualité (Codex Alimentarius, 2001).

## 6. Composition du miel

Le miel se compose essentiellement d'eau, de sucres (glucose, saccharose, fructose), et de plusieurs composants mineurs. Environ 200 substances signalées, dont des acides aminés, des vitamines, des minéraux, des enzymes, acides organiques et de substances aromatiques sont également présentes dans le miel (Machado *et al.*, 2020; White, 1962).

La composition chimique du miel est diversifiée principalement en fonction de sa source botanique, de son emplacement géographique, de la saison, de la zone de collecte, de l'environnement, du traitement et des conditions de stockage. Ces facteurs contrôlent la concentration et les propriétés du sucre contenu dans le miel (Bouacha *et al.*, 2022).

### 6.1 La teneur en eau

La teneur en eau du miel est liée à différents facteurs climatiques, saisonniers, l'origine botanique et géographique du nectar, les conditions pédologiques et, la saison de récolte, l'intensité du flux de nectar, le degré de maturation, la manipulation par les apiculteurs pendant la période de récolte, ainsi que les conditions d'extraction, de traitement et de stockage. (Machado De-Melo *et al.*, 2018). Cependant, selon la saison de production et le climat, les miels unifloraux présentent des différences typiques de teneur en eau, qui affectent les propriétés physiques du miel (viscosité, cristallisation) et influencent également la valeur du rapport glucose/eau (Oddo *et al.*, 2004). L'humidité est un paramètre de qualité important pour évaluer le miel. C'est un indicateur important de la durée de conservation, la qualité, la durabilité du miel et surtout pour sa stabilité contre la fermentation et la granulation. L'humidité élevée accélère le processus de fermentation et réduit la durée de conservation du miel en augmentant la possibilité de fermentation du miel par certaines levures osmotolérantes. La pression osmotique du sucre n'est pas assez puissante pour éviter la prolifération de ces levures osmophiles (Afrin *et al.* 2019; Bogdanov et Martin, 2002).

Selon les législations internationales, la teneur optimale en eau varie entre 15% et 20% (Codex Alimentarius, 2001; Crane, 1975). Le miel dont la teneur en eau est plus élevée que 18,6 % ; ne peut pas être classé par l'USDA (United States Standards for Grades of Extracted Honey, 1985). La détermination de l'humidité du miel a été examinée en détail par White (1969) ; aucun développement significatif n'a eu lieu depuis. Certaines autres propriétés du miel telles que la couleur, la cristallisation, la viscosité, la saveur et la densité sont également affectées par la teneur en eau (Machado De-Melo *et al.*, 2018).

### 6.2 Les glucides

Le miel est un mélange très complexe de sucres principalement composé de glucides (tableau 02). Sa concentration doit être comprise entre 95% et 99% de son poids sec. Les principaux sucres du miel sont les monosaccharides (hexoses) fructose (32-44%) et glucose (23-38%) (Machado De-Melo *et al.*, 2018). Dans presque tous les types de miel, le fructose est le principal sucre, mais il y a des exceptions comme les miels de colza (*Brassica napus*), de pissenlit (*Taraxacum officinale*) et de myrtille (*Trichostema lanceolatum*), où le glucose est présent en plus grande quantité (White, 1979).

En outre, environ 25 oligosaccharides différents ont été détectés (Bogdanov *et al.*, 2008). Différents types de disaccharides et de trisaccharides ont été identifiés dans le miel (annexe 1). Les principaux oligosaccharides du miel de fleurs sont les disaccharides saccharose, maltose, tréhalose et turanose, ainsi que certains oligosaccharides importants sur le plan nutritionnel comme le panose, le 1-kestose, le 6-kestose et le palatinose (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Bogdanov *et al.*, 2008). La nature des sucres dépend du type de plantes butinées par l'abeille. L'index glycémique varie donc d'un miel à un autre. Par rapport au miel de fleurs, le miel de miellat contient des quantités plus élevées des oligosaccharides melezitose et raffinose (Bogdanov *et al.*, 2008 a). La liste des di et tri-saccharides (annexe 09-10) a été fournie par Moreira et De Maria (2001). Un grand nombre des différents sucres (disaccharides et trisaccharides) ne se trouvent pas dans le nectar, mais se forment lors de la maturation et du stockage sous l'effet des enzymes des abeilles et des acides du miel (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010). Ils sont produits par les abeilles pendant le processus de maturation par la conversion du saccharose du nectar par l'enzyme invertase provenant des glandes salivaires de l'abeille ( Afrin *et al.*, 2019; Machado De-Melo *et al.*, 2018).

**Tableau 02** : Teneurs en sucres des miels (Bessas, 2008)

Sucres	Miel de nectar (%)	Miel de miellat (%)
Fructose	32,5-45,2	28,3 - 39,8
Glucose	24,3-39,9	19 - 31,5
Saccharose	0,05-6,2	0,05 – 1,0
Maltose	0,1 - 2,3	0,5 - 2,5
Turanose	0,8 - 2,9	0,5-2,5
Tréhalose	0,05-1,5	0,1-2,4
Disaccharides	1,1-5,5	0,5 - 5,0
Mélézitose +raffinose	0,1 - 1,1	1,1-23,5
Maltotriose	0,1- 4,0	0,1 -1,3
Oligo- saccharides	1,0-3,0	1,0 -3,0
Isomaltose	0,2-2,2	0,1 - 10,8
Total	61,5-82,5	60,5-81,0

### 6.3 Les protéines

Les protéines du miel proviennent des glandes salivaires des abeilles et du nectar, miellat et surtout le pollen des plantes. Environ 20 protéines non enzymatiques différentes ont été identifiées dans le miel, dont beaucoup sont communes à tous les miels, où l'on retrouve les albumines, les globulines, les protéases et les nucléoprotéines (Doner, 2003; White, 1979). Le miel contient une teneur totale en protéines allant de 0,1 à 0,5 % (protéines, principalement des enzymes et des acides aminés libres), bien que certains miels, comme celui de bruyère lingue (*Calluna vulgaris*), possèdent une teneur en protéines plus élevée (1 à 2 %) (Machado De-Melo *et al.*, 2018).

Les inhibines et les défensines sont des protéines naturelles très importantes. Les inhibines empêchent la multiplication des bactéries alors que les défensines jouent un rôle dans le système immunitaire. Les teneurs élevées en protéines étaient considérées comme supérieures à 1000 µg/g (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010). La grande majorité des protéines présente dans le miel sont des enzymes ajoutées par les abeilles. Une teneur élevée en protéines peut révéler une teneur élevée en pollen, ce qui indique un miel naturel c à d de bonne qualité (Kwakman et Zaat, 2012).

### 6.4 Les enzymes

Le miel naturel contient une petite quantité d'enzymes, dont la diastase, l'invertase et la glucose-oxydase sont les plus importantes :

#### 6.4.1 Diastase (amylase)

Cette enzyme décompose l'amidon ou le glycogène en unités de sucre plus petites, La raison de la faible activité diastasique du miel pourrait être due à l'adultération, ou à l'alimentation artificielle des abeilles, à la surchauffe et au stockage excessif du miel (DE, 1985).

#### 6.4.2 Invertase (sucrase, $\alpha$ -glucosidase)

La gluco-invertase : qui décompose le saccharose en fructose et glucose= Elle permet l'hydrolyse du saccharose pour libérer le glucose et le fructose. De plus, l'invertase a une activité transglucosylatrice, produisant des sucres plus complexes à partir de monosaccharides (White et Maher, 1953). L'activité des enzymes diminue en cas de vieillissement et/ou de surchauffe puisqu'elles sont thermolabiles. Les abeilles produisent à partir des glandes hypopharyngiennes (origine animale) certaines enzymes comme l'invertase et la glucose-oxydase pour accomplir la maturation du nectar en miel (Doner, 2003). Certaines enzymes

proviennent du nectar, du miellat ou du pollen (origine végétale), comme la catalase et la phosphatase acide à l'exception de quelques enzymes comme la diastase qui a une double origine. D'autres origines possibles pourraient être les micro-organismes du miel et dans le cas du miel de miellat, certaines enzymes pourraient provenir des insectes suceurs de plantes qui produisent le miellat (Cavia *et al.* 2002). La teneur en enzymes dépend également de plusieurs facteurs tel que l'origine botanique du miel, l'état et de la force de la colonie, l'activité saisonnière des glandes hypopharyngiennes de l'abeille et de l'espèce, régime alimentaire, l'âge des abeilles, stade physiologique de l'abeille, flux d'abondance du nectar, degré de transformation du nectar (González *et al.*, 2010; Maurizio, 1962; Persano *et al.*, 1999; White, 1979b).

### 6.4.3 La Glucose Oxydase (Gox)

La glucose-oxydase dégrade le glucose en gluconolactone, qui donne à son tour de l'acide gluconique, augmentant l'acidité du miel, et libérant de petites quantités de peroxyde d'hydrogène, composé responsable de la résistance microbienne du miel (Machado De-Melo *et al.*, 2018b). Parmi les acides organiques, l'acide gluconique qui est dérivé du dextrose, via l'activité de la glucose oxydase. Cette enzyme est ajoutée par les abeilles ou par l'action des bactéries pendant la maturation (J. W. White, Subers, et Schepartz 1963; Stinson *et al.*, 1960).

Cependant, l'acidité excessive du miel n'est pas recommandée car elle conduit à une texture aigre, au mauvais goût et à la couleur (López *et al.*, 1996), et de tels types de miel pourraient être associés à une fermentation donnant lieu à de l'alcool puis à de l'acide acétique. Cette condition peut se produire en raison de la présence d'un nombre élevé de cellules de levure et de la teneur en humidité du miel qui favorise la prolifération des levures, la fermentation et la production d'acide. Par conséquent, la connaissance du pH/acides organiques de différents types de miel nous permet de détecter et de suggérer les sources des types de miel, le goût du miel ; et leur capacité de conservation (White et Doner, 1980)

### 6.5 Acides aminés

La quantité d'acides aminés libres totaux dans le miel se situe entre 10 et 200 mg/100g, Les acides aminés du miel proviennent principalement du pollen. Le profil des acides aminés peut permettre la caractérisation de l'origine botanique du miel, 50% des acides aminés retrouvés dans le miel correspondent à la proline, environ 26 autres acides aminés existent dans le miel dont les proportions dépendent de leur origine (nectar ou miellat) (Iglesias *et al.*, 2004).

Les principaux acides aminés identifiés dans le miel de différentes origines botaniques et géographiques sont : acide glutamique, acide aspartique, asparagine+sérine, glutamine, histidine, glycine, thréonine, b-alanine ,arginine ,a-alanine, acidg-aminobutyrique, proline, tyrosine, valine, méthionine, cystéine , isoleucine, leucine, tryptophane ,phénylalanine ,ornithine ,lysine (Pérez *et al.*, 2007; Paramás *et al.*, 2006; Iglesias *et al.*, 2004; Hermosín *et al.*, 2003)

### 6.6 Acides organiques

Les acides du miel représentent moins de 0,5% des solides totaux, mais sont importants pour le goût, l'arôme, la couleur et la conservation du miel, empêchent la croissance des micro-organismes (Ananias *et al.*, 2013; Bogdanov 2012). Plus de 30 acides organiques non aromatiques différents ont été trouvés dans le miel, tels que les acides acétique, butyrique, citrique, formique, lactique, maléique, malique, oxalique, fumarique, pyroglutamique, succinique, pyruvique et tartrique, entre autres (Mato *et al.*, 2003). Ils contribuent à l'acidité et à la conductivité électrique du miel. L'acide gluconique représentant les 70-90% du total des acides organique du miel , Il provient du glucose par l'action de la glucose oxydase (Bogdanov 2012).L'activité métabolique de certaines bactéries *Gluconobacter* de l'intestin des abeilles pourrait produire de l'acide gluconique (Khan *et al.*, 2020).

Dans le miel, l'acide gluconique est en équilibre avec la gluconolactone (Cavia *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2013).

### 6.7. Minéraux ou oligo-éléments

Les minéraux ou oligo-éléments présents dans le miel sont le potassium, le zinc, le phosphore, le calcium, le sodium, le magnésium, le soufre, le cuivre, le fer et le manganèse (Rao *et al.*, 2016). En raison de son goût unique et de sa haute valeur nutritionnelle, le prix du miel est relativement plus élevé que celui des autres édulcorants (Zulhairi *et al.*, 2018).

La teneur en minéraux (cendres) du miel peut être influencée par différents facteurs tels que l'origine florale, le type et la physiologie de chaque plante, les différences entre les types de sol, les conditions atmosphériques, les substances recueillies par les abeilles pendant le butinage (Khalafi *et al.*, 2016). Il peut également être influencé par les différences de teneur en minéraux des plantes productrices de nectar (Anklam, 1998). Les valeurs minérales du miel permettent d'identifier le miel par rapport à son origine botanique soit comme miel de miellat, miel mixte ou miel floral (White, 1962).

La teneur en minéraux du miel peut également jouer un rôle essentiel dans la détermination de la couleur, de la valeur nutritionnelle, de l'arôme, de la saveur, de la valeur médicinale et des qualités de conservation du miel. Le mélange de miel de fleurs et de miel de miellat peut donner lieu à des valeurs plus élevées de la teneur en minéraux, tandis que seul le miel de fleurs pur a une teneur en cendres plus faible que le miel de miellat (Ouchemoukh *et al.* , 2007). Dans le cas du miel d'*Apis mellifera*, il est fréquemment rapporté que la teneur en minéraux du miel est liée à l'indice de qualité du miel ; avantage nutritionnel du miel (Solyman *et al.* 2016).

### 6.8. Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont présents dans le miel à de très faibles concentrations sous forme de mélanges complexes de composants volatils de différentes fonctionnalités et de poids moléculaire relativement faible (Cuevas-Glory *et al.*, 2007).

L'arôme du miel est un paramètre de qualité important pour la commercialisation du miel (pour l'industrie alimentaire), en effet, la plupart des composés aromatiques varient dans les différents types de miel en fonction de leur origine botanique (Bogdanov *et al.*, 2004).

### 7. Micro-organismes

Ils ont une influence, notamment vis-à-vis d'autres microorganismes, ce sont essentiellement des probiotiques, qui se développent et en colonisant les voies digestives et constituent un système microbien synergique qui soutient la flore digestive (Piquepaille 1987). Plusieurs micro-organismes existent dans le miel tel que :

- *Lactobacillus et Bifidobacterium* (ferments lactiques) provenant du nectar ou du tube digestif de l'abeille.
- Des algues unicellulaires.
- Des levures.
- Spores de certaines bactéries comme *Bacillus* sp ou de *Clostridium botulinum*.
- Lipopolysaccharide des parois des bactéries à Gram négatif.

### 8. Autres composants

- ❖ Les arômes : offrent une odeur sucrée au miel. Cette sensation provient de l'acide phénylacétique des différents mélanges de plantes butinées.
- ❖ Les lipides : ils sont en faibles quantités, néanmoins on retrouve du cholestérol libre, des esters de cholestérol ou encore des acides gras.

- ❖ Les miels foncés sont plus concentrés en sels minéraux que les miels de couleurs claires.
- ❖ Les vitamines : La teneur en vitamines du miel est faible. Des vitamines telles que le phylochinon (K), la thiamine (B1), la riboflavine (B2), la pyridoxine (B6) et la niacine sont signalées dans le miel (Cuvillier, 2015).

### 9. Les antioxydants

Comme leur nom l'indique, sont des substances chimiques qui inhibent l'oxydation, les antioxydants doivent donc agir comme des piègeurs de radicaux, qui transforment les radicaux réactifs en formes moins réactives et empêchent les réactions avec les cellules du corps afin d'éviter les dommages cellulaires (Kumar *et al.*, 2014). Les composés phytochimiques tels que les polyphénols sont les principaux contributeurs aux effets des antioxydants dans le miel (Khalil *et al.*, 2012). Les polyphénols sont composés de flavonoïdes et d'acides phénoliques, qui avec d'autres composants tels que les acides organiques, les acides aminés, les protéines, les caroténoïdes, l'enzyme glucose oxydase et la catalase, sont attribués aux propriétés antioxydantes du miel (Khalil *et al.*, 2010). Ce sont des composés odorants avec au moins un groupe hydroxyle qui agissent comme antioxydants, en éliminant les radicaux libres et en inhibant l'oxydation des lipides. En raison de leur structure chimique, ils peuvent être divisés en acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique et il existe environ 10 000 composés phénoliques (Singleton *et al.*, 1999). Plusieurs composés phénoliques ont été déjà indentifiés dans le miel tel que l'acide caféique, l'acide syringique, l'acide  $\beta$ -coumarique, l'acide férulique, la quercétine, le kaempférol, la myricétine, la pinobanksin, pinocembrine, chrysine, acide ellagique, galangine, acide 3-hydroxybenzoïque, acide chlorogénique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide rosmarinique, acide gallique, hespérétine, acide benzoïque et autres (Khalil *et al.*, 2011; Hatano *et al.*, 1988).

### 10. Effets thérapeutique de miel

#### 10.1. Effets antibactériens

Le miel possède un puissant agent antibactérien grâce à sa forte osmolarité, son acidité et surtout sa teneur en peroxyde d'hydrogène (Boudiar *et al.*, 2022). Dans le miel, il existe deux mécanismes d'activités antibactériennes. La première activité provient des composés du peroxyde d'hydrogène, appelée voie dépendante du peroxyde (activité antibactérienne du peroxyde), qui représente le principal contributeur à l'activité antibactérienne. Pendant le processus de maturation du miel, l'oxydation du glucose, qui émerge de la glucose oxydase (GOx), produit du peroxyde d'hydrogène (Almasaudi, 2021; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

L'action de la glucose oxydase, qui produit de l'hydrogène peroxydase ( $H_2O_2$ ), pourrait inhiber la croissance bactérienne. Certaines conditions telles que la température et la concentration en sucre doivent être maintenues à certains niveaux pour que la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le miel soit suffisamment élevée pour protéger certains micro-organismes pathogènes en perturbant leur métabolisme par une voie biochimique. Même lorsque le miel est dilué dans l'eau, il reste un puissant agent topique de cicatrisation (Mandal et Mandal, 2011). D'autre part, le deuxième mécanisme est une activité antibactérienne non peroxyde causée par les lysozymes, les acides phénoliques et les flavonoïdes. Cette activité est liée à l'origine des plantes et des abeilles (Bouacha *et al.*, 2018; Bogdanov 1997). Ces facteurs résistent bien à la lumière et à la chaleur et permettent au miel de rester intact après une longue période de stockage (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Taormina *et al.*, 2001).

Le miel contient des acides organiques (acide gluconique) et des ions inorganiques (phosphate, chlorure), qui sont responsables de son acidité. L'acidité élevée offre au miel une résistance à l'altération bactérienne. Il s'agit de la transformation des sucres en acides organiques. Selon les normes, les miels dont le pH est faible (3,5 et 4,5) sont des miels de fleurs (Bogdanov, 1997).

Le pH est l'un des facteurs du miel qui inhibe la croissance bactérienne. C'est pourquoi on parle d'"inhibines". Ces éléments améliorent considérablement le pouvoir antibactérien du miel en agissant seuls ou en synergie (Wahdan, 1998; Oka *et al.*, 1987). Le miel est naturellement acide quelle que soit son origine géographique, avec un pH compris entre 3,2 et 4,5, ce qui peut être dû à la présence d'acides organiques. Certains auteurs ont remarqué que ce faible pH constitue un milieu hyperosmotique, une propriété puissante agissant comme un inhibiteur de croissance pour de nombreuses bactéries pathogènes. En absorbant l'eau vitale de ces pathogènes, il fournit un milieu où ces bactéries ne peuvent pas se multiplier (Kone *et al.*, 2016; Speer *et al.*, 2015; Mandal et Mandal, 2011; Bogdanov, 2002).

Plusieurs auteurs ont prouvé le fort effet antibactérien du miel contre les infections bactériennes causées par des souches pathogènes multirésistantes (Abolhassani *et al.*, 2022; Cilia *et al.*, 2020; Bucekova *et al.*, 2019; Bouacha *et al.*, 2018).

L'activité antibactérienne du miel a été testée contre de nombreuses espèces bactériennes pathogènes dans différents environnements pour traiter les plaies et les infections de brûlures souvent causées par le SARM et *Pseudomonas* (Hazrati *et al.*, 2010). Aussi, il a été testé contre les infections des voies urinaires chez les femmes enceintes causées par des souches

multirésistantes telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc (Almasaudi, 2021; Bouacha *et al.*, 2018; Lusby *et al.*, 2005).

### 10.2 Effet antioxydant

Les radicaux libres d'oxygène sont un sous-produit naturel du métabolisme dans l'organisme. Les radicaux libres peuvent oxyder les acides nucléiques, les protéines, les lipides ou l'ADN et ont le potentiel de déclencher des maladies dégénératives. Il existe également des rapports préliminaires indiquant le rôle du stress oxydatif dans le vieillissement (Gilca *et al.*, 2007). Le terme "stress oxydatif" décrit le manque d'équilibre entre la production de radicaux libres et l'activité protectrice des antioxydants dans un organisme donné. La protection contre l'oxydation permet de prévenir certaines maladies chroniques (Ames *et al.*, 1993).

Les cellules présentent un système de défense contre les dommages oxydatifs. Ce système de défense se compose de radicaux libres et d'autres agents de protection contre l'oxydation tels que la catalase, la superoxyde dismutase, la peroxydase, l'acide ascorbique, le tocophérol et les polyphénols (Nagai *et al.*, 2001). Les antioxydants permettent le traitement des dégénérescences cellulaires commencent à être pris en compte car ils inhibent ou retardent le processus oxydatif en bloquant à la fois l'initiation et la propagation des réactions en chaîne oxydantes.

Le miel possède une activité antioxydante significative, y compris la glucose oxydase, la catalase, l'acide ascorbique, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les dérivés caroténoïdes, les acides organiques, les produits de la réaction de Maillard, les acides aminés et les protéines (Pérez *et al.*, 2007; Beretta *et al.*, 2005; Al-Mamary *et al.*, 2002). Cependant, la capacité antioxydante varie fortement en fonction de la source florale du miel, probablement en raison des différences dans le contenu des métabolites secondaires des plantes et de l'activité enzymatique.

### 10.3 Activité antimutagène

Récemment, la capacité du miel à inhiber les effets mutagène de substances chimiques a été documentée par certaines études (Bouacha *et al.*, 2022; Saxena *et al.*, 2017).

En effet, le miel présente un bon effet antimutagène, ce qui signifie qu'il peut protéger l'ADN des effets négatifs potentiels de réactions induisant des mutations. Bien que le mécanisme impliqué dans l'effet antimutagène du miel n'est pas bien identifié, cependant, il pourrait être

lié à de nombreuses substances biologiques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes, les vitamines, les enzymes et les minéraux. L'effet thérapeutique du miel

varie considérablement en fonction de la source florale, le climat, les conditions de récolte, la saison, les facteurs environnementaux et des conditions de stockage (Bouacha *et al.*, 2022; Bucekova *et al.*, 2018).

En effet, le contenu total en polyphénols tels que les acides phénoliques, les naphthoquinones, les xanthones, les stilbènes, les flavonoïdes, les lignanes, les lignines et les tannins condensés sont devenus de plus en plus importants pour les scientifiques qui recherchent de nouveaux composés capables de prévenir plusieurs maladies humaines, y compris les maladies cancéreuses. Ceci est dû à leurs propriétés antimutagènes et anticarcinogènes (Santos-Buelga *et al.*, 2019; Gómez-Maqueo *et al.*, 2018; Belščak-Cvitanović *et al.*, 2018).

# Chapitre II :

## Les Souches bactériennes

### Chapitre II : Souches bactériennes

Les infections des voies urinaires et les infections de plaies sont des affections courantes qui peuvent avoir un impact important sur le bien-être des individus. Un point commun entre les infections des voies urinaires et les infections de plaies réside dans leur susceptibilité à la colonisation bactérienne. Les deux infections impliquent l'introduction et la multiplication de micro-organismes, principalement des bactéries, dans des sites anatomiques spécifiques - les voies urinaires dans le cas des infections urinaires et les plaies ouvertes dans le cas des infections de plaies. L'invasion microbienne peut entraîner une inflammation, des complications et, en l'absence de traitement, des conséquences potentiellement graves pour les personnes concernées. Elles représentent un risque considérable, en particulier dans les environnements hospitalier et de soins de santé (Flores-Mireles et al., 2015).

#### 1. Les infections des plaies cutanées

La peau constitue une barrière efficace contre les infections bactériennes. Bien que de nombreuses bactéries puissent entrer en contact avec la surface de la peau ou y résider, elles ont généralement du mal à provoquer une infection. Les infections bactériennes de la peau varient en gravité, allant d'un simple bouton à une atteinte de la totalité de la surface corporelle, et leur degré de sévérité peut aller de bénin à potentiellement mortel (Knapp et al., 2020).

Les infections bactériennes de la peau se développent lorsque des bactéries pénètrent dans la peau à travers les follicules pileux ou de petites blessures cutanées provoquées par des égratignures, des morsures, des interventions chirurgicales, des brûlures, des coups de soleil, des morsures d'animaux ou d'insectes, des lésions cutanées préexistantes. Ces infections peuvent survenir après diverses activités, telles que le jardinage dans un sol contaminé ou la baignade dans des plans d'eau comme des étangs, des lacs ou de l'eau de mer contaminée.

Certaines infections peuvent se limiter à la peau, tandis que d'autres peuvent également affecter les tissus mous situés sous la surface cutanée. Les infections mineures incluent :

- L'anthrax
- L'ecthyma
- L'érythrasma
- La folliculite
- Les furoncles

- L'impétigo
- La lymphadénite
- De petits abcès cutanés remplis de pus

Les infections bactériennes plus graves qui touchent la peau et ses structures sous-jacentes comprennent :

- La cellulite
- L'érysipèle
- De grands abcès cutanés
- La lymphangite
- Les infections cutanées nécrosantes
- Les infections de plaies

Le syndrome de nécrolyse épidermique staphylococcique, la scarlatine et le syndrome du choc toxique sont des conséquences d'infections bactériennes associées à la peau (Watkins et al., 2021).

Divers types de bactéries peuvent infecter la peau, les plus courantes étant le Staphylocoque et le Streptocoque. Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), également connu sous le nom de SARM, est une bactérie courante responsable d'infections cutanées aux États-Unis. Le SARM est résistant à de nombreux antibiotiques couramment utilisés en raison de modifications génétiques qui lui permettent de survivre malgré l'exposition à certains antibiotiques. Afin de traiter efficacement le SARM, les médecins adaptent leur traitement en fonction de sa fréquence dans la région et de sa résistance à certains antibiotiques couramment utilisés (Brazel et al 2021).

### **2. Les infections urinaires**

L'infection des voies urinaires (IVU) est un terme général qui décrit la colonisation microbienne de l'urine et l'infection des structures des voies urinaires - rein, bassin rénal, uretères, vessie et urètre, ainsi que les structures adjacentes telles que le fascia périnéphrique, la prostate et l'épididyme (Kunin et al., 2021).

Les infections urinaires sont généralement classées en fonction du site d'infection et peuvent également être classées selon qu'elles sont simples (survenant dans les voies urinaires normales d'individus immunocompétents, généralement de jeunes femmes en bonne santé et non

enceintes) ou compliquées (survenant chez des individus de tous âges et de tous sexes qui sont immunocompromis ou dont les voies génitales présentent des anomalies structurales ou fonctionnelles, y compris le cathétérisme urétral) (Hooton, 2003 ; Kunin, 1997, Mobley, 1996).

La majorité des infections urinaires sont causées par des entérobactéries qui proviennent de l'intestin avant de pénétrer dans l'urètre (Robert et al., 1987). Les membres cliniquement importants des entérobactéries se répartissent en deux groupes : les agents pathogènes opportunistes et les agents pathogènes manifestes.

Les pathogènes opportunistes comprennent le plus souvent *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp, et *Morganella* sp. Bien qu'ils soient considérés comme des pathogènes opportunistes, ces organismes produisent des facteurs de virulence importants, tels que l'endotoxine, qui peuvent être à l'origine d'infections fécales. Cependant, comme ils ne déclenchent généralement pas de maladie chez les hôtes humains sains et non compromis, ils sont considérés comme opportunistes (Betty et al.,1998). Bien qu'*E.coli* soit un habitant normal de l'intestin, sa classification pathogène se situe quelque part entre celle des pathogènes manifestes (par exemple *Salmonella*, *Shigella* et *Y.pestis*) et celle des organismes opportunistes. Les souches de cette espèce expriment de puissantes toxines et provoquent de graves infections gastro-intestinales (Rahal et al., 2000). *E.coli* était l'organisme isolé le plus fréquent, responsable de 59 % des infections monobactériennes, les autres bactéries isolées étant *Klebsiella* spp., *Proteus* spp et *Enterococcus faecalis*. Les souches d'*E. coli* acquises dans la communauté étaient plus susceptibles de porter des déterminants multiples pour des adhésions particulières (fimbriae P et S) et des toxines (hémolysine a et facteur nécrosant cytotoxique) que les souches fécales.

Les souches d'*E. coli* acquises dans la communauté étaient plus susceptibles de porter des déterminants multiples pour des adhésions particulières (fimbriae P & S) et des toxines (a - hémolysine et facteur nécrosant cytotoxique) que les souches fécales. La fréquence de transport des souches de reconstruction de la vessie était intermédiaire et non significativement différente. La principale constatation est que les souches d'*E.coli* persistent pendant des périodes prolongées, y compris 2 ans chez certains patients, souvent en dépit de divers traitements antimicrobiens (Gniadkowski et al., 2001).

### 3. *Escherichia coli*

#### 3.1. Historique

La "diarrhée infantile" était un terme utilisé pour décrire les symptômes d'une infection qui existait depuis plusieurs siècles. Au fil des quatre derniers siècles, cette condition a été décrite sous de nombreux synonymes tels que "prise aux tripes", "choléra infantile", "diarrhée d'été", et "gastro-entérite". Jusqu'au début du siècle dernier, la diarrhée infantile constituait un problème majeur dans le monde entier, engendrant des taux élevés de morbidité et de mortalité chez les nourrissons. Cependant, à partir de 1920, la mortalité associée à la diarrhée infantile a commencé à diminuer dans les pays développés, ce qui a entraîné une réduction de la morbidité infantile. Cette diminution a également conduit à un déclin de l'intérêt pour la recherche sur l'étiologie de la diarrhée infantile. Malgré cette tendance positive, les années 1930 ont été marquées par des épidémies graves d'entéropathie néonatale nosocomiale à New York, aux États-Unis, chaque épidémie étant associée à un taux de mortalité élevé (Kramer et al., 1960).

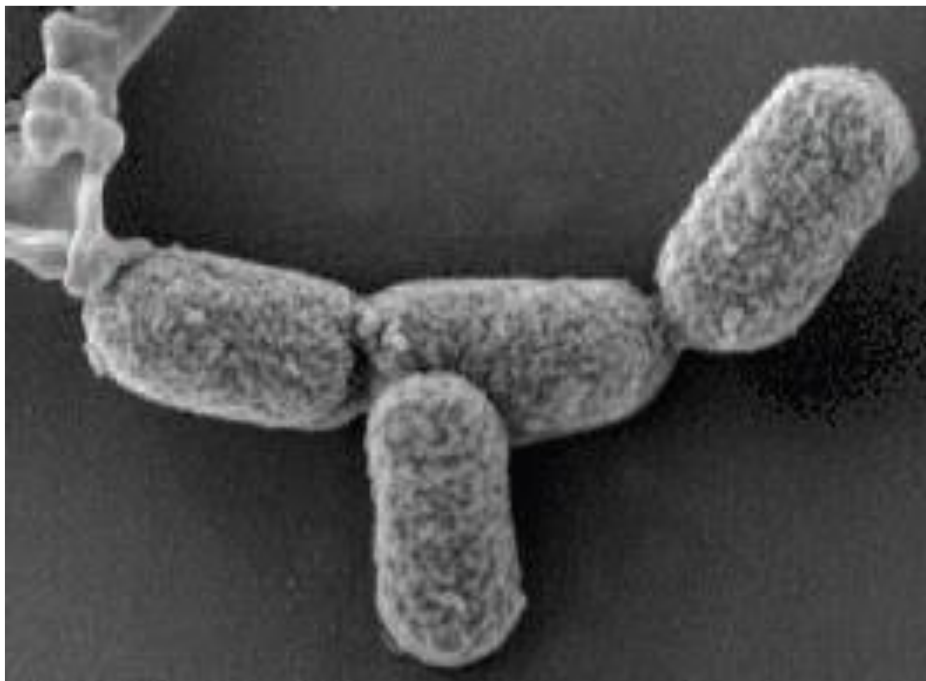
#### 3.2. Définition

Cette espèce appartient à la flore normale du tractus gastro-intestinal humain et animal, existe dans les eaux, le sol, et la faune. La plupart sont mobiles ; certains sont capsulés.

Cette espèce cause les infections des voies urinaires : cystite, pyélonéphrite, infection des plaies - appendicite, péritonite, septicémie et méningite néonatales. Certaines souches d'*E. coli* causant des maladies diarrhéiques :

- ***E. coli* entéropathogène (EPEC)** provoque des épidémies de diarrhée infantile autolimitative des diarrhées sévères chez les adultes. Le traitement antibiotique raccourcit la durée de la maladie et permet de guérir la diarrhée.
- ***E. coli* entéro-invasif (EIEC)** : non mobile, ne fermentant pas le lactose, envahit la muqueuse de l'iléon et du côlon et provoque une dysenterie de type shigellose chez les enfants des pays en développement et les voyageurs dans ces pays
- ***E. coli* entérotoxique (ETEC)** : le facteur de colonisation de l'organisme favorise l'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin grêle suivie de la libération d'entérotoxine qui provoque diarrhée aqueuse médiée par la toxine chez les nourrissons et les jeunes adultes (cause importante de la diarrhée du voyageur). La prophylaxie antibiotique peut être efficace mais peut augmenter la résistance aux médicaments (ne devrait pas être uniformément recommandée)

- ***E.coli* entéro-hémorragique (EHEC)** : *E.coli* de sérotype O157:H7 produisant une vérotoxine cytotoxique, provoque une colite hémorragique (forme sévère de diarrhée) et une infection de l'estomac et le syndrome hémolytique et urémique caractérisé par une insuffisance rénale aiguë, une anémie hémolytique et une faible numération plaquettaire.
- ***E.coli* entéro-agressif (EAEC)** : adhèrent aux cellules de la muqueuse intestinale de l'homme et produisent une toxine de type ST (thermostable) et de l'hémolysine, et provoque des diarrhées aiguës et chroniques chez les personnes vivant dans les pays en développement (Hartl et Dykhuizen, 1984 ).



**Figure 04** : *E.coli* sous Microscope électronique a Balayage (Leboffe et Pierce, 2021)

### 3.3. Habitat

La bactérie *Escherichia coli* a deux habitats principaux (figure 04). Le premier, que l'on peut appeler l'habitat primaire, est l'intestin inférieur (colon) des animaux à sang chaud, comme indiqué par Rosebury (1962) et Smith (1965). Le second, que l'on peut nommer l'habitat secondaire, englobe l'eau, les sédiments et le sol, comme suggéré par Van Donsel et al. (1967),(1971), Faust (1976), et Doran et Linn (1979). Chacun de ces habitats est constitué de micro-environnements complexes, influencés par divers facteurs tels que la géométrie physique, le régime alimentaire de l'hôte, le système immunitaire de l'hôte, l'état physiologique de l'hôte, et l'état de santé de l'hôte dans le cas de l'habitat primaire. De plus, les interactions avec d'autres micro-organismes présents dans la même région jouent un rôle essentiel. L'habitat secondaire est tout aussi complexe, avec des déterminants incluant des facteurs géométriques et physiques liés à l'eau, aux sédiments ou au sol, des facteurs climatiques et météorologiques, l'apport en nutriments dans un pâturage ou un bassin versant, ainsi que la présence d'autres microorganismes dans le même écosystème. Bien que la compréhension détaillée de ces habitats soit encore limitée, des informations suffisantes sont disponibles pour tirer quelques conclusions générales sur leurs caractéristiques moyennes (Savageau,1983).

### 3.4. Pathotypes et pathogénie

*E. coli* entéropathogène (EPEC). L'EPEC a été le premier pathotype d'*E. coli* à être décrit. Les mécanismes par lesquels les EPEC provoquent la diarrhée étaient inconnus et ce pathotype n'a pu être identifié sur la base du sérotypage O:H. Cependant, depuis 1979, de nombreux progrès dans la compréhension de la pathogénie de la diarrhée à EPEC, de telle sorte que l'EPEC est aujourd'hui l'un des mieux de tous les *E. coli* pathogènes.

Une histopathologie intestinale caractéristique est associée aux infections à EPEC ; connue sous le nom d'"attachement et effacement" (A/E), cette histopathologie est associée à des infections à *E. coli*. Les bactéries s'attachent intimement aux cellules épithéliales intestinales et provoquent des changements cytosquelettiques, notamment l'accumulation d'actine polymérisée directement sous les bactéries adhérentes. Les microvillosités de l'intestin sont effacées et les structures en forme de piédestal sur lesquelles les bactéries se perchent fréquemment sur lesquelles les bactéries se perchent s'élèvent fréquemment de la cellule épithéliale (figure 05) (Kaper, 2005).

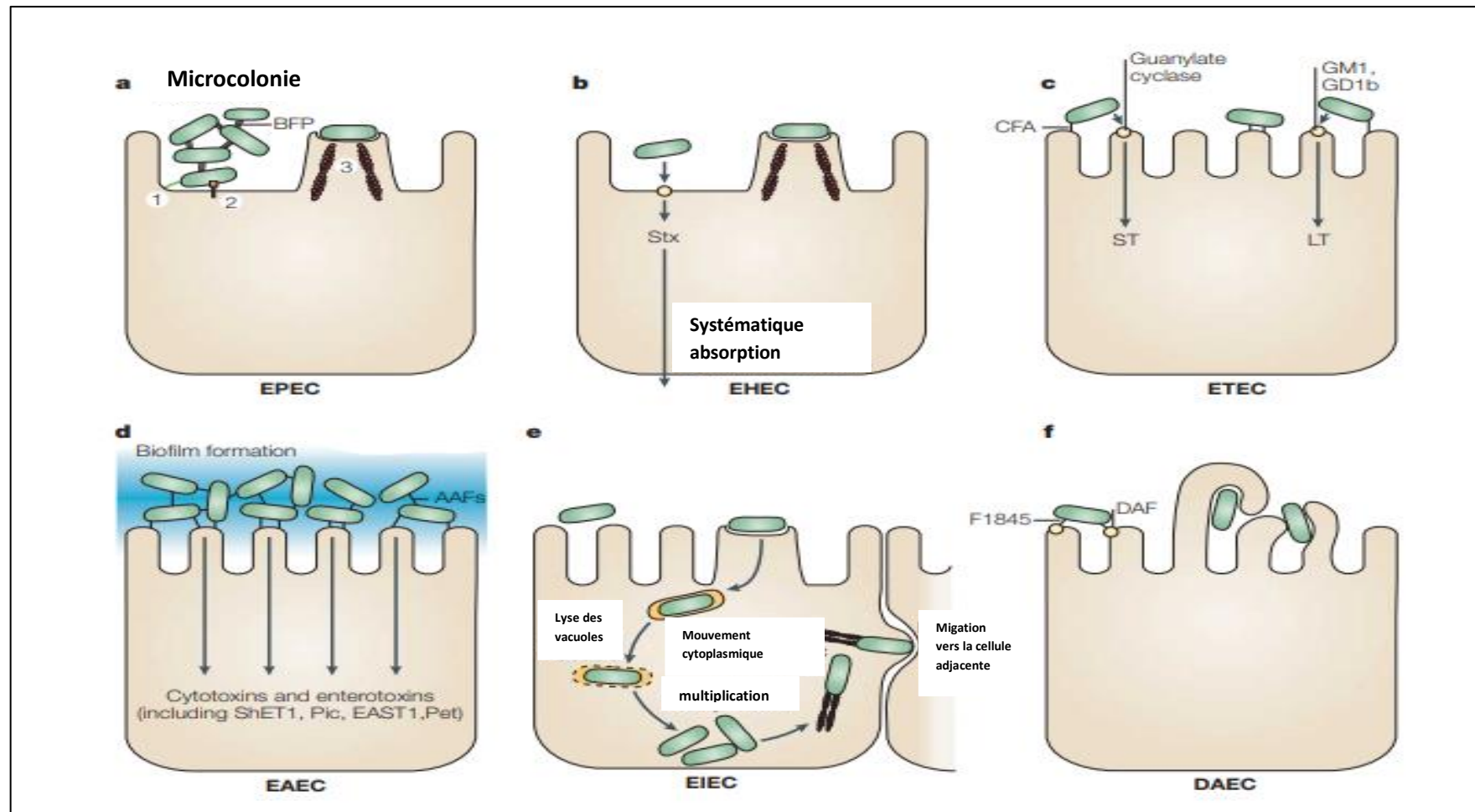


Figure 05 : Schéma pathogénique des *E. coli* diarrhéiques (Kaper, 2005)

### 3.5 Structure antigénique

Les antigènes d'adhérence (ou adhésines) de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

Parmi les principaux genres isolés dans les infections urinaires selon leur fréquence d'isolement *Escherichia coli* est l'espèce la plus fréquemment isolée du genre.

### 3.6. Résistance aux antibiotiques

La résistance naturelle aux antibiotiques est aussi d'une grande aide à la démarche d'identification des entérobactéries, ainsi les *Proteus* sont naturellement résistantes aux nitrofuranes et à la colistine. Les *E.coli* et *Klebsiella* sont devenues résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G), qui constituent les antibiotiques de référence pour traiter ces espèces bactériennes.

La résistance acquise, souvent d'origine plasmidique, comme le phénotype « pénicillinase de haut niveau » retrouvé chez près de la moitié des souches de *E.coli* et l'émergence des BLSE, et plus récemment des céphalosporinases plasmidiques, a encore montré l'inefficacité des  $\beta$ -lactamines sur de nombreuses souches d'*E.coli* (Zimmer et al., 2006).

#### 3.6.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines

La résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Escherichia coli*, une bactérie Gram négatif, peut être due à des mécanismes naturels ou acquis. La résistance naturelle est inhérente à toutes les souches d'une espèce bactérienne, tandis que la résistance acquise résulte de mutations génétiques ou du transfert horizontal de gènes.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *E. coli* :

#### Mécanismes non enzymatiques :

##### 1.Modification de la cible PLP (Protéine de liaison aux pénicillines) :

Modification qualitative : Une mutation de la cible de l'antibiotique peut altérer la structure, empêchant le lien avec l'antibiotique. Certaines protéines peuvent aussi restreindre l'accès de l'antibiotique à son site de liaison.

Modification quantitative : Augmentation de l'expression de la cible de l'antibiotique, permettant aux bactéries de maintenir une activité biologique suffisante malgré la présence de l'antibiotique.

### 2. Système d'efflux

Utilisation de pompes à efflux, des protéines transmembranaires, pour expulser activement les antibiotiques en dehors de la bactérie. Ce mécanisme réduit la concentration d'antibiotiques dans la cellule, limitant ainsi leur efficacité.

Plusieurs familles de pompes à efflux sont impliquées, telles que les familles ABC, RND, MSF et SMR, chacune ayant sa spécificité dans le transport des antibiotiques.

### 3. Diminution de la perméabilité

Les  $\beta$ -lactamines, molécules hydrophiles, pénètrent la cellule par les porines, des canaux protéiques dans la membrane externe. La résistance peut survenir par modification de la structure ou la diminution du nombre de porines, limitant l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie.

Des souches d'*E. coli* présentant des altérations ou une réduction de l'expression des porines de type OmpC et/ou OmpF ont montré une réduction de sensibilité aux  $\beta$ -lactamines. Ces mécanismes peuvent être intrinsèques à *E. coli* ou acquis par le biais de mutations ou de transfert de gènes. La compréhension de ces processus est cruciale pour développer des stratégies efficaces de lutte contre la résistance aux antibiotiques.

#### 3.6.2. Résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones

La résistance de *Escherichia coli* aux quinolones et aux fluoroquinolones, deux classes d'antibiotiques largement utilisées, est devenue une préoccupation majeure dans les établissements de soins et dans le domaine de la santé publique en général.

Les mécanismes à l'origine de la résistance de *E. coli* aux quinolones et aux fluoroquinolones sont les suivants :

**Altérations du site cible :** Les quinolones et les fluoroquinolones agissent en inhibant des enzymes bactériennes connues sous le nom de topoisomérases, cruciales pour la réplication et la transcription de l'ADN. Des mutations dans les gènes codant pour ces enzymes (gyrases et topoisomérases IV) peuvent réduire l'affinité des antibiotiques pour leurs cibles, diminuant ainsi leur efficacité (Garneau et Labby, 2016).

**Mécanismes de pompe à efflux :** Les bactéries, y compris *E. coli*, peuvent utiliser des pompes à efflux pour éliminer activement les quinolones et les fluoroquinolones de l'intérieur de la cellule bactérienne. Ce processus abaisse la concentration intracellulaire des antibiotiques, réduisant ainsi leur efficacité (Pagès et Amaral, 2009).

**Acquisition de gènes de résistance :** *E. coli* peut acquérir des gènes de résistance par transfert horizontal de gènes, souvent par l'intermédiaire de plasmides ou d'autres éléments génétiques mobiles, à partir d'autres bactéries résistantes. Ces gènes peuvent coder pour des protéines renforçant la résistance, telles que des protéines de transport actives ou des enzymes qui modifient les antibiotiques, conférant ainsi une résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones (Cattoir, 2016).

### 2.6.3 Résistance aux aminoglycosides

*Escherichia coli* peut développer une résistance aux antibiotiques aminoglycosides par le biais de divers mécanismes, tant intrinsèques qu'acquis. La résistance aux aminoglycosides chez *E. coli* peut être due à plusieurs facteurs, notamment :

**Modification enzymatique :** Les bactéries *E. coli* peuvent produire des enzymes qui modifient les aminoglycosides, les rendant inefficaces. Des enzymes telles que les enzymes modifiant les aminoglycosides (AME) peuvent modifier chimiquement la structure des aminoglycosides, réduisant ainsi leur capacité à se lier au ribosome bactérien, qui est leur site cible. Les acétyltransférases, les phosphotransférases et les nucléotidyltransférases des aminoglycosides sont des exemples d'AME (Egorov *et al.*, 2018).

**Diminution de l'absorption :** Les altérations de la membrane externe de la cellule bactérienne peuvent limiter l'entrée des aminoglycosides, réduisant ainsi leur absorption dans la cellule bactérienne. Cela peut impliquer des changements dans les protéines porines ou d'autres mécanismes qui régulent l'afflux d'antibiotiques dans la cellule (Reygaert, 2018).

**Pompes d'efflux :** À l'instar des mécanismes de résistance à d'autres antibiotiques, *E. coli* peut utiliser des pompes d'efflux qui expulsent activement les aminoglycosides hors de la cellule bactérienne. Ces pompes réduisent la concentration intracellulaire des antibiotiques, minimisant ainsi leur efficacité (Mahamoud *et al.*, 2007).

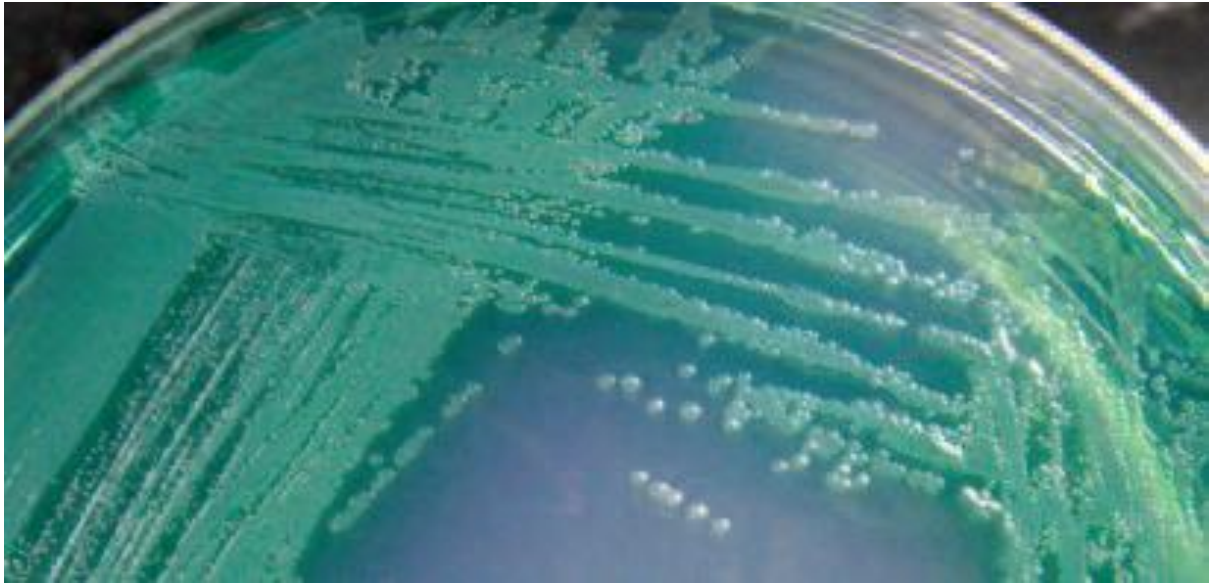
**Résistance par mutation :** Des mutations dans les gènes bactériens impliqués dans les sites de liaison des aminoglycosides aux cibles, tels que l'ARN ribosomal ou les protéines, peuvent diminuer l'affinité des aminoglycosides pour leurs cibles. Cette altération peut entraîner une diminution de la sensibilité d'*E. coli* aux aminoglycosides (Garneau et Labby, 2016).

Le développement de la résistance aux aminosides chez *E. coli* implique souvent une combinaison de ces mécanismes. En outre, l'émergence et la propagation de souches résistantes peuvent se produire par transfert horizontal de gènes, lorsque le matériel génétique porteur de caractéristiques de résistance est transmis entre bactéries, contribuant ainsi à l'amplification et à la dissémination de la résistance (Krause *et al.*, 2016).

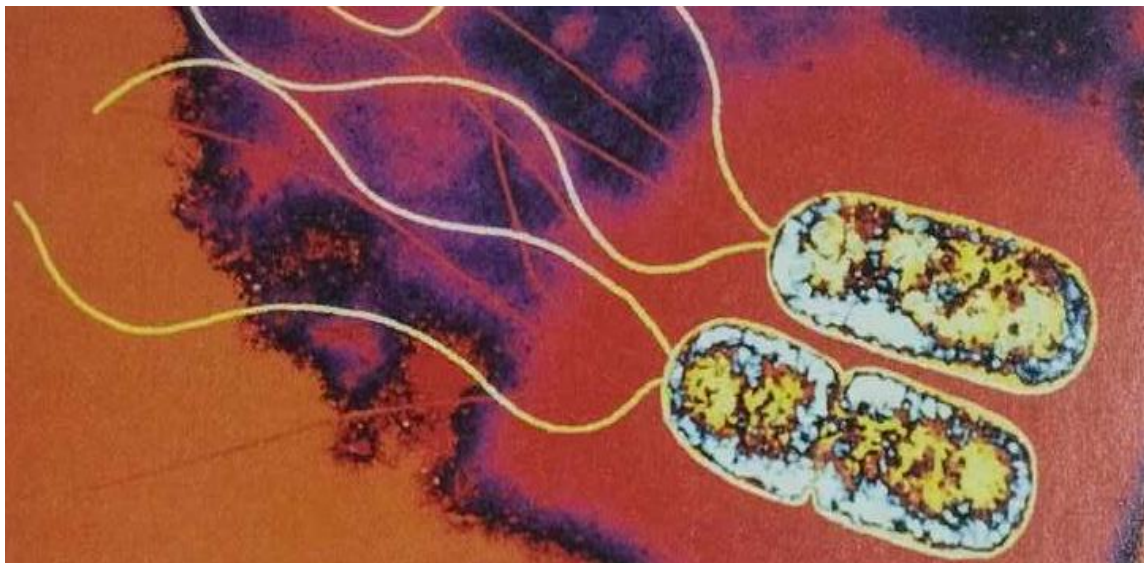
### 4. *Pseudomonas aeruginosa*

#### 4.1 Définition

C'est l'espèce type du genre *Pseudomonas* (figure 06-08). Ce sont des bacilles à Gram négatifs, aérobies strictes, oxydase positifs, mobiles, produisant souvent des pigments diffusibles colorés en bleu (pyocyanine). L'existence de nombreux plasmides gouvernant les caractères phénotypiques les plus variés : résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques, modification du taux de croissance, acquisition d'activités cataboliques sur certains substrats (Nauciel et Vildé, 2005).



**Figure 06** : Souche de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencé sur milieu sélectif Cétrimide caractérisé par son pigment bleu-vert pyocyanine (Leboffe et Pierce, 2021)



**Figure 07** : *Pseudomonas aeruginosa* sous microscope électronique a balayage (Madigan *et al.*, 2018)

### 4.2 Habitat

Le bacille pyocyanique est un germe présent dans l'environnement ; on le trouve dans les milieux humides. À l'hôpital, ce germe est réparti dans le même type d'environnement (robinets, douches, surface des thermomètres buccaux, humidificateurs, ... etc.).

En outre, ce germe peut vivre en commensale de l'Homme et de l'animal au niveau du tube digestif (Nauciel et Vildé, 2005).

### 4.3 Pouvoir pathogène

*P.aeruginosa* est un germe typique des infections nosocomiales. Il exprime son potentiel pathogène chez les personnes immunodéprimés. C'est donc une bactérie pathogène « opportuniste ». Des circonstances cliniques favorisantes conditionnent les types d'infections : Mucoviscidose (infection pulmonaire), brûlure (septicémie), cancer et leucémie (pneumonie, septicémie) diabète (otite), drogue (endocardite, ostéomyélite), trachéotomie (pneumonie), période néonatale (diarrhée), cathéter veineux (thrombophlébite), neurochirurgie (méningite), sonde urinaire et exploration instrumentales (infection urinaires) (Nauciel et Vildé, 2005).

### 4.4 Substances élaborées

Outres les pigments, nombreuses sont les substances élaborées capables de diffuser dans le milieu environnant. Celles qui participent au développement de ces infections sont surtout :

- Une hémolysine, relativement peu toxique.
- Des enzymes extracellulaires (protéases, phospholipase), qui vont faciliter la multiplication des bactéries dans les tissus.
- De rares souches produisent une entérotoxine.
- D'autres produisent des bactériocines (pyocines).
- Une exotoxine A (protéique) : c'est le facteur de pathogénicité le plus important, il diffuse dans tous les organes. Cette toxine présente un mécanisme d'action identique à celui de la toxine diphtérique (arrêt des synthèses protéiques de la cellule hôte).

Par ailleurs, le germe est parfois entouré d'une pseudocapsule polysaccharidique « Slime » qui joue un rôle important dans la pathogénicité de la bactérie ; elle possède des propriétés anti-phagocytaires et empêche l'opsonisation. L'hyperviscosité du « Slime » entrave l'action des cils chargés normalement de l'élimination des bactéries de l'arbre respiratoire (Wu *et al.*, 2015 ; Molinari *et al.*, 1993).

### 4.5 Résistance aux antibiotiques

Les *P. aeruginosa* résistante aux antibiotiques (AR) est fortement associée aux infections nosocomiales, qui sont un problème mondial, qui constituent une de santé à l'échelle mondiale en raison du développement croissant de souches MDR (c'est-à-dire résistantes à au moins trois antibiotiques).

Différents défis *P. aeruginosa* MDR pose de nombreux défis thérapeutiques en raison de stratégies de traitement efficaces. La littérature actuelle associe fortement un traitement empirique inadéquat à des taux accrus de mortalité et de morbidité (Aloush *et al.*, 2006 ; Schechner *et al.*, 2001).

*P.aeruginosa* est intrinsèquement résistante à divers antibiotiques en raison d'une faible perméabilité de la membrane externe, qui agit comme une barrière sélective (Bredenstein *et al* 2011 ; Lambert, 2002).

Cependant, cette bactérie est un pathogène très diversifié, capable de s'adapter au milieu environnant. Lorsqu'elle est soumise à la pression sélective d'un antibiotique, la réponse induite

facilite l'adaptation au milieu environnant, la survie de la bactérie et développe une résistance aux antibiotiques (Lambert, 2002).

L'émergence de la résistance aux antibiotiques a été signalée au cours de la colonisation de l'hôte des patients atteints de fibrose kystique, où les souches de *P. aeruginosa* développent et acquièrent une résistance au cours d'une du traitement antimicrobien (Carmeli *et al.*, 1999).

Des études menées par Messadi et ses collègues ont rapporté une forte corrélation entre l'utilisation accrue de ciprofloxacine et la prévalence accrue des souches résistantes à la ciprofloxacine (Messadi *et al.*, 2008). Par conséquent, un autre facteur associé à l'augmentation de la MDR-*P. aeruginosa* est due à l'utilisation fréquente d'agents antimicrobiens.

En outre, ces bactéries utilisent différents mécanismes pour résister aux antibiotiques, bien que la présence d'un mécanisme ne justifie pas toujours toujours la source de la résistance (Aloush *et al.*, 2006 ; Carmeli *et al.*, 1999).

Par conséquent, de nombreux chercheurs ont suggéré qu'une variété de mécanismes sont impliqués, y compris la production d'enzymes inactivantes, la modification du site cible, l'utilisation de pompes d'efflux et des mutations chromosomiques (Allen *et al.*, 2010).

L'une des particularités de *P. aeruginosa* est de pouvoir associer de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques ( $\beta$ -lactamases, imperméabilité, surexpression d'efflux) avec des supports génétiques très variés (plasmides, intégrons, transposons).

*P.aeruginosa* est naturellement résistante aux aminopénicillines à l'association amoxicilline-acide clavulanique ; elle produit naturellement une céphalosporinase, synthétisée à un niveau relativement faible, mais participe fortement à la résistance naturelle de cette espèce aux céphalosporines de première et de deuxième génération et à certaines céphalosporine de troisième génération (Islam, 2008).

*P. aeruginosa* exprime naturellement plusieurs systèmes d'efflux de la famille RND (Resistance Nodulation cell Division) qui sont constitués de trois protéines s'insérant dans la membrane cytoplasmique et externe et qui, à la manière d'une pompe, expulsent des antibiotiques dans le milieu extérieur en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique, l'expression de ces pompes à efflux explique en grande partie la résistance naturelle élevée de *P.aeruginosa* à de nombreux antibiotiques (Phan, 2008; Tenover, 2006; Molinari *et al.*, 1993).



**Figure 08 :** *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique à transmission  
(Prescott, 2018)

### 5. *Staphylococcus aureus*

#### 5.1 Définition

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, regroupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative (figure 09). Les staphylocoques sont des anaérobies facultatifs, à l'exception des espèces anaérobies *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Bien que les staphylocoques soient généralement catalase positive, de rares souches à catalase négative ont été rapportées (Över, Tüç, et Söyletir, 2000; Noble, 1993).

Parmi les 27 espèces du genre, les principales sont : *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. L'espèce *S. aureus* sera prise comme type de description résistant à de nombreux agents chimiques ou physiques, ce qui ne facilite pas leur éradication (Brahim et Chouiref, 2016).

Ils présentent un métabolisme typiquement respiratoire et fermentaire. De plus, une caractéristique commune à toutes les espèces de staphylocoques est qu'elles sont sensibles à la lysostaphine, à de rares exceptions près (Becker *et al.*, 2015; Savini *et al.*, 2009).

Le pourcentage de G/C dans l'ADN chromosomique des espèces de staphylocoques est d'environ 30 à 40 %. Les staphylocoques à coagulase positive (CoPS) représentent les principales espèces pathogènes du genre et possèdent la coagulase, une enzyme capable de coaguler le sang du lapin en convertissant le fibrinogène en fibrine.

À l'inverse, les staphylocoques dépourvus de coagulase sont classés comme staphylocoques à coagulase négative (CoNS) et sont des agents pathogènes relativement mineurs qui provoquent généralement des infections opportunistes chez des hôtes fragilisés.

Les staphylocoques, y compris *S. aureus*, sont généralement des agents pathogènes opportunistes ou commensaux résidant sur la peau et les muqueuses de l'hôte chez les animaux et les humains.

Les staphylocoques provenant de sites de portage peuvent se propager et être transmis dans l'environnement où ils sont capables de survivre pendant une longue période (Neely et Maley 2000; Wagenvoort *et al.*, 2000).

Les staphylocoques qui sont des commensaux peuvent devenir des agents pathogènes s'ils parviennent à pénétrer dans l'hôte par plusieurs mécanismes, tels que les traumatismes cutanés,

l'inoculation, l'implantation de dispositifs, chez les patients immunodéprimés et chez tous ceux qui présentent un microbiote altéré ( Kloos et Bannerman, 1994; Kloos et Schleifer, 1986).

Chez l'homme, plus de 80 % des maladies à *S.aureus* contractées à l'hôpital sont des infections endogènes causées par des souches présentes dans le nez des patients (Von Eiff et al., 2001) .

Dans l'ensemble, une identification précise et fiable des espèces de tous les staphylocoques est indispensable pour permettre une détermination détaillée des relations hôte-pathogène des relations hôte-pathogène (Gribaldo *et al.*, 1997; Kleeman *et al.*, 1993).



**Figure 09 :** *S.aureus* sous Microscope électronique a Balayage (MEB) (Madigan et al., 2018)

### 5.2 Historique

Observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, les staphylocoques doivent leur nom à OGSTON (1881) qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques.

*S.aureus* est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, ce germe peut survivre longtemps dans l'environnement (Adimi, 2018).

### 5.3 Habitat

Les staphylocoques sont largement répandus dans la nature à l'état commensal (sol, eaux, air) sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux. *S.aureus* et *S. epidermidis*,

appartiennent à la flore normale de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Cependant ces souches peuvent être à l'origine d'autoinfections ou contaminer d'autres individus. *S. aureus* est une espèce dotée d'une forte capacité de survie dans un environnement défavorable ou même hostile. Les staphylocoques peuvent être trouvés particulièrement dans les fosses nasales antérieures. Peuvent être isoler de la peau (*S. epidermidis*) et surtout des zones chaudes et humides de celle-ci (Camille, 2014; Nauciel et Vildé, 2005)

### 5.4 Caractères généraux

Germe pyogène par excellence, *S.aureus* est le microbe de la suppuration. Certaines souches agissent aussi par libération d'une ou de plusieurs toxines (intoxication alimentaire, syndrome de choc toxique, impetigo). La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques dépendent de trois principaux facteurs :

1. Le caractère ubiquitaire du germe.
2. L'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves, etc.
3. La fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque, notamment du staphylocoque hospitalier.

### 5.5 Pouvoir pathogène

Les espèces des staphylocoques sont essentiellement caractérisées par des lésions suppuratives et nécrotiques, elles s'accompagnent de lésions veineuses caractérisées par une thrombose septique (Sahki, 2021).

Isolement de staphylocoques pathogènes à partir du lait de mammite et sa sensibilité vis-à-vis d'une huile essentielle.

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés :

- **Les infections cutanées, sous cutanées et muqueuses** : Furoncle, anthrax, panaris, abcès peuvent évoluer de façon isolée ou entraîner des septicémies.
- **Les infections de la sphère ORL** : Sinusites, otites, abcès, amygdales, mastoïdites.
- **Les intoxications alimentaires** : Elles sont dues à l'ingestion d'entérotoxines

préformées dans l'aliment, résistantes aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissement, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre.

- **Les entérocolites aiguës** : Elles surviennent chez un malade ayant reçu, pendant une période prolongée, un antibiotique à large spectre, mal absorbé par la muqueuse intestinale. La flore intestinale normale a été détruite et remplacée par une *S. aureus* résistante aux antibiotiques et sécrétrice d'entérotoxines (dysmicrobisme) (Denis, 2007).
- **Les septicémies** : souvent secondaires des formes précédentes, elles sont fréquentes et redoutables surtout chez les sujets ayant une résistance diminuée et chez les nourrissons. Elles peuvent être suraiguës, mortelles en quelques heures, ou aiguës caractérisées par de nombreuses métastases suppurées (septico- pyohémies) (Denis, 2007).

En général, le SARM présente une résistance à un certain nombre d'antibiotiques, notamment les pencillines, les céphalosporines, le chloramphénicol, la tétracycline, les fluoroquinolones et autres (Zinner, 2007).

La vancomycine est maintenant, par nécessité, le médicament de choix pour les infections au SARM bien que, depuis 1997, les bactéries développent une résistance à cet antibiotique (Hiramatsu *et al.*, 2001).

En outre, de nombreux *S.aureus* résistants à la vancomycine (VRSA) sont isolés dans les établissements médicaux du monde entier (Tiwari et Sen, 2006; Hiramatsu *et al.*, 2001).

### 5.6 Résistance des *S.aureus* aux antibiotiques

Le développement de la résistance aux antibiotiques chez *S.aureus* a été signalé pour la première fois au milieu des années 1940, lorsqu'une souche de *S.aureus* a développé une résistance contre la pénicilline par la production d'une enzyme d'hydrolyse appelée pénicillinase (Basset *et al.*, 2011).

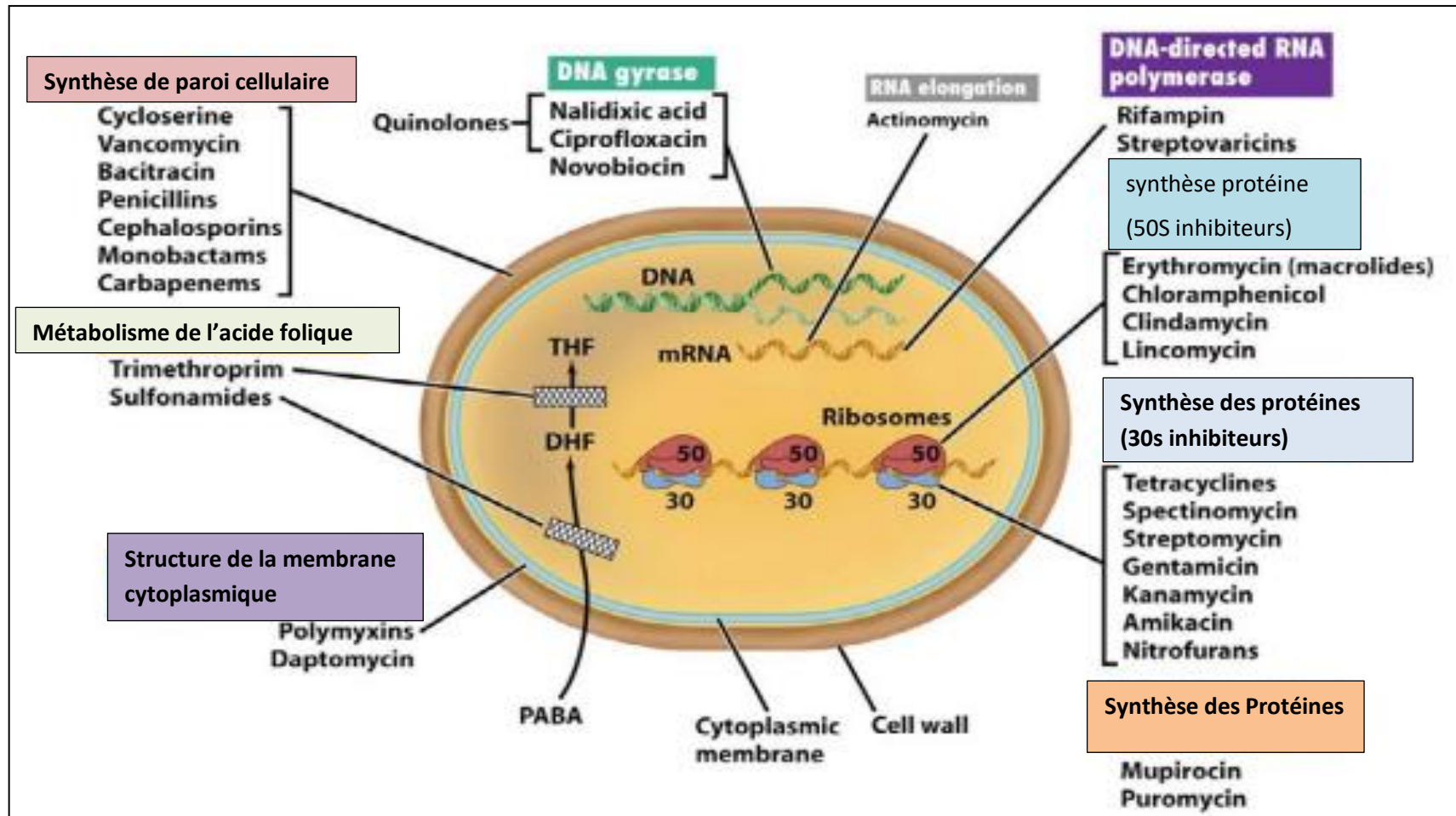
Depuis lors, les souches de *S. aureus* résistantes à la pénicilline ont été largement isolées dans des cas de bactériémie au Royaume-Uni et aux États-Unis. Dans un premier temps, ces souches résistantes n'ont été isolées que chez les patients et le personnel soignant où elles ont été décelées, d'où le nom de *S. aureus* résistant à la pénicilline associé à une infection nosocomiale (Lowy, 2003).

Cependant, les souches résistantes sans facteurs de risque identifiables associés à l'hôpital ont ensuite été isolées chez des individus de la communauté (Chuang et Huang, 2013). Cela a conduit à un scénario où une résistance accrue à la pénicilline a été observée entre la fin des années 1940 et le début des années 1960, lorsqu'un homologue semi-synthétique de la pénicilline a été mis au point appelé méthicilline a été introduit dans les cliniques comme médicament stratégique de choix pour le traitement des infections à *S. aureus*. Cependant, le développement de la résistance à la méthicilline chez *S. aureus* a été signalé moins d'un an après son introduction en tant que médicament stratégique de choix pour le traitement de l'infection à *S. aureus* (Jevons, 1961).

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est dû à l'acquisition d'un gène génomique de la bactérie. L'acquisition d'un îlot génomique porteur d'un déterminant de la résistance à la méthicilline, *mecA*. Depuis sa découverte au début des années 1960 au Royaume-Uni, les *S. aureus* résistants à la méthicilline ont gagné du terrain. Les *S. aureus* résistants à la méthicilline ont acquis une notoriété mondiale en tant que cause la plus fréquente d'infections humaines, communautaires et épidémiques cause la plus fréquente d'infections humaines, communautaires et animales dans le monde. Ainsi, conduisant à une réduction de la valeur thérapeutique de nombreux antibiotiques d'importance critique et la prolongation de la durée d'hospitalisation (Purrello *et al.*, 2014).

Au cours des dernières décennies, le SARM a évolué, ce qui pourrait probablement à l'expansion clonale de clones existants et à la conversion de *S. aureus* sensibles à la méthicilline (MSSA) en SARM. Il s'agit d'une conséquence de l'acquisition d'un déterminant de résistance à la méthicilline codant pour une protéine alternative de liaison à la pénicilline avec une sensibilité réduite ou moindre à toutes les classes d'antibiotiques bêta-lactamines classes d'antibiotiques bêta-lactames (Noto *et al.*, 2008).

Le staphylocoque doré offre un modèle meilleur et plus robuste pour comprendre la complexité de la résistance adaptative des bactéries face à la pression sélective des antibiotiques. Ces pathogènes ont manifesté une nouvelle capacité à répondre rapidement aux défis posés par les nouveaux antibiotiques par l'évolution de nouveaux mécanismes de résistance aux antimicrobiens. L'évolution de la résistance chez ces agents pathogènes en développent une résistance par l'altération du site cible du médicament, l'inactivation enzymatique de l'agent antimicrobien, la pompe d'efflux et la séquestration de l'agent antimicrobien (figure 10) (Bitrus *et al.*, 2018).



**Figure 10 :** Représentation schématique de la classe d'antibiotiques et du mécanisme de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Bitrus *et al.*, 2018).

D'autres mécanismes de résistance se sont développés par l'acquisition de déterminants de la résistance, la sélection de position et la résistance spontanée (Bitrus *et al.*, 2018; Pantosti *et al.*, 2007).

*Staphylococcus aureus* possède un génome central hautement clonal qui est classé en lignées caractérisées par des complexes clonaux. Les agents pathogènes sont également classés en fonction de leurs caractéristiques épidémiologiques en tant que *S. aureus* nosocomial, communautaire et associé au bétail. Outre le génome central, l'agent pathogène possède un élément génétique mobile très divergent et remarquablement variable. Plus de 15 % du génome de *S. aureus* est constitué d'éléments génétiques mobiles up (MGE) tels que les chromosomes cassettes staphylococciques (SCC), les bactériophages, les intégrons, les plasmides conjugatifs intégratifs, les transpositions et les modifications de l'ADN, ainsi que d'autres éléments génétiques mobile. plasmides conjugatifs, transposons et îlots de pathogénicité. Tous ces EGM, à l'exception des bactériophages, peuvent porter des gènes de résistance aux antimicrobiens. La majorité des isolats cliniques de *S. aureus* possèdent un plasmide dont la taille varie de 1 à 60 kb et qui est un gène de résistance aux antimicrobiens. Ces plasmides sont connus pour porter un nombre variable de gènes de résistance. La résistance à la tétracycline, au chloramphénicol et à l'érythromycine est portée par de petits plasmides, tandis que les grands plasmides portent des gènes de résistance multiple aux aminosides, aux bêta-lactamines et aux macrolides (Bitrus *et al.*, 2018).

PARTIE  
EXPERIMENTALE

### Matériel et méthodes

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée (LBMA), Département de Biochimie, Université Badji mokhtar Annaba (UBMA) ainsi qu'au niveau du Centre Techniques Apicoles de Moselle (Cetam-Lorraine) à Guénange en France.

#### I- Matériel

##### I.1. Matériel utilisé au laboratoire

L'ensemble des milieux de culture, réactifs et appareillage seront cités au fur et à mesure de leur utilisation.

##### I.2. Matériel biologique

###### I.2.1. Souches bactériennes utilisées

###### I.2.1.1 Souche de référence

Ces souches ont été gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie de l'institut Pasteur d'Alger. L'utilisation des souches de référence permet de vérifier la conformité des résultats de l'antibiogramme et de la recherche de l'activité antibactérienne. Les souches de référence utilisées sont les suivantes :

-*Escherichia coli* ATCC 25922

-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

-*Staphylococcus aureus* ATCC 29213

###### I.2.1.1 Souches cliniques

Cette étude a été réalisée sur un total de 78 souches bactériennes, dont 26 appartiennent à l'espèce *Staphylococcus aureus*, 26 à *Escherichia coli* et 26 à *Pseudomonas aeruginosa*. L'isolement des souches pathogènes a été effectué au laboratoire de microbiologie de l'établissement public d'El Hadjar, Annaba, durant la période de novembre 2016 jusqu'au mois d'octobre 2017. Les souches bactériennes ont été isolées à partir des prélèvements de pus des plaies infectées de grands brûlés, de pied diabétique et de plaies post opératoire et des infections urinaires(Annexe 12).

### I.2.2. Echantillons de miels

Cinq échantillons de miel naturel sont collectés à partir de différentes sources florales, provenant de différentes régions algériennes, dont le climat diffère d'une région à une autre (tableau 03, figure 15). Les échantillons de miel ont été récoltés auprès d'apiculteurs durant l'année 2019 dans des récipients en verre stériles hermétiques empaquetés au réfrigérateur à 4°C jusqu'aux analyses pour éviter une éventuelle altération chimique et/ou biologique. De plus, un échantillon de miel de référence qui provient de la nouvelle Zélande (Manuka IAA5+) a été testé dans les même condition (Figure 14).

**Tableau 03** : Origines géographiques et botaniques des échantillons de miel étudiés

Echantillon de miel	Région	Sites de collecte	Climat	Origine Géographique	Saison et année de récolte
Manuka	Nouvelle- Zélande	/	Subtropical humide	Champ	/
M1	Laghouat	Aflou	Aride	Champ	Printemps 2019
M2	Annaba	Berrahal	humide	Champ	Printemps 2019
M3	Djelfa	Guernini	semi-aride	Champ	Printemps 2019
M4	Algiers	Baba Ahcen	humide	Montagne	Printemps 2019
M5	El Bayadh	El Mehara	Semi-aride	Champ	Printemps 2019



**Figure 14** : Echantillons de miels testés

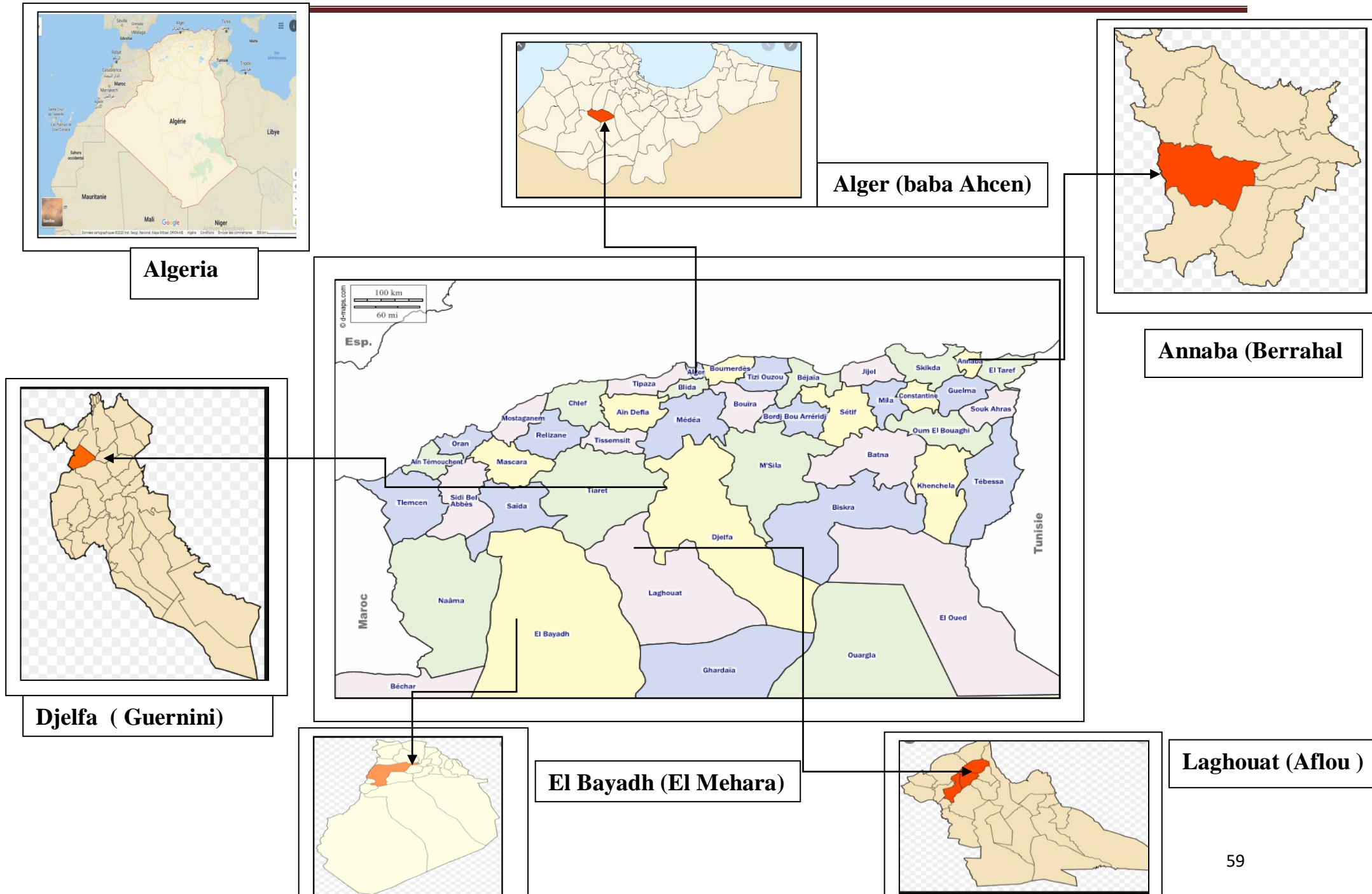


Figure 15 : Localisation géographique et sites de récolte des échantillons de miel en Algérie.

## II. Analyses des échantillons de miel

### II.1. Examen organoleptique

#### Principe

La méthode est basée sur l'évaluation des caractéristiques olfactives et gustatives du miel (figure 16) par des évaluateurs entraînés à identifier les stimuli sensoriels sur la base de normes préalablement mémorisées (ISO 8586-1,1993). Elle a été conçue en particulier pour vérifier l'absence de défauts et la conformité des profils sensoriels des miels unifloraux (Piana *et al.*, 2004).



**Figure 16** : Verres à pied ballon proposés pour l'évaluation sensorielle du miel

(Marcazzan *et al.*, 2018).

#### Méthode

Les tests organoleptiques sont des évaluations sensorielles basés sur les sens humains tels que la vue, l'odorat, le goût et parfois le toucher pour évaluer la structure (Piana *et al.*, 2004).

### II.2. Analyses Physico-chimiques

#### II.2.1 Teneur en eau

La teneur en eau est un paramètre de qualité, important avant tout pour la durée de conservation du miel, mais d'une importance mineure pour la caractérisation des miels unifloraux.

Pour déterminer la teneur en eau du miel la préparation de l'échantillon de miel a été soigneusement mélangée pour garantir une répartition homogène de l'humidité, étant donné que cette dernière peut varier au sein du même échantillon.

Suivi par la calibration du réfractomètre : Avant d'entreprendre les mesures, le réfractomètre a été calibré en utilisant de l'eau distillée, remplissage de la chambre de mesure : À l'aide d'une pipette stérile, une petite quantité du miel a été déposée dans la chambre de mesure du réfractomètre, en prenant soin d'éviter l'introduction de bulles d'air. La chambre de mesure a été fermée hermétiquement pour éviter les fuites.

Réalisation de la mesure : L'indice de réfraction (RI) a été lu à travers l'oculaire du réfractomètre, et cette valeur a été consignée.

Un réfractomètre Abbé thermostaté à 20°C a été utilisé. Le prétraitement a été fait dans un bain-marie à 50°C jusqu'à la dissolution des cristaux (Bogdanov, 1997).

Pour déterminer la teneur en eau, nous avons utilisé un réfractomètre Abbé-typ (RF 490, Euromex holland) à une température de 20°C (annexe 7), basé sur la méthode de réfractométrie (Bogdanov *et al.*, 2004; Bogdanov, 1997).

L'indice de réfraction (RI) est converti selon la table de Chataway, la teneur en eau (g/100g) est obtenu selon la méthode harmonisée des miels par la Commission Internationale du Miel (Bogdanov, 2002).

### **II.2.2 Détermination du pH**

Le pH-mètre (CRISON 2000) est étalonné à pH 3,0, 7,0 et 9,0 (annexe 7). L'échantillon de miel est dissous dans l'eau, le pH est mesuré et la solution est titrée avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M jusqu'à pH 8,30.

Dans un bécher, 10 g d'échantillon de miel sont dissout dans 75 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone. Remuer avec l'agitateur magnétique, plonger les électrodes du pH mètre dans la solution et enregistrer le pH. Titrer avec du NaOH 0,1M jusqu'à pH 8,30 (une lecture stable doit être obtenue dans les 120 secondes suivant le début du titrage). Enregistrez la lecture à 0,2ml près (burette de 10ml) (Bogdanov, 2009).

### II.2.3 Mesure de la conductivité électrique

La conductivité est un bon critère de l'origine botanique du miel et est donc très souvent utilisée dans le contrôle de routine du miel.

La méthode très simple, rapide et peu coûteuse. Nous avons utilisé un conductimètre modèle Knick selon la méthode de (Bogdanov 2002a).

La conductivité électrique est déterminée selon la méthode de Bogdanov et al (1997). C'est la mesure à 20 °C de la conductivité électrique d'une solution de miel à 20 % de matière sèche. Une masse de miel est pesée tel que  $M = (5 * 100) / MS$  (où MS est la teneur en matière sèche de miel).

La prise d'essai est dissoute dans 25 ml d'eau distillée de très faible conductivité électrique (1,43 µS/cm).

La cellule du conductimètre (Consort C931) est immergée dans la solution de miel et la conductivité est lue sur l'appareil (annexe 7).

Les résultats des valeurs de la Conductivité Electrique (solution de miel à 20%) sont exprimés en milliSiemens par centimètre (ms/cm) à 25 °C selon les mesures de référence internationales (Bogdanov *et al.*, 2004).

### II.2.4 Intensité de la couleur

La couleur du miel naturel va du jaune clair à l'ambre foncé, et même au noir (Diez *et al.*, 2004). Le miel est généralement commercialisé sur la base de l'échelle de couleurs Pfund (Bogdanov *et al.*, 2004). L'intensité de la couleur des échantillons de miel a été déterminée par la méthode de l'échelle de Pfund en utilisant un spectrophotomètre UV-visible Cary 50 à la longueur d'onde  $\lambda = 635$  nm (Fell, 1978).

La formule (1) a été utilisée pour calculer la valeur de Pfund

$$\text{Pfund [mm]} = -38,7 + 371,39 \times \text{Abs} \quad (1)$$

où Pfund = valeur de la couleur du miel dans l'échelle Pfund

Abs = absorbance à la longueur d'onde de 635 nm (Ratiu *et al.*, 2019).

Les résultats sont exprimés en millimètres (mm) de grades Pfund.

### II.2.5 Hydroxy Méthyl Furfural (HMF)

Pour garantir la pureté du miel, nous déterminons sa teneur en HMF ; il s'agit donc d'un paramètre crucial dans l'évaluation de la qualité de miel (Khalil *et al.*, 2012).

Pour mesurer la teneur en HMF nous avons utilisé la méthode de Winkler (1955) appelée aussi méthode spectrophotométrique basée sur l'absorption à 550 nm ; cette méthode comprend la mesure de l'absorbance UV des solutions de miel avec de l'acide barbiturique et de la *p*-toluidine (Bogdanov *et al.*, 1999). L'analyse a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Cary 50 et les résultats obtenus sont exprimés en mg/kg

La mise de la solution de miel a été effectuée dans deux tubes à essai de 2 ml (20 %) et 0.5 ml de solution de *p*-toluidine ; on ajoute 1ml d'eau distillée (référence) ; au second on ajoute 1ml de solution d'acide barbiturique 0.5% (échantillon) (Bogdanov 1997).

### II.3. Analyse qualitative de la méliissopalynologie

L'analyse microscopique fournit des informations sur l'origine botanique et géographique du miel et permet d'évaluer la teneur en levures (fermentation). Elle permet également de détecter la présence de contaminants du miel (poussière, suie, etc.) et d'autres particules microscopiques qui ne sont pas censées être présentes dans le miel.

La méthode utilisée a été mise au point par la commission internationale de botanique apicole et décrite par Louveaux *et al.*(1978), et Werner von Der Ohe *et al.*(2004).10 g de miel sont dissous dans 20 mL d'eau chaude (inférieure à 40°C), puis centrifugés pendant 5 min. 10 mL d'eau distillée sont ajoutés au culot résultant de la centrifugation pendant 10 min à 3 000 rpm, transféré sur une lame de microscope, séché et identifié. Les grains de pollen ont été identifiés à partir des bases de données numériques et bibliographiques du laboratoire d'analyse et d'écologie apicole du centre (Cetam). Les préparations ont été examinées à différents grossissements ( $\times 100$ ,  $\times 400$  et  $\times 1000$ ).

Les pollens provenant de plantes anémophiles ou de plantes non nectarifères ont été soustraits du nombre total de pollens avant de calculer les pourcentages provenant de plantes nectarifères. Les pourcentages du pollen obtenu sont ceux des plantes nectarifères uniquement. Si le taux de pollen dominant du miel provient d'une seule

espèce de fleur (supérieur ou égal à 45%), alors le miel est monofloral (Benaziza-Bouchema et Schweitzer 2010).

### **II. 4. Détermination de la composition en glucide par HPAEC-PAD**

Cet analyse joue un rôle majeur dans les enquêtes alimentaires sur la composition, la falsification, l'estimation des valeurs nutritionnelles, l'identification, les études de contrôle de l'origine, etc (Geană *et al.*, 2020; Corradini *et al.*, 2012).

Les différentes techniques analytiques peuvent être appliquées pour préciser la concentration des sucres dans le miel, comme la chromatographie sur papier (Corradini *et al.*, 2012; Rao et Beri, 1951), la chromatographie en phase gazeuse (Low et South, 1995). Parmi toutes les chromatographies liquides à haute performance (HPLC) couplées à différents systèmes de détection, comme la chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) par sa rapidité d'analyse, son automatisation simple, les échantillons sont injectés directement (sans ou avec un prétraitement mineur) (Hanko et Rohrer, 2000). Elle a une haute résolution ; toutes les classes de mono-, oligo-, polysaccharides etc. qui peuvent être séparées selon des caractéristiques structurales (taille, composition...etc.) en font un outil analytique puissant dans la séparation des glucides. La chromatographie d'échange d'anions haute performance est couplée à un détecteur ampérométrique pulsé pour surmonter l'insensibilité. Elle offre un moyen sensible et sélectif d'identifier les sucres simples et complexes dans le miel (Corradini *et al* 2012).

Environ 95% du poids sec du miel est composé d'hydrates de carbone (Boukraâ, 2013), Afin d'identifier le profil de sucre de chaque échantillon, la méthode HPAE-PAD décrite et validée par la commission internationale du miel a été utilisée selon les méthodes harmonisées de la commission européenne du miel (Bogdanov, 2009). Les sucres agissent comme des acides faibles à pH élevé (12-14) et sont totalement ou partiellement ionisés (Rohrer, 2013; Bogdanov, 1997).

Pour préparer la solution d'élution B et les échantillons de miel pour l'analyse HPAEC-PAD ; 200 mg de chaque échantillon de miel ont été pesés et dissous dans un bécher de 25 mL avec quelques millilitres d'eau hautement purifiée (HPW) puis transférés dans

une fiole jaugée de 100 mL et complétés avec de l'eau jusqu'à 100 mL. Très bien mélanger, 1 mL de cette solution de miel est pipeté dans une seringue Luer.

Après avoir inséré un filtre de 0,02  $\mu\text{m}$  et injecté dans la boucle du chromatographe avec les mêmes conditions que pour la solution standard, le matériel et les conditions sont les suivants :

- Système Dionex GP50 (USA) (figure 17) incorporant une colonne Carbopac PA1 (4 $\times$ 250), une colonne de garde PA1 (4 $\times$ 50) et une détection amérométrique pulsée (Weston et Brocklebank 1999).

- La composition du gradient d'éluion contient deux phases mobiles :

- Phase A de l'eau hautement purifiée (HPW).

- Phase B solution du NaOH 0.2 M

- Le débit a été ajusté à 0.5mL/min, 0.1mL/min, 1mL/min pendant 16min, 5min et encore 16min respectivement.

- Conditions de détection : l'électrode de travail est maintenue aux potentiels et durées suivants :

- a) Potentiel d'oxydation  $E1 = +0,2\text{V}$   $t1 = 500\text{ms}$

- b) Potentiel de nettoyage  $E2 = +0,7\text{V}$   $t2 = 100\text{ms}$

- c) Potentiel de réduction (désorption des produits oxydés)  $E3 = -0,9\text{V}$   $t3 = 100\text{ms}$

- Le temps de séparation : 40min

La cristallisation du miel est généralement indiquée par le rapport Fructose /Glucose (F/G). Lorsque ce rapport est élevé, le miel conserve sa texture liquide (Schweitzer, 2001).

Outre les principaux monosaccharides que sont le glucose et le fructose, les disaccharides tels que le saccharose, le maltose, le turanose et l'isomaltose ont également été quantifiés par HPAEC-PAD.



**Figure 17** : Système Dionex GP50 (USA) HPAEC-PAD

### **II.5. Détermination de la teneur en polyphénols totaux**

La détermination de la teneur en polyphénols totaux du miel a été effectuée selon la méthode Folin-Ciocalteu (Beretta *et al.*, 2005). Chaque échantillon de miel (1 g) a été dissous dans 5 mL de méthanol. Cette solution a été mélangée avec 2,4 mL d'eau distillée et 200  $\mu$ L de réactifs de Folin-Ciocalteu pendant 3 min, puis 0,6 mL de sodium (20%,  $\text{Na}_2\text{CO}_2$ ) ont été ajoutés (20%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Après incubation du mélange réactionnel dans l'obscurité à 25°C pendant 2 h, la densité optique a été mesurée à 725 nm. Une ligne d'étalonnage a été réalisée à partir d'étalons d'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique/100 g de miel (mg GAE/100 g).

### **II.6. Détermination des flavonoïdes totaux**

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite précédemment par Meda *et al.* 2005. En bref, une solution de 1 mL de miel (1 mg/mL dans du méthanol) est mélangée avec 1 mL d' $\text{AlCl}_3$  (2%). Après 40 minutes d'incubation à température ambiante ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), on mesure la densité optique est mesurée à 430 nm. Les concentrations de flavonoïdes ont été déduites de la courbe d'étalonnage établie avec une solution standard de quercétine (20, 40, 60, 80, et 100 mg/l). Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents de quercétine par g de miel (mgQE/g de miel) (Meda *et al.*, 2005).

## II.7. Méthode d'évaluation de l'activité glucose oxydase (GOx)

Cette méthode est basée sur la formation de couleur par un chromogène oxydé (o-dianisidine) en présence de peroxyde d'hydrogène et de peroxydase (Flanjak *et al.*, 2016; Burgett, 1974).

La glucose oxydase catalyse l'oxydation du D-glucose en D-glucono- $\delta$ -lactone et le convertit finalement en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène (Figure 18).

Le peroxyde d'hydrogène est réduit en eau par la peroxydase, qui utilise l'o-dianisidine comme co-substrat.

À 400 nm, l'absorption maximale du produit coloré formé a été observée par spectrophotométrie. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  comme étalon (10-100  $\mu\text{mol/L}$ ) avec de la peroxydase et de l'o-dianisidine a été utilisé pour la détermination quantitative.

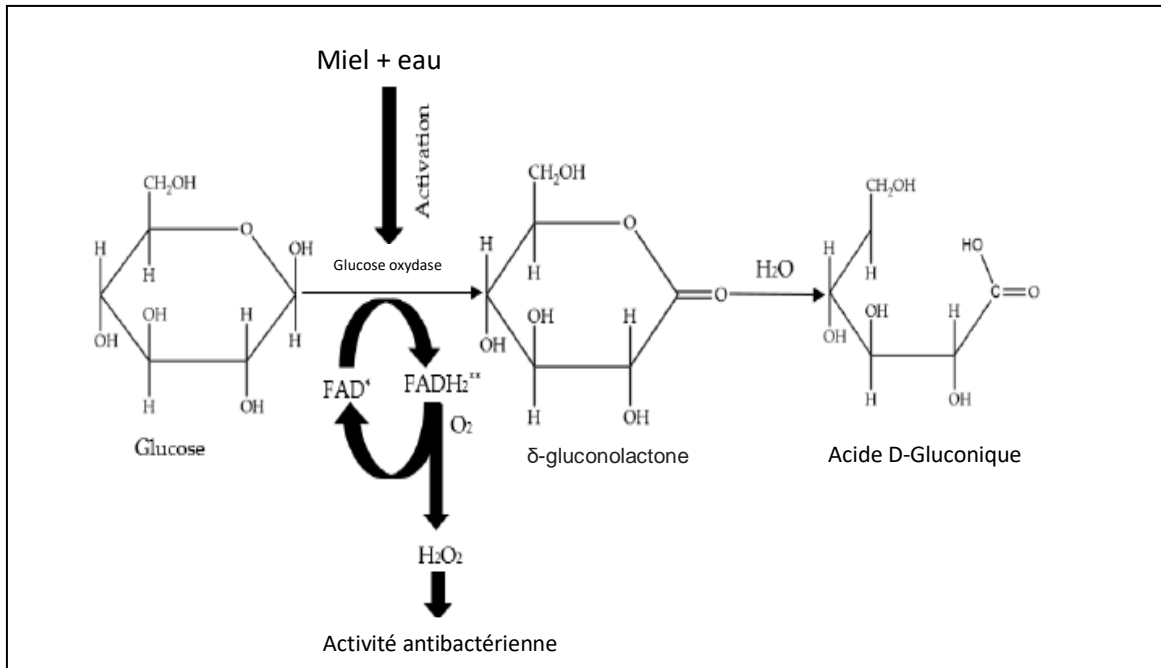
Le mélange réactionnel préparé est composé de :

- 0,7 ml de glucose (2,14 mM, dissous dans un tampon de phosphate de sodium 100 mM, pH 6,1),
- 0,1 ml de solution éthanolique d'o-dianisidine (1mg/ml),
- 1 ml de peroxydase de raifort et 0,1 ml de solution de miel (0,2 g/mL), préparée dans un tampon phosphate de sodium 100mM de phosphate de sodium, pH 6,1.

Le mélange réactionnel a été incubé après l'ajout de la solution de miel pendant 30 minutes à 37°C et terminé par l'ajout de 0,1 mL d'acide chlorhydrique 1 M.

### Lecture

L'absorbance a été mesurée et ensuite corrigée par rapport à l'absorbance du mélange réactionnel de zéro minute. Les activités enzymatiques ont été déterminées pour l'ensemble des échantillons de miel dilués préparés par filtration avec l'eau du robinet (20°C) pendant 24 heures. Les résultats ont été exprimés en  $\mu\text{g H}_2\text{O}_2 / \text{h g}$  de miel (Sahin *et al.*, 2020).



**Figure 18 :** Génération de peroxyde d'hydrogène par la réaction catalysée de la glucose oxydase.

### III. Isolement et identification des souches bactériennes

Les souches bactériennes ont été isolées à partir des plaies infectées (brûlures, pied diabétique et plaies post-chirurgicales) et les infections urinaires. Les bactéries pathogènes ont été identifiées par des méthodes microbiologiques conventionnelles (coloration de Gram, test à l'oxydase et test à la catalase), et confirmées par l'indice de profil analytique API 20E, API 20NE et API-STAPH (annexe 11) (Bio-Mérieux, France). La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture des API (Annexe 2, 3, 4) et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

Le protocole général d'isolement et d'identification des souches cliniques selon le type de prélèvement ainsi que la vérification de la pureté des souches et l'examen macroscopique et microscopique des colonies sont représentés dans les figures 19-20.

D'après leur profil de résistance aux antibiotiques, seules les souches bactériennes présentant une multirésistance aux antibiotiques ont été sélectionnées. Les antibiotiques testés sont ceux couramment utilisés pour le traitement des infections causées par *E.coli*, *P.aeruginosa* et *S. aureus* (annexe 11).

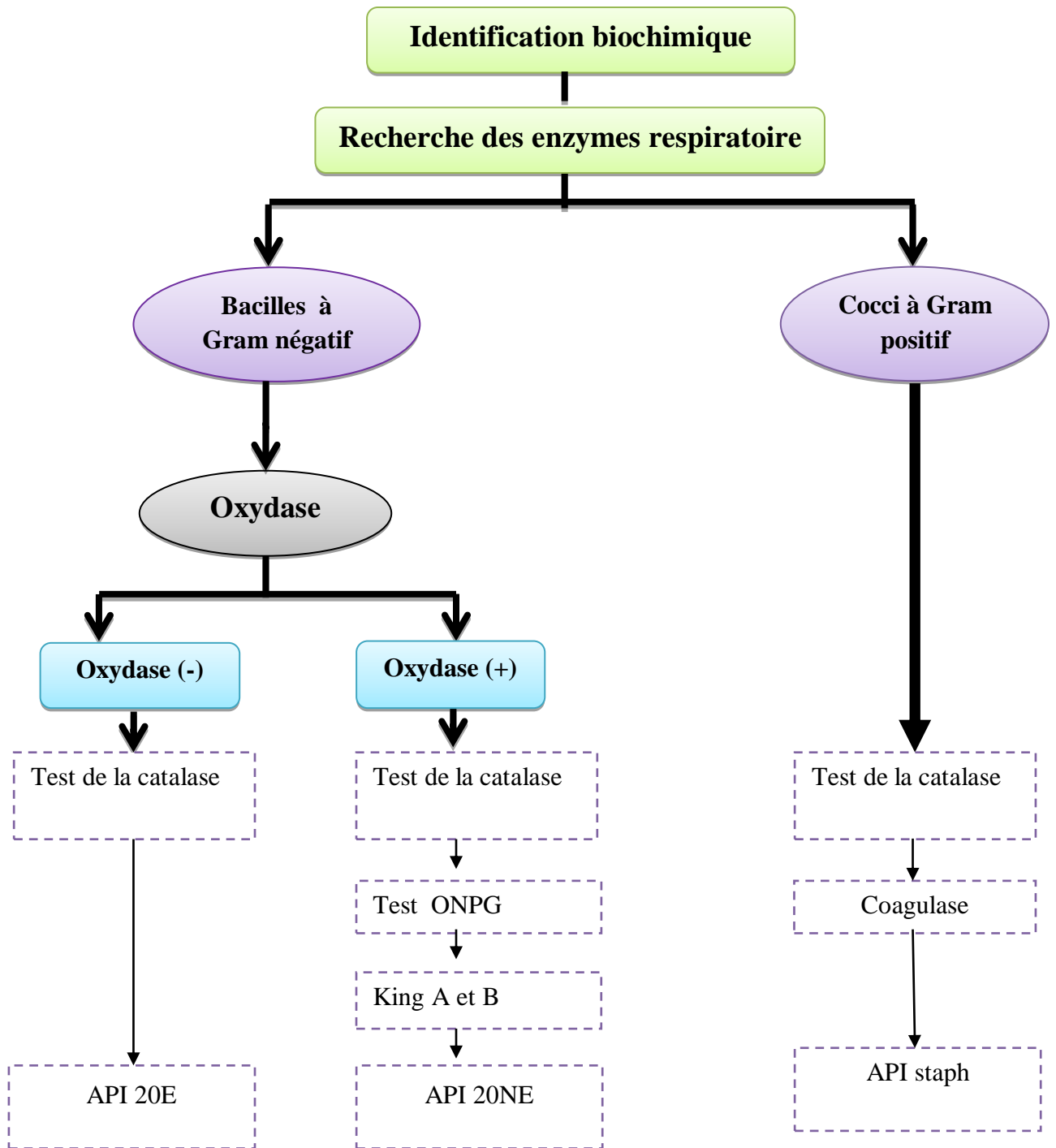


Figure 19 : Protocole d'identification biochimique des souches *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*

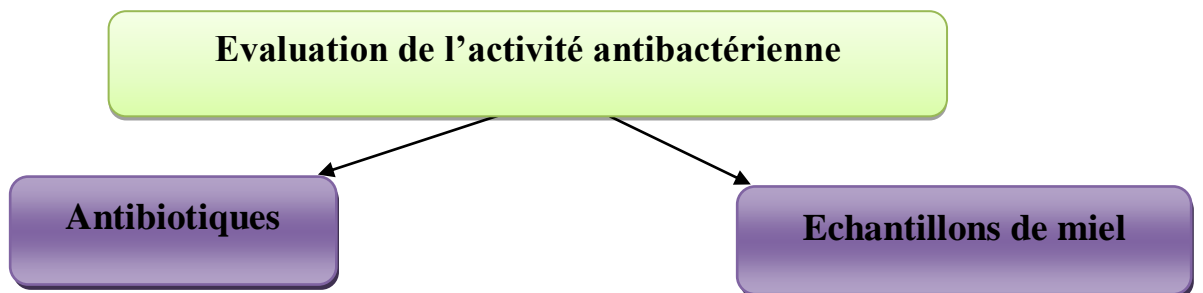


Figure 20 : Evaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*

### IV. Etude de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide des disques imprégnés des antibiotiques à tester. Cette méthode permet de déterminer le comportement des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques.

Le Choix des antibiotiques utilisés s'effectue selon les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), le choix des antibiotiques testés sur les différentes espèces bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part, sur le spectre d'activité de chaque antibiotique (Albaridi, 2019; Hoseinzadeh *et al.*, 2017; CLSI, 2017). Les antibiotiques utilisés dans cette étude sont regroupés dans l'annexe 5.

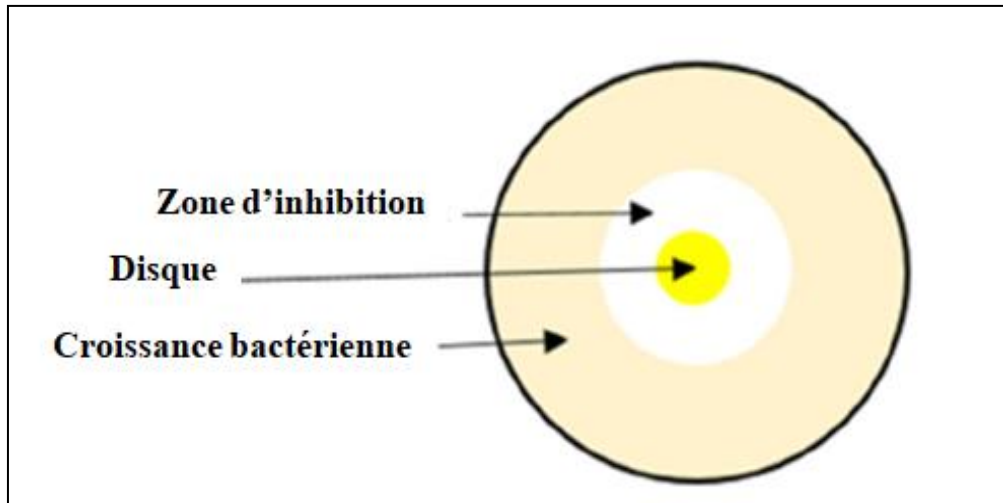
#### IV.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé

##### Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, préparer une suspension bactérienne dans l'eau physiologique stérile (0,9 %), de façon à obtenir un inoculum de  $10^6$  à  $10^8$  UFC/ml, l'opacité doit être équivalente à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

##### Méthode

Les boîtes de gélose Mueller Hinton sontensemencées par écouvillonnage et les disques d'antibiotiques y sont déposés sur la gélose (figure 27). Les boîtes sont ensuite, incubées pendant 18 à 24 h à 37°C.



**Figure 27 :** Représentation schématique de la méthode de diffusion sur disque.

### Lecture

Pour chaque souche, et pour chaque antibiotique:

- Mesurer en millimètre les diamètres d'inhibition ;
- Reporter cette mesure sur l'échelle de concordance correspondante
- Les résultats de l'antibiogramme indiquent alors si la bactérie est sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique (Bogdanov, 2002c).

### IV.2 Détection de *S.aureus* méthicillino-résistant:

Il existe plusieurs méthodes de détection de la résistance à la méthicilline pour l'espèce *Staphylococcus aureus*, parmi lesquelles on a choisis la méthode de diffusion du disque d'oxacilline.

#### IV.2.1 Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline (1ug)

##### Principe

Un disque d'Oxacilline (1ug) a été appliqué sur une Gélose MH additionnée 2% de NaCl pour la détection des SARM selon les directives de CLSI (the Clinical Laboratory Standards Institute).

##### Lecture

Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, les souches sont considérées résistantes pour diamètre d'inhibition  $\leq 10$  mm, intermédiaires pour 11-12 mm

et sensibles pour diamètres  $\geq 13$ mm (Rasheed et Ahmed, 2010).

### **Conservation des souches**

La conservation des souches sélectionnées a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

## **V. Evaluation des effets thérapeutiques des échantillons de miel**

### **V.1. Evaluation de l'activité antibactérienne**

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des échantillons de miel ont été inspirées à partir de celles décrites par les recommandations du CLSI de 2017 (Clinical & Laboratory Standards Institute) destinées pour les antibiotiques classiques (CLSI, 2017).

L'activité antibactérienne des échantillons de miel a été évaluée dans six dilutions (80%, 40%, 20%, 10%, 5% et 2,5%). Tandis que l'évaluation de la sensibilité bactérienne au miel a été mesurée par plusieurs méthodes : méthode de diffusion, détermination de la méthode de la concentration minimale d'inhibition (CMI), et méthode de la concentration bactéricide minimale (CMB).

#### **V.1.1. Méthode de diffusion en puits**

##### **Principe**

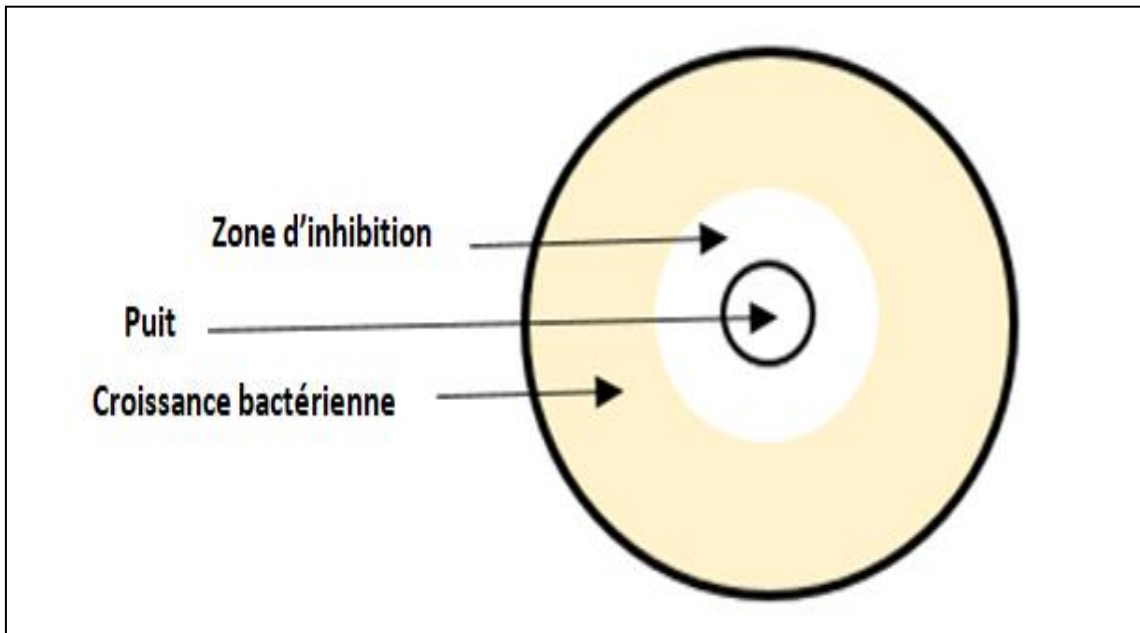
L'essai de diffusion en milieu gélosé est largement utilisé pour évaluer l'activité antimicrobienne des produits naturels. Ce test est basé sur la mesure de la taille d'une zone d'inhibition de la croissance autour de l'échantillon, qui peut être placé dans un puits de gélose, zone d'inhibition de la croissance autour de l'échantillon, qui peut être placé sur un disque de papier ou dans un puits découpé dans la gélose dans l'agar (Valgas *et al.*, 2007; Magaldi *et al.*, 2004).

##### **Méthode**

Le milieu de croissance : La gélose Mueller Hinton (M.H.) est ensemencée à l'aide d'un écouvillon imbibé de suspension bactérienne, ajustée à une turbidité de 0,5 Mc Farland. Des puits de 6 mm de diamètre sont perforés sur une plaque de gélose M.H.. Au centre de chaque puits, 100  $\mu$ l de dilutions de la solution de miel sont inoculés (chaque puits

correspond à une concentration des dilutions). Enfin, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant la nuit. Pendant l'incubation, le miel diffuse dans la gélose créant une zone claire autour du puits, appelée zone d'inhibition de la croissance bactérienne.

Il en résulte une zone d'inhibition de la croissance mesurable (figure 28)



**Figure 28** : Représentation schématique de la méthode de diffusion du miel sur agar.

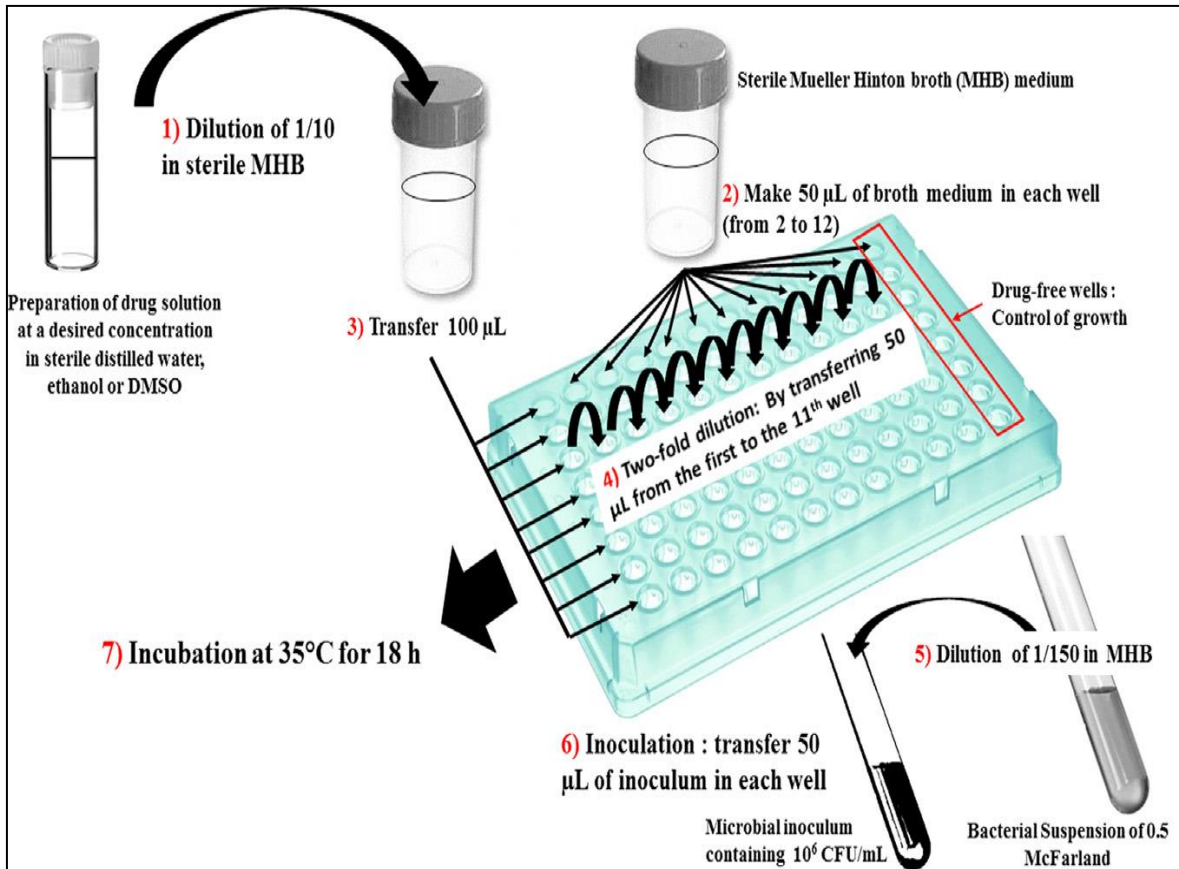
### Lecture

Le diamètre des résultats de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne est exprimé en millimètres (mm) ; la taille de la zone d'inhibition est mesurée pour identifier le pouvoir antibactérien du miel testé (Albaridi, 2019; Hoseinzadeh *et al.*, 2017).

### V.1.2 Méthode de dilution en milieu liquide (bouillon)

La méthode de micro ou macro-dilution en bouillon sont l'une des méthodes les plus fondamentales et les plus importantes pour tester la sensibilité aux antimicrobiens des produits naturels, y compris le miel, contre les bactéries anaérobies et aérobies (CLSI, 2017).

Cette dernière permet une étude quantitative à la fois des bactéries anaérobies et des bactéries aérobies de l'activité bactériostatique et bactéricide (figure 29).



**Figure 29 :** Microdilution en bouillon pour les tests antibactériens, conformément au protocole du CLSI.

### V.1.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

#### Principe

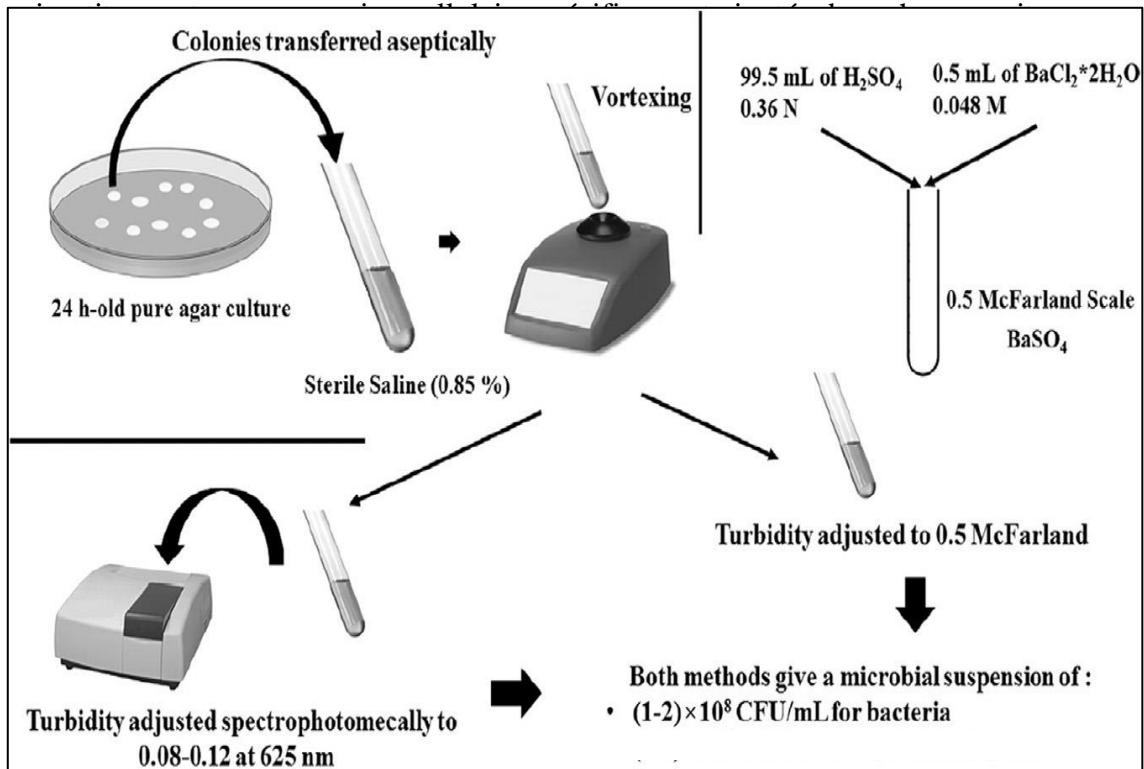
L'activité bactériostatique est caractérisée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'échantillon, c'est-à-dire la concentration la plus faible qui inhibe la croissance visible des bactéries in vitro après une incubation d'une nuit.

#### Méthode

Des dilutions de miel sont préparées et réparties dans des tubes à essai ; chaque tube est inoculé avec la souche à tester et incubé pendant une nuit à 37°C (Albaridi, 2019).

En bref, pour un test de dilution microbienne, en particulier dans le contexte de l'analyse du miel, les inoculums sont préparés en cultivant les souches sur une gélose au sang pendant une nuit à 37°C, puis en suspendant les colonies dans une solution saline à 0,85

%. Différentes concentrations de miel (2.5-80%) sont placées dans des plaques de

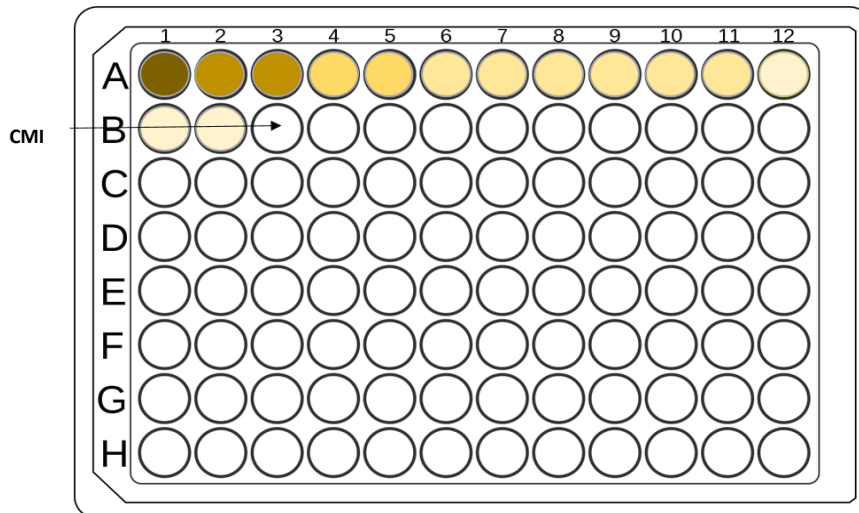


**Figure 30 :** Préparation d'un inoculum microbien de 0,5 McFarland par suspension directe de colonies, conformément aux recommandations du CLSI.

### Lecture

La mesure de l'absorbance est réalisée par spectrophotométrie pour évaluer la croissance bactérienne (turbidité) et pour évaluer la concentration minimale inhibitrice correspondant à l'absence de turbidité visuelle (comme le témoin négatif) (figure 30)

Les plaques de microtitrage sont incubées statiquement pendant 24 heures à 37°C, après quoi les CMI sont mesurées visuellement comme étant la plus faible concentration de miel résultant d'une analyse optique de la concentration de miel dans un puits optiquement clair (Figure 31) (Green *et al.*, 2020).



**Figure 31** : Concentration minimale inhibitrice par microdilution

#### V.1.4 Détermination de la concentration bactéricide minimale (CMB)

##### Principe

Le miel inhibe la croissance des bactéries soit par un effet bactéricide, soit par un effet bactériostatique. Un agent antibactérien a un effet bactéricide lorsqu'il tue 99,9% des bactéries testées, mais lorsqu'il inhibe ou ralentit la croissance bactérienne, son effet est bactériostatique (French, 2006).

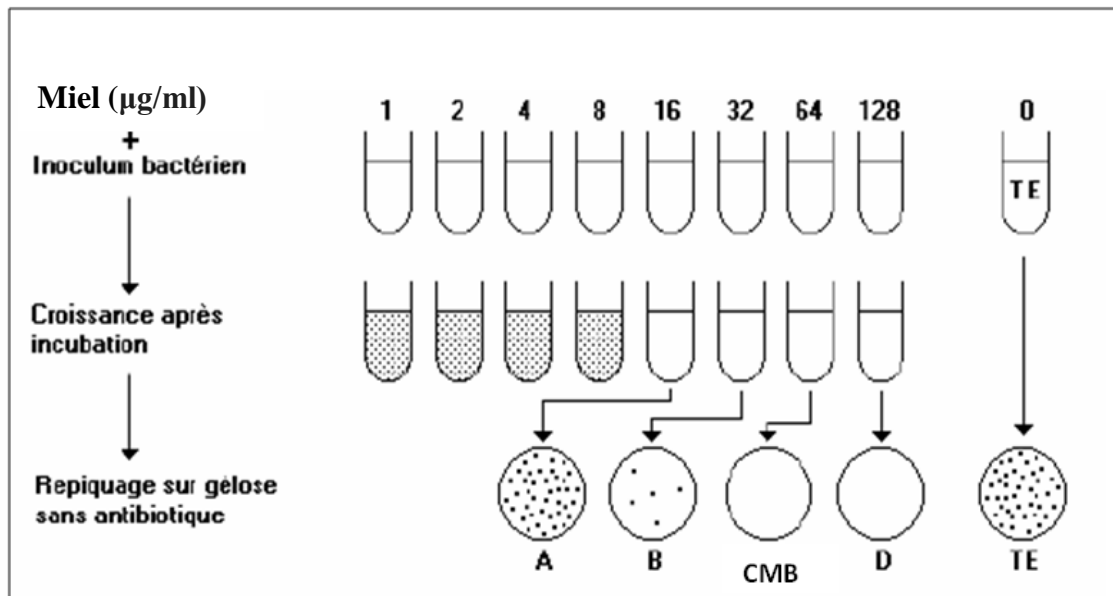
Le test CMB permet de déterminer la concentration minimale de miel nécessaire pour obtenir un effet bactéricide (99,9% des bactéries testées sont tuées).

##### Méthode

Pour évaluer l'activité bactériostatique ou bactéricide du miel testé, nous avons ajouté 0,1ml de la concentration minimale inhibant la croissance bactérienne (CMB) à 9 ml de bouillon et incubé pendant 24, 48 et 72 heures. Ensuite, 1 ml de ces cultures est inoculé sur une gélose nutritive pendant 24 heures pour vérifier les indices de croissance bactérienne (figure 32).

##### Lecture

Le miel est considéré comme bactériostatique si une croissance bactérienne a eu lieu et bactéricide lorsque l'inhibition de la croissance a persisté (Almasaudi *et al.*, 2017).



**Figure 32 :** Concentration minimale bactéricide

## V.2. Détermination de l'effet mutagénique et antimutagénique

### V.2.1 Effet antimutagène des échantillons de miel

L'effet antimutagène est réalisé selon la méthode décrite précédemment par Mortelmans et Zeiger (2000) avec de légères modifications en utilisant le test d'Ames (Mortelmans et Zeiger, 2000). Ce test est basé sur l'utilisation de bactérie mutante *Salmonella typhimurium*, qui a perdu sa capacité à produire de l'histidine, un acide aminé essentiel à son développement. En présence d'un agent mutagène, la bactérie peut retrouver sa capacité à produire de l'histidine et se développer sur un milieu de culture sans histidine.

#### V.2.1.1 Activation des souches de génotoxicité

##### Préculture de nuit

A partir des souches conservées, 20 µl de la souche à tester sont cultivés dans 5 à 20 ml de bouillon nutritif. Incuber dans un bain marie avec une agitation douce à 37°C pendant 16 heures. Les Milieux de culture utilisés pour les tests de génotoxicité sont mentionnés dans l'annexe 6.

##### Réisolement des souches

A partir de la culture de nuit de chaque souche, ensemercer une boîte de gélose minimale agar contenant une trace d'histidine et de biotine et 25 µg/ml d'ampicilline, et

25 µg/ml de tétracycline pour la souche TA102. Incuber les boîtes pendant 24 heures à 37°C. Ces boîtes sont placées dans le réfrigérateur et serviront comme source de bactéries pour des tests ultérieurs. Cette conservation durera jusqu'à 2 mois (Pillco et de la Peña, 2014; Chung *et al.*, 2006).

### V.2.1.2 Vérification des caractères génétiques

Toutes les souches qui ont été reçues à l'état lyophilisé ont été conservées à - 80 °C et régulièrement vérifiées pour leurs marqueurs génétiques (tableau 06). Le génotype des souches à tester doit être confirmé :

- Immédiatement après les avoir reçues quand un lot gelé est destiné à l'utilisation ;
- Quand le nombre de révertants spontanés par boîte sort de l'intervalle indiqué pour la souche à tester (tableau 04).
- Quand il y a une perte de sensibilité vis-à-vis des mutagènes standards (Tableau 05).

**Tableau 04 :** Nombre de révertant spontanée par boîte et par souche

Souches	Nombre de révertant spontanés /boîte	
	Avec S9 mix	Sans S9 mix
TA 98	20- 50	20-50
TA 100	75-200	75-200
TA 102	100-300	200-400

**Tableau 05 :** Mutagènes standards utilisés pour les trois souches de *S. typhimurium*

Souches    Témoins positifs

	-S9 mix	µg/boîte	+S9 mix	µg/boîte
TA98	4-Nitro- <i>o</i> -phénylenediamine	2,5	2-Aminoanthracène	5
TA100	Azide de Sodium	5	2-Aminoanthracène	5
TA102	Mitomicine C	0,5	2-Aminoanthracène	5

**Tableau 06 :** Caractéristiques génétiques des souches de *S.typhimurium* (Ames, 1973).

	TA98	TA100	TA102
<b>Mutation histidine</b>	HisD3052	HisG46	HisG428
<b>Séquence cible</b>	CGCGCGCG	GGG	TAA
<b>Type de mutation</b>	décalage du cadre de lecture	substitution de paires de bases	Transition/tranversion
<b>Mutation <i>uvr B</i></b>	+	+	-
<b>Mutation <i>rfa</i></b>	+	+	+
<b>Plasmide détecté</b>	pKM101	pKM101	pKM101 et pAQ1

### V.2.1.3 Auxotrophie à l'histidine

#### Principe

Toutes les souches de *S. typhimurium* ont une mutation dans l'opéron histidine, qui les rend auxotrophes à l'histidine, c'est-à-dire que la croissance bactérienne sera impossible dans un milieu sans histidine.

#### Méthode

Avec un écouvillon, faire une seule strie de chaque souche de *S. typhimurium* sur des boîtes de Pétri contenant :

- Gélose minimale agar seul ;
- Gélose minimale agar enrichie d'une trace de biotine ;
- Gélose minimale agar enrichie d'histidine et de biotine.

Incuber à 37°C pendant 48 heures.

#### Lecture

La croissance des trois souches n'est observée que dans la boîte de gélose minimale agar enrichie d'une solution d'histidine/biotine (la croissance de toutes les souches de *S. typhimurium* dépend de l'histidine)(Pillco et de la Peña, 2014; Mortelmans et Zeiger, 2000).

### V.2.1.4 Dépendance à la biotine

#### Principe

Une mutation par délétion dans le gène gouvernant la synthèse de la biotine rend toutes les souches de *S. typhimurium* (sauf la souche TA 102) incapable de pousser dans un milieu sans biotine.

#### Méthode

Avec un écouvillon, faire une seule strie de chaque souche de *S. typhimurium* sur des boîtes de Pétri contenant :

- Gélose minimale agar seul
- Gélose minimale agar enrichie d'une trace de biotine

Incuber à 37°C pendant 48 heures

### Lecture

La croissance de la souche TA 102 est observée dans les deux boîtes (croissance indépendante de la biotine), cependant aucune croissance n'est observée pour les souches TA 98 et TA 100 (Chung *et al.*, 2006; Mortelmans et Zeiger, 2000).

### V.2.1.5 Mutation *uvrB*

#### Principe

Une mutation par délétion dans le gène *uvrB* rend toutes les souches de *S. typhimurium* (sauf la souche TA 102) incapable de réparer les mutations produites après exposition à la lumière UV.

#### Méthode

Les trois souches de *S. typhimurium* (TA98, TA100, et TA102) et une souche sauvage sont ensemencées par stries sur des boîtes de gélose minimale agar enrichie d'une trace d'histidine et de biotine. La moitié de la boîte est recouverte par une plaque en verre, ensuite exposé à la lumière UV (260 nm) à une distance de 30 cm pendant 8 secondes. Incuber les boîtes à 37°C pendant 48 heures.

#### Lecture

Aucune croissance n'est observée pour les souches de *S. typhimurium* TA 98 et TA 100 sur la moitié de la boîte irradiée. Cependant, une croissance de la souche sauvage et la souche TA 102 est observée dans les deux parties de la boîtes (Pillco et de la Peña 2014; Chung *et al.*, 2006).

### V.2.1.6 Mutation *rfa*

#### Principe

Une mutation par délétion dans le gène *rfa* rend toutes les souches de *S. typhimurium* plus perméable aux agents chimiques.

#### Méthode

Ensemencer une boîte de gélose minimale agar enrichie d'une trace d'histidine et de biotine avec l'une des trois souches de *S. typhimurium*.

Déposé à la surface de la boîte un disque de papier wattman.

Verser un volume de 10 µl de la solution de cristal violet (0,1 %w/v) sur le disque. Incuber à 37°C pendant 48 heures.

### **Lecture**

Un halo d'inhibition est observé autour de chaque disque boites (Pillco et de la Peña 2014; Chung *et al.*, 2006).

### **V .3.1.7 Résistance à l'ampicilline**

#### **Principe**

La présence du plasmide pKM101 rend les souches TA 98, TA 100 et TA 102 résistante à l'ampicilline.

#### **Méthode**

Un disque d'ampicilline est déposé directement à la surface d'une boîte de gélose minimale agar enrichie d'une trace d'histidine et de biotine et ensemencé avec l'une des trois souches de *S. typhimurium*. Incuber à 37°C pendant 48 heures.

#### **Lecture**

Aucune zone d'inhibition n'est observée autour du disque d'ampicilline pour les trois souches testées (Pillco et de la Peña, 2014).

### **V.2.1.8 Résistance à la tétracycline**

#### **Principe**

La présence du plasmide pAQ1 rend la souche TA 102 résistante à la tétracycline.

#### **Méthode**

Un disque de tétracycline est déposé à la surface d'un milieu de gélose minimale agar ensemencé avec la souche *S. typhimurium* TA102. Incuber à 37°C pendant 48 heures.

#### **Lecture**

Aucune zone d'inhibition n'est observée autour du disque de tétracycline (Pillco et de la Peña 2014).

## V.2.2. Test d'Ames

### Principe

Le test d'Ames consiste à examiner la capacité d'une substance chimique ou un agent physique d'induire des mutations spécifiques chez des souches de *S. typhimurium* porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His<sup>-</sup> reversent spontanément vers His<sup>+</sup> (figure 33). Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His<sup>-</sup> à des agents génotoxiques (Pillco et de la Peña 2014; Ames, 1973).

### Méthode sans activation métabolique

- Un volume de 20 µl de la souche à tester est cultivé dans 5 à 20 ml de bouillon nutritif enrichi d'une trace d'histidine et de biotine et de 25 µg/ml d'ampicilline, pour la souche TA102, 25 µg/ml de tétracycline sont ajoutées.
- Après 18 heures d'incubation à 37°C avec agitation dans un bain marie, 100 µl de cette culture sont mis en contact avec 100 µl de chaque dilution de l'échantillon de miel à tester, et 500 µl du tampon phosphate.
- Le mélange est incubé à 37°C pendant 20 min (étape de préincubation).
- Un volume de 2 ml du milieu top agar sont ajouté au mélanges et verser après une légère agitation sur le milieu gélose minimale agar.
- Après solidification du mélange, les boîtes sont incubées pendant 48 heures à 37°C (Mortelmans et Zeiger, 2000 ; Chung et al., 2006).

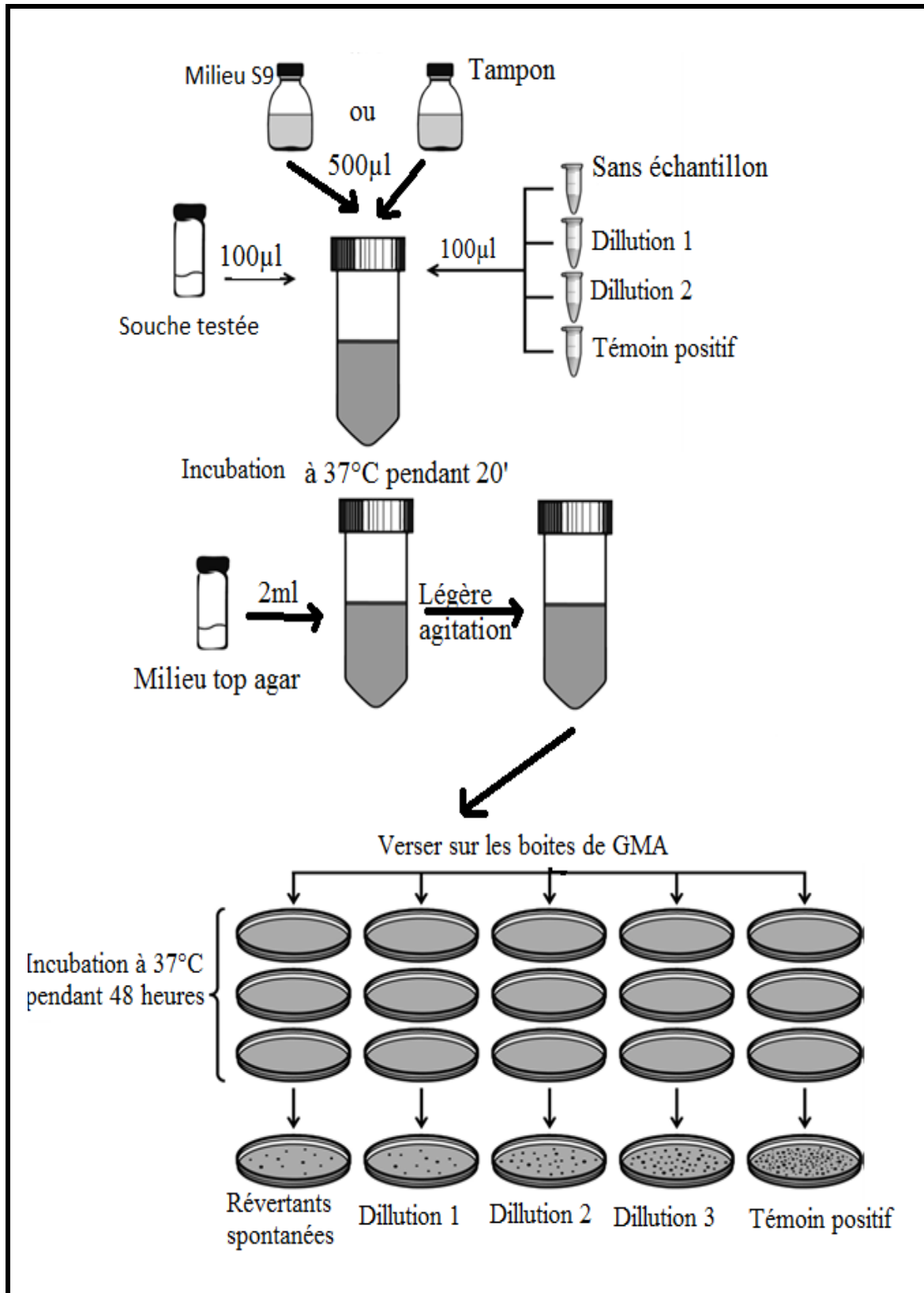
Les produits suivants sont utilisés comme témoins positifs :

- L'azide de sodium (5 µg/boîte),
- Le 4-Nitro-*o*-phénylenediamine (2.5 µg/boîte),
- La mitomicine C (0.5 µg/boîte),
- Le 2-aminoanthracène (5µg/boîte).

L'eau distillée stérile a été utilisée comme témoin négatif.

Tous les tests ont été effectués en double exemplaire et chaque expérience a été répétée trois fois.

## Lecture



**Figure 33:** Protocole du test d'Ames (Pillco et de la Peña, 2014)

Après une légère agitation dans une plaque d'agar au glucose minimal. Après une incubation de 48 h à 37°C. Le nombre de colonies révertantes a été compté.

Un échantillon de miel est considéré comme ayant un effet mutagène si le coefficient de réversion (CR) est supérieur ou égal à deux. Ce coefficient est calculé selon cette formule :  $CR = \frac{R1}{R0}$

L'effet antimutagène du miel s'exprime en pourcentage d'inhibition (I%) de la mutagenicité d'un mutagène positif ; il est calculé selon la formule suivante :

$$I(\%) = 100 - \left( \frac{R3}{R2} \right) \times 100$$

Où : R0 est le nombre de colonies révertantes spontanées par plaque

R1 est le nombre de colonies révertantes induites par le miel

R2 est le nombre de colonies révertantes par plaque exposées à un mutagène positif

R3 est le nombre de colonies révertantes par plaque exposée au mutagène positif et au miel.

## VI. L'activité antioxydante

### VI.1. Pouvoir antiradicalaire (Méthode de balayage du radical libre DPPH)

Les propriétés antioxydantes de chaque échantillon de miel ont également été étudiées en évaluant l'activité de piégeage des radicaux libres par le DPPH, selon la méthode proposée par Ferreira et al. 2009. Brièvement, un extrait de miel (1 ml) a été mélangé à une solution méthanolique contenant des radicaux DPPH (0,25 mM, 1 ml). Le mélange a été vigoureusement agité à l'aide d'un vortex et laissé reposer pendant 30 minutes dans l'obscurité (jusqu'à ce que leur absorbance reste inchangée), un blanc est composé de la solution de DPPH

La réduction du radical DPPH a été déterminée en mesurant l'absorbance du mélange à 517 nm (khalil et al., 2011).

L'activité de piégeage des radicaux (APR) a été calculée en pourcentage de décoloration par le DPPH à l'aide de l'équation suivante :

Pourcentage d'inhibition (%) =  $100 * [(absorbance\ du\ blanc - absorbance\ de\ l'échantillon) / absorbance\ du\ blanc]$ .

L'IC50 représente la concentration de miel nécessaire pour inhiber 50 % du radical DPPH (couleur). Pour déterminer cette valeur on utilise la modélisation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du miel à l'aide d'une équation exponentielle.

### VI.2. Méthode de l'émulsion b-carotène-acide linoléique

L'activité antioxydante des solutions méthanoliques de miel a été évaluée à l'aide du système modèle b-carotène-linoléate (Silva et al., 2013). Une solution de b-carotène (0,2 mg/ml) a été préparée dans du chloroforme et deux millilitres de cette solution ont été pipetés dans un petit ballon à fond rond (100 ml). Après élimination du chloroforme sous vide à 40°C, 20 mg d'acide linoléique, 200 mg de Tween 40 et 50 ml d'eau distillée ont été ajoutés à la fiole en agitant vigoureusement.

Des aliquotes (4,8 ml) de l'émulsion préparée ont été transférées dans une série de tubes contenant 0,2 ml d'échantillons de miel. Après avoir placé les tubes à essai dans un bain-marie à 50°C, l'absorbance de chaque tube a été mesurée régulièrement à l'aide d'un spectrophotomètre à 470 nm en commençant par l'absorbance au temps zéro (t = 0 min) et à des intervalles de 15 minutes jusqu'à la fin (t = 120 min) de l'expérience. Le BHT et  $\alpha$ -tocophérol ont été utilisés comme étalons.

500 microlitres de solution de l'échantillon de miel ou d'antioxydant de la référence ( $\alpha$ -tocophérol) [solubilisé dans le méthanol] ont été ajoutés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. La même procédure a été répétée avec le Butyl hydroxy toluène (BHT) comme étalon et avec un blanc (sans BHT). L'absorbance a été mesurée à 490 nm avant et après le traitement thermique avec des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'analyse de blanchiment du  $\beta$ -carotène a été calculée comme suit :

% Inhibition =  $(Absorbance\ du\ produit\ à\ T\ 0 - Absorbance\ du\ produit\ à\ T60min) / (Absorbance\ du\ contrôle\ à\ T\ 0 - Absorbance\ du\ contrôle\ à\ T60min) * 100$ .

## VII. Analyses Statistiques

Les données ont été soumises à une analyse statistique à l'aide du logiciel SPSS Version 26, un outil sophistiqué d'analyse et de traitement de données développé par IBM (IBM SPSS Statistics, Armonk, New York, USA).

Tests Statistiques Utilisés :

**Présentation Descriptive des Données :** Pour la description des données, nous avons utilisé les fréquences et pourcentages, ainsi que la moyenne, l'erreur-type et l'écart type.

- Fréquence (%)
- Moyenne (M)
- Erreur Standard (SE)
- Écart Type (SD)

**Test du Khi-deux ( $\chi^2$ ) :** Le test du Khi-deux est une méthode non paramétrique employée pour déterminer si deux variables catégorielles ou nominales sont susceptibles d'être liées ou non.

**Niveau de Signification (P) :** Une corrélation est considérée significative si la valeur de P est inférieure à 0,05 ou 0,01.

**Cramer's V (Khi-deux) :** La taille d'effet (R) est utilisée comme mesure de la force de l'effet observé d'une variable nominale sur une autre, avec les valeurs suivantes indiquant la force de l'effet :

- R= 0.8 (fort)
- R= 0.5 (moyen)
- R= 0.2 (faible)

**Cohen's D :** Le test de Cohen's D est utilisé pour comparer les proportions des colonnes (Post-Hoc) et est ajusté par la méthode de Bonferroni.

Objectif : Pour déterminer la signification des différences entre les proportions des colonnes.

Critère : Les valeurs dans la même ligne qui ne partagent pas le même indice sont considérées significativement différentes ( $P < 0,05$  ou  $P < 0,01$ ).

**Kruskal-Wallis ANOVA Unidirectionnelle :** Le test de Kruskal-Wallis est employé pour évaluer la signification des différences dans l'activité bactérienne (DI, MIC, MBC, Ratio) entre les groupes de familles de bactéries dans chaque type de miel.

Méthode : Il s'agit d'une méthode non paramétrique utilisée pour comparer deux ou plusieurs échantillons indépendants sur une variable ordinale.

**Comparaisons Multiples en Paires (Post-Hoc)** : Les comparaisons multiples en paires sont effectuées pour déterminer la signification des différences entre chaque groupe de famille et les autres groupes dans un même type de miel.

Objectif : Évaluer la signification des différences entre chaque groupe et les autres groupes.

Critère : Les valeurs dans la même ligne qui ne partagent pas le même indice sont considérées significativement différentes ( $P < 0,05$  ou  $P < 0,01$ ).

# Résultats et discussion

## Résultats et discussion

Cette étude cherche à évaluer les échantillons de miel algérien comparativement à un miel commercial (Manuka). L'évaluation se concentre sur les sucres, les propriétés physico-chimiques, l'identification des sources florales par méliosopalynologie, l'activité de la glucose oxydase (GOX) et l'efficacité antibactérienne contre *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Elle explore également la relation entre l'effet antibactérien et l'activité antimutagène avec les polyphénols, flavonoïdes et la couleur du miel et évalue également l'activité antioxydante des miels étudiés.

### 1.Examens organoleptiques des échantillons de miel étudiés

Les résultats des examens organoleptiques des échantillons de miel étudiés sont représentés dans le tableau 07.

**Tableau 07** : Examen organoleptique des échantillons de miel étudiés

Echantillon	Structure	Couleur	Odeur	Saveur
<b>Miel 1</b>	Cristallisation perceptible	Ambré clair	Puissance moyenne, fruité	Assez doux, fruité, acidulé
<b>Miel 2</b>	Cristallisation assez fine et assez ferme	Ambré clair	Assez puissant, fruité	Assez doux, très fruité, acidulé
<b>Miel 3</b>	Cristallisation perceptible et très ferme	Ambré	Puissance moyenne, végétal	Complexe, fruité, acidulé, mentholé, assez persistant
<b>Miel 4</b>	Cristallisation perceptible et assez ferme	Ambré clair	Assez puissant, complexe, mentholé	Complexe, fruité, assez acidulé, persistant
<b>Miel 5</b>	En voie de cristallisation avec amorce de	Ambré	Puissance moyenne,	Complexe, "animal", fruité, acidulé

	séparation de phase		complexe, "animal"	
<b>Miel de Manuka</b>	Cristallisation très grossière	Ambré	Assez puissant, complexe, "animal"	Complexe, "animal", fruité, acidule, persistant

L'analyse sensorielle du miel est utilisée pour évaluer sa qualité, déterminer son origine et vérifier son authenticité. L'interprétation des caractéristiques sensorielles du miel diffère selon les critères établis pour chaque variété de miel en cours d'évaluation. Chaque type de miel présente des propriétés organoleptiques spécifiques qui lui sont propres.

La couleur des échantillons de miel étudiés varie de l'ambré clair à l'ambré. Les échantillons M1, M2, M4 sont ambrés clair. Les échantillons M3, M5 et miel de Manuka sont de couleur ambrée (Bogdanov *et al.*, 2004; Gonnet *et al.*, 1986).

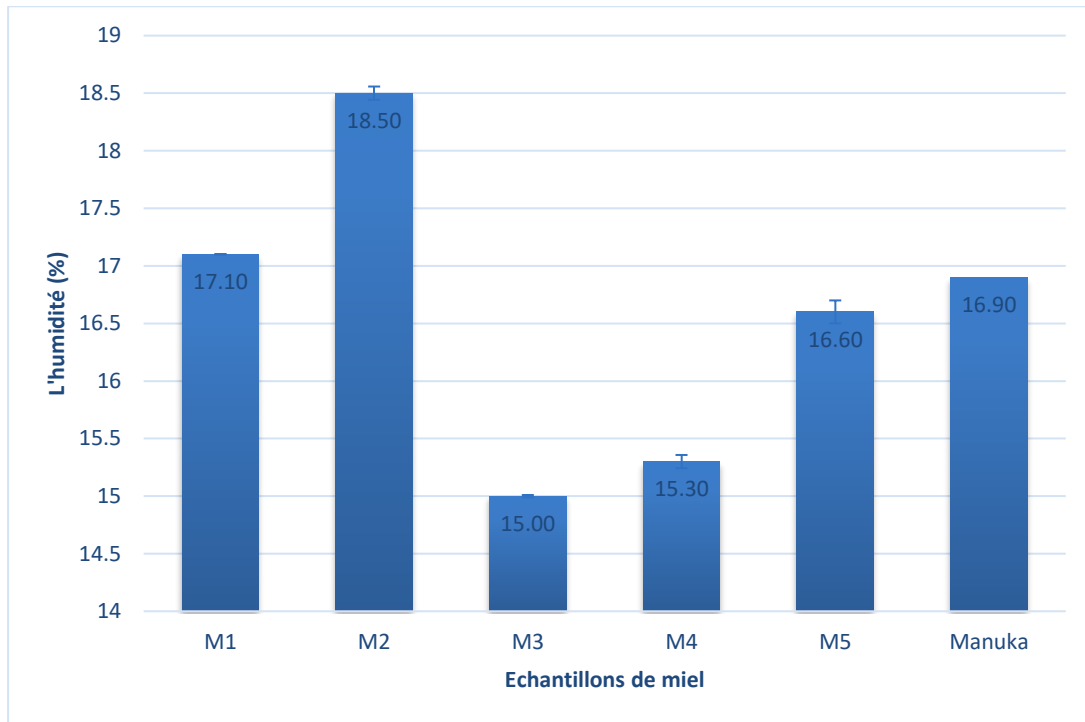
L'intensité de la couleur du miel peut être interprétée comme un indicateur fiable de la présence de pigments ayant des propriétés antioxydantes. Beretta *et al.* (2005), ont montré que l'augmentation de l'intensité de la couleur est associée à une augmentation des propriétés antioxydantes et de la teneur en polyphénols. Irina *et al.* (2010), ont révélé l'existence d'une forte corrélation entre l'activité antioxydante des différents types de miel et leur teneur en composés phénoliques, tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes (Irina *et al.*, 2010). De plus, la couleur du miel est fortement influencée par son origine botanique (Moniruzzaman *et al.*, 2013).

Par ailleurs, tous les échantillons étaient acides. Cet indicateur est très important ; il donne un aperçu de la qualité, de la stabilité et de la maturation du miel. Ce taux est influencé par la teneur en eau de l'origine botanique, le degré de maturité de la ruche, les conditions climatiques, la saison de récolte et l'origine géographique (Machado De-Melo *et al.*, 2018). Une forte interaction se produit entre les sucres du miel (sursaturés à environ 80% de monosaccharides) et les molécules d'eau. La transformation des sucres en acides organiques (acide gluconique) et la présence d'ions inorganiques (phosphate, chlorure) sont responsables de l'acidité du miel. La forte teneur en sucre empêche le développement des bactéries de toute espèce dans le miel complètement mûr en rendant l'eau indisponible (Molan, 1992).

## 2. Les résultats des paramètres physico-chimiques

### 2.1 Humidité

Les résultats de la mesure de l'humidité des échantillons de miel sont représentés dans la figure 34.



**Figure 34 :** Taux d'humidité des échantillons de miels.

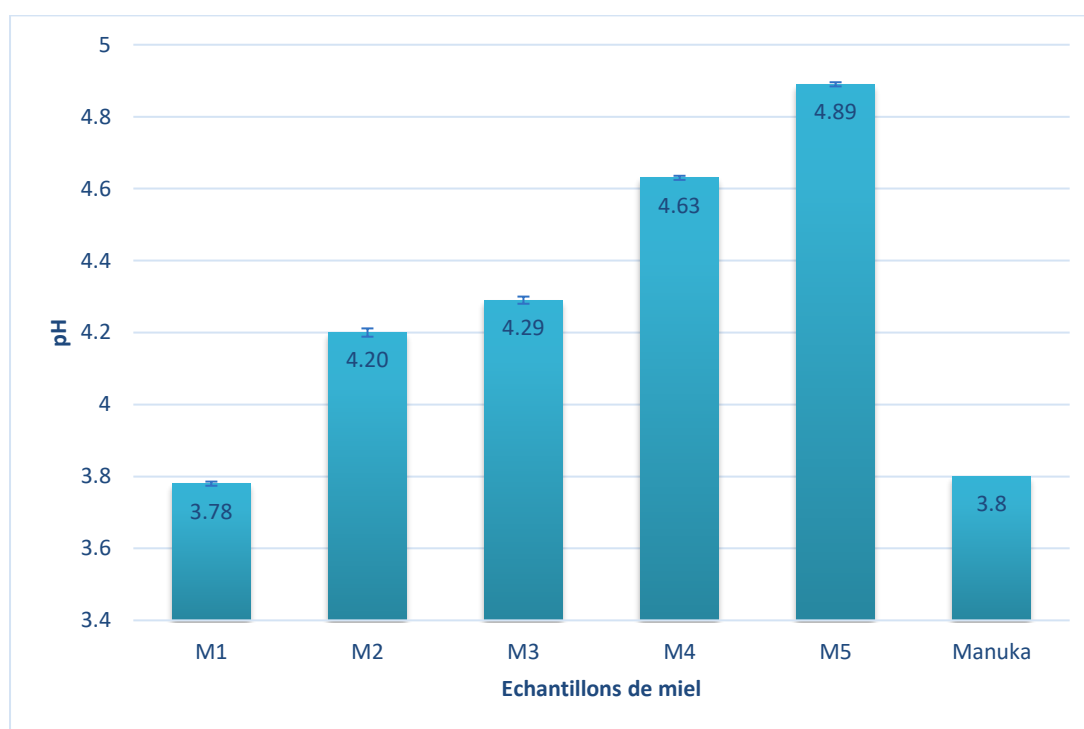
L'humidité ou la teneur en eau est un indicateur important pour la durée de conservation du miel, sa qualité et sa durabilité (Prica *et al.*, 2015; Gonnet *et al.*, 1986). Le taux d'humidité élevée peut entraîner une fermentation involontaire du miel causée par des levures tolérantes à l'osmose, produisant du dioxyde de carbone et de l'alcool éthylique pendant le stockage; ce processus dégrade la qualité du miel (Ibrahim Khalil *et al.*, 2012). En revanche, un faible taux d'humidité prolonge la durée de conservation du miel. Par ailleurs, les réglementations internationales en matière de qualité précisent qu'il est recommandé d'utiliser un miel dont le taux d'humidité est inférieur ou égal à 20 % (Council Honey Directive, 2001). Le taux d'humidité des échantillons de miel étudiés varie entre 15 et 18.5 %, avec une moyenne de 16.5%.

La teneur en eau du miel est influencée par la variation de la saison de récolte, les conditions climatiques (température de l'air et humidité relative), le degré de maturité de la ruche, l'origine géographique et même la teneur en eau de l'origine botanique (Machado *et al.*, 2020).

L'humidité du miel M1 est plus faible que dans les rapports précédents (Haouam *et al.*, 2016; Benaziza-Bouchema et Schweitzer, 2010). Le miel M2 a le taux d'humidité le plus élevé en raison du climat méditerranéen de la région de récolte (un climat humide). Ces résultats confirment les conclusions de Chefrour *et al.* 2009 (Chefrour *et al.*, 2009). Les Miel M3, M4, M5 contiennent un taux d'humidité inférieur à celui du Manuka qui se fermente plus rapidement alors que ces échantillons se conservent mieux.

## 2.2. pH des échantillons de miel

Les résultats de la mesure du pH des échantillons de miel dont regroupé sur la figure 35. Les valeurs de pH des échantillons analysés sont comprises entre 3,78 et 4,89, dont M1, M2, M3 et Manuka sont des miels de fleurs selon les normes avec un pH compris entre 3,5 et 4,5 (Bogdanov *et al.*, 2008; AOAC, 1990). En même temps, les miels M4 et M5 sont des miels de miellat, avec un pH compris entre 4,5 et 5,5 (Gonnet *et al.*, 1986).



**Figure 35 :** Les valeurs du pH des différents échantillons de miels.

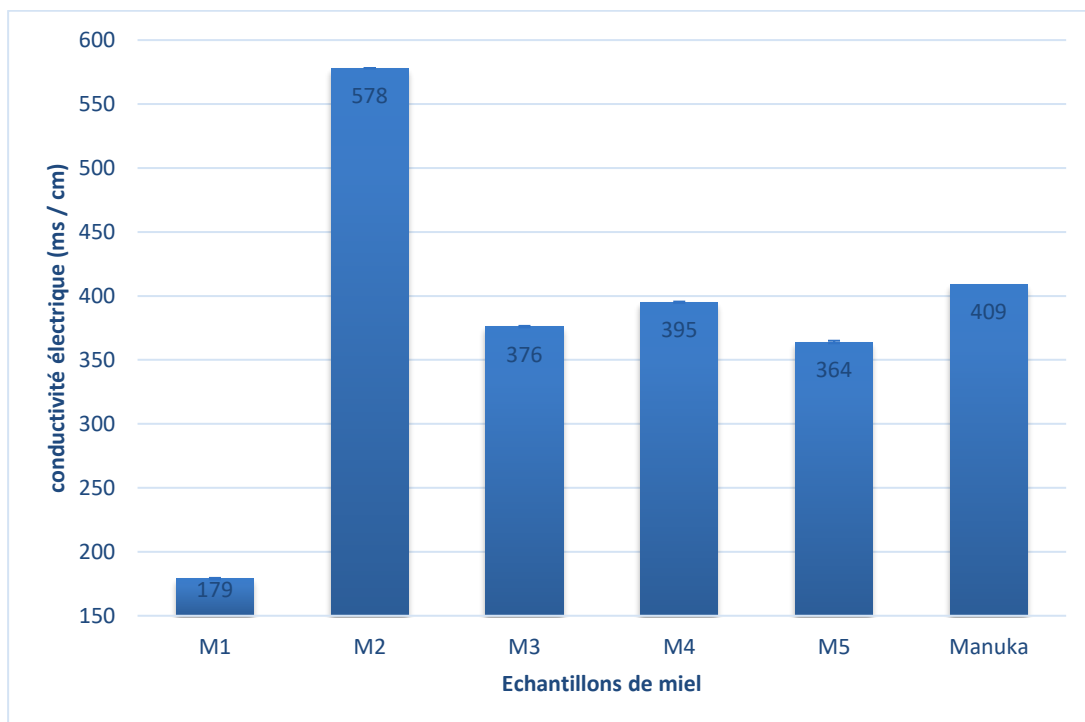
La provenance florale et la zone géographique de récolte influencent fortement les valeurs de pH (Sousa *et al.*, 2016). Ce dernier influence la stabilité, la durée de conservation et même la texture du miel.

Selon Bogdanov (2008), l'acidité élevée permet au miel de résister aux altérations bactériennes et lui confère un potentiel antibactérien. Tous les échantillons avaient des valeurs de pH acides.

Les résultats retrouvés sont en corrélation avec les mesures de pH rapportées par plusieurs auteurs (Zerrouk *et al.*, 2018; Zerrouk *et al.*, 2011; Haouam *et al.*, 2016; Rebiai et Lanez, 2015; Haderbache *et al.*, 2013). La variation entre les résultats en pH est influencée par la saison de collecte et l'année selon la localité de collecte au sein d'un même état.

### 2.3. Mesure de la conductivité électrique

Les résultats de la mesure de la conductivité sont portés sur la figure 36. Tous les échantillons de miel possèdent une valeur de conductivité supérieure à 179. Le miel M2 qui provient de la région d'Annaba possède la valeur de conductivité électrique la plus élevée.



**Figure 36 :** La conductivité électrique des différents échantillons de miels.

La conductivité électrique (CE) est un critère de distinction entre le miel de fleurs et le miel de miellat. La CE est un indicateur utile de l'origine botanique. Elle joue un rôle important dans l'authentification du miel monofloral et dans l'évaluation des caractéristiques physiques du miel (Serrano *et al.*, 2004; Mateo et Bosch-Reig, 1998).

Selon Persano *et al* (1995) la valeur de la conductivité électrique (CE) est négativement corrélée avec la quantité de pollen de la plante qui affecte les propriétés physico-chimiques et sensorielles selon l'origine botanique (Oddo *et al.*, 1995).

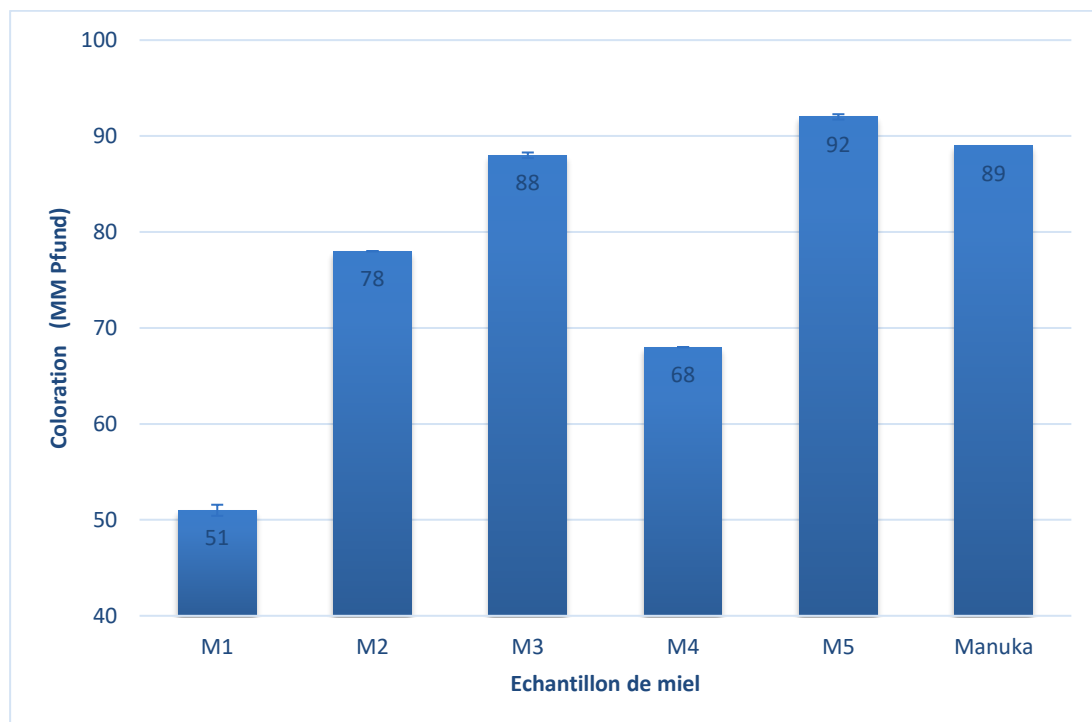
Inférieure à 0,8 (ms / cm) pour les miels de fleurs et les miels de miellat de sorbier tandis que supérieure à 0,8 (ms / cm) pour les miels de miellat et de châtaignier (Benaziza-Bouchema et Schweitzer, 2010; Ouchemoukh *et al.*, 2007). Toutes les valeurs de CE étaient inférieures à 0,8 (mS/cm) (Figure 36) dans les limites des paramètres prescrits.

Les valeurs de conductivité électrique des échantillons étudiés sont en accord avec les résultats préalablement rapportés par plusieurs auteurs (Zerrouk *et al.*, 2018; Haouam *et al.*, 2016; Rebiai *et al.*, 2015; Haderbache *et al.*, 2013; Ouchemoukh *et al.*, 2007).

#### 2.4. Mesure de l'intensité de couleur

Les résultats de la détermination de l'intensité de couleur sont représentés sur la figure 37.

Ces résultats montrent que le miel M5 qui provient de la région d'ElBaydh est plus foncé que les autres échantillons de miel.

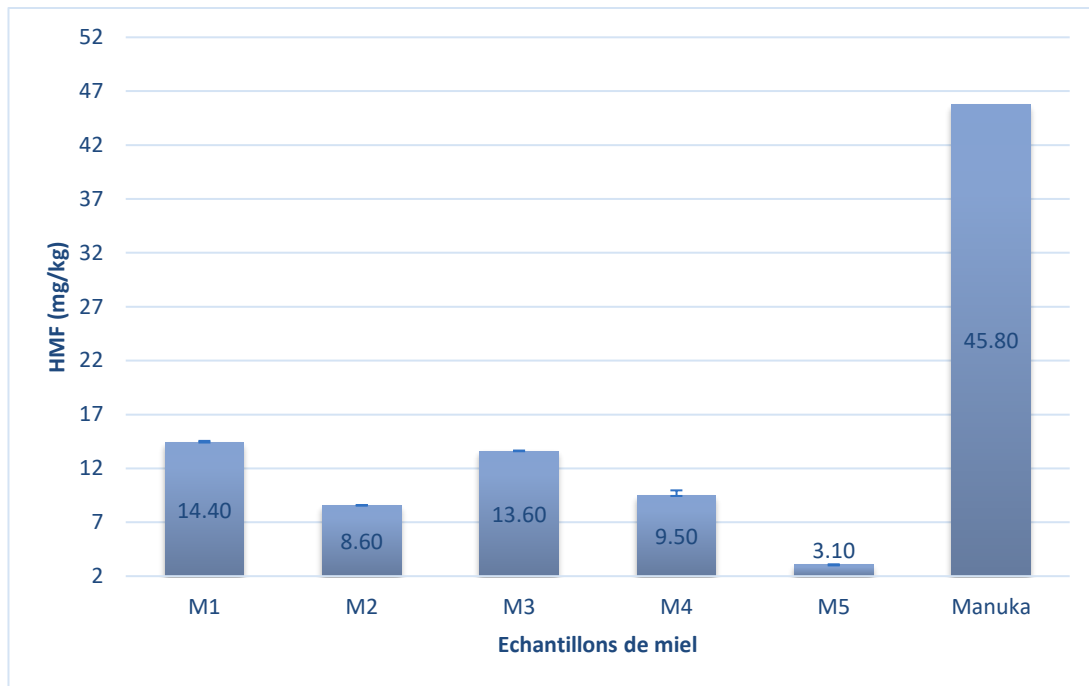


**Figure 37 :** La coloration des différents échantillons de miels.

Selon les normes de couleur de l'USDA, le miel est classé par couleur et généralement commercialisé sur la base de l'échelle de couleur Pfund (United States Standards for Grades of Extracted Honey, 1985). Le miel est de couleur ambré clair si sa valeur de Pfund en mm est supérieur à 51 et inférieur à 85, ambré si sa valeur est supérieur à 86 et inférieur à 114 (Tesfaye *et al.*, 2016). La couleur intense du miel est souvent le reflet de sa richesse en substances bioactives. Plus le miel est de couleur intense, plus il est probable que le miel contienne des composés bénéfiques tels que des antioxydants, des enzymes et des polyphénols. Cette intensité de couleur est généralement associée à la diversité florale de la région où les abeilles ont butiné. Les miels plus foncés, sont souvent vantés pour leurs propriétés thérapeutiques. Ainsi, l'observation de l'intensité de couleur du miel peut offrir des indices sur sa concentration en substances bioactives, contribuant ainsi à évaluer son potentiel pour la santé (Zerrouk *et al.*, 2018; Haderbache *et al.*, 2013; Ouchemoukh *et al.*, 2007). La couleur des échantillons de miels sont comparables aux résultats rapportés par Rebiai et Lanez (2015) et Zerrouk *et al* (2011). Cette différence d'intensité de couleur est due à la période de conservation, où le miel devient plus foncé avec le temps.

## **2.5. Mesure du 5-hydroxyméthylfurfuraldéhyde (HMF)**

Les résultats de la mesure de l'HMF sont portés sur la figure 38. Les résultats obtenus ont montré que tous les échantillons de miel algériens ont une teneur en HMF bien inférieures au maximum autorisé par les législations internationales et les rapports des miels algériens, qui varient entre 3,10 et 14,40 mg/kg. Le miel de Manuka a un HMF de 45,8 mg/kg, une valeur qui est très élevée et dépasse la limite fixée par l'Union européen.



**Figure 38 :** Le contenu d’Hydroxyméthylfurfural (HMF) des échantillons de miels.

La mesure de l’HMF est crucial pour évaluer la qualité d emiel (Khalil *et al.*, 2012). L’HMF dans le miel nouvellement collecté est généralement absent. Cependant, pendant le stockage, l’emballage ou l’exposition à la chaleur, son niveau augmente. Les sucres du miel (hexoses) sont transformés en hydroxyméthylfurfural par un mécanisme de déshydratation catalysé par un acide (Zappalà *et al.*, 2005). De nombreux facteurs font que le miel est très sensible à l’influence de la chaleur. De nombreux facteurs rendent très difficile la standardisation de la composition du miel et l’attribution d’attributs de qualité spécifiques.

Les valeurs d’HMF des échantillons M2, M3, M4 étaient meilleurs car celles-ci étaient inférieures aux résultats des miels publiés par Zerrouk *et al.* (2018), Makhloufi *et al* (2010) et Benaziza-Bouchema et Schweitzer (2010). Alors, les valeurs d’HMF du miel de M1 sont similaires à celles de Benaziza-Bouchema et Schweitzer (2010).

Selon la directive 110/2001 de l’Union européenne, la limite maximale d’HMF du miel est de 40 mg/kg (EU, 2002). Alors que le Codex Alimentarius a spécifié la valeur de 80mg/kg après conditionnement et 60mg/kg lorsque le miel est fraîchement récolté et mis en bouteille ( Codex Alimentarius, 2001). Les valeurs HMF différent selon la période de conservation ce qui entraîne son augmentation au fil du temps. Nos résultats prouvent que nos miels n’ont été exposés à aucun traitement thermique pendant leur collecte et leur conservation.

### **3.Résultats du profil glucidique**

Les résultats de la détermination du profil glucidique sont portés sur les figures 39-41 et 42.

L'analyse des glucides joue un rôle majeur dans les enquêtes alimentaires sur la composition, la falsification, l'estimation des valeurs nutritionnelles, l'identification, les études de contrôle de l'origine, etc.(Geană *et al.*, 2020; Corradini *et al.*, 2012).

Le profil des sucres varie d'un échantillon de miel à l'autre, en fonction du type de fleur, du climat et de la région géographique (Mateo et Bosch-Reig, 1998). Les sucres tels que le fructose, le glucose, monosaccharides le saccharose, l'isomaltose, le maltose, le turanose, disaccharides ont été identifiés et quantifiés par chromatographie ionique dans les échantillons de miel testés.

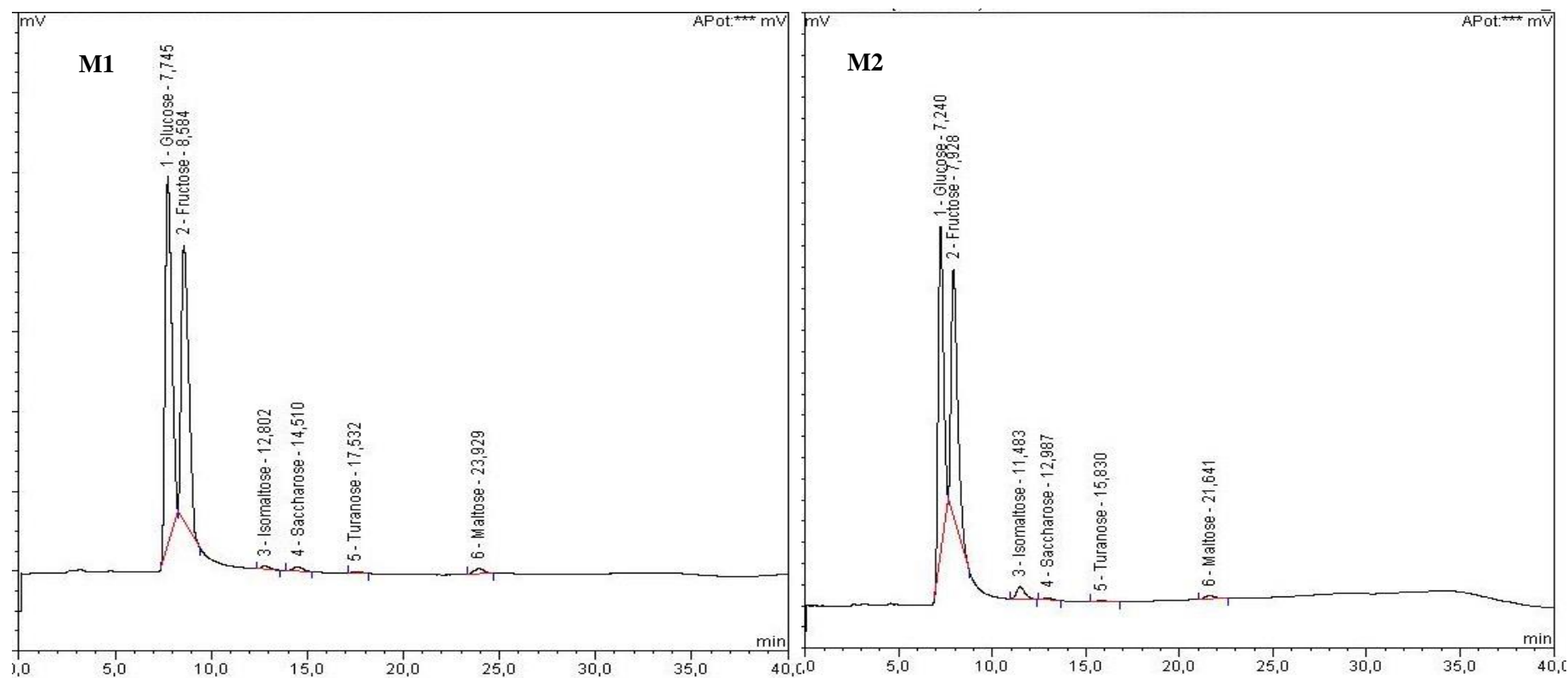


Figure 39 : Profils chromatographiques HPAE-PAD des sucres dans les échantillons de miel (M1, M2).

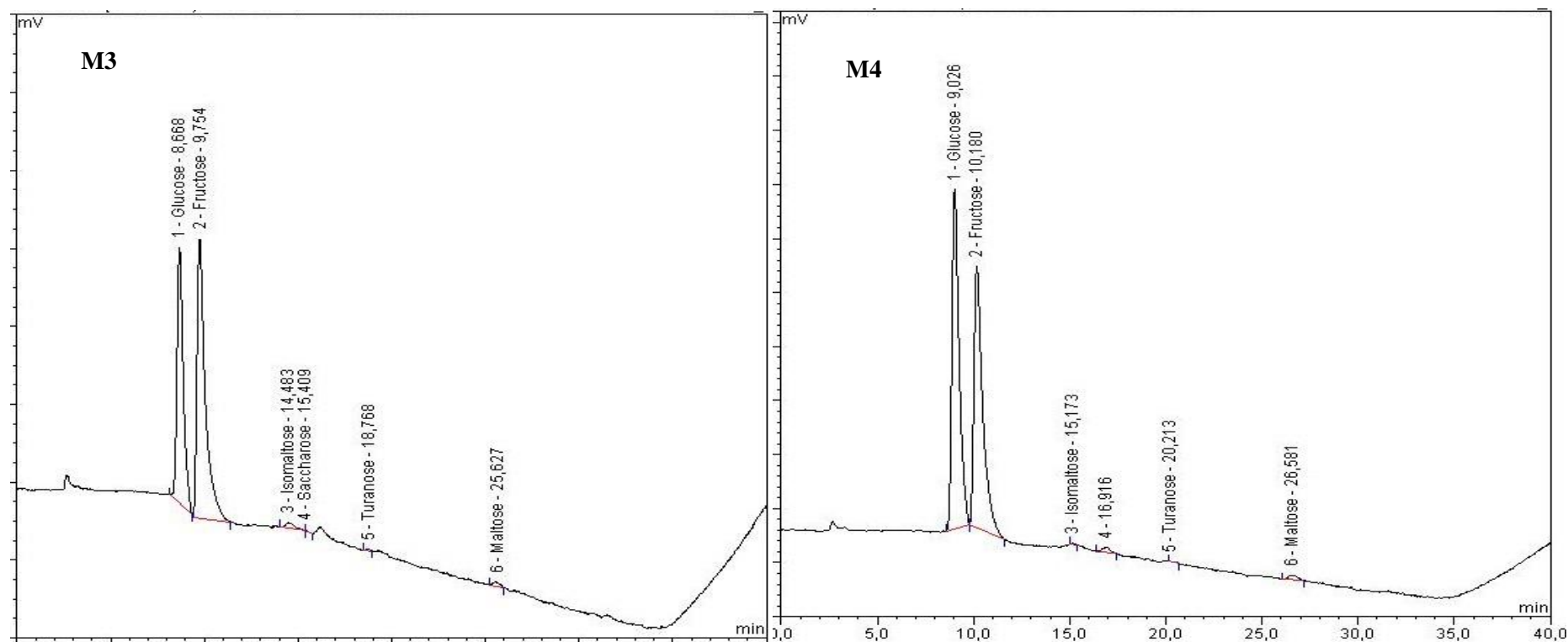
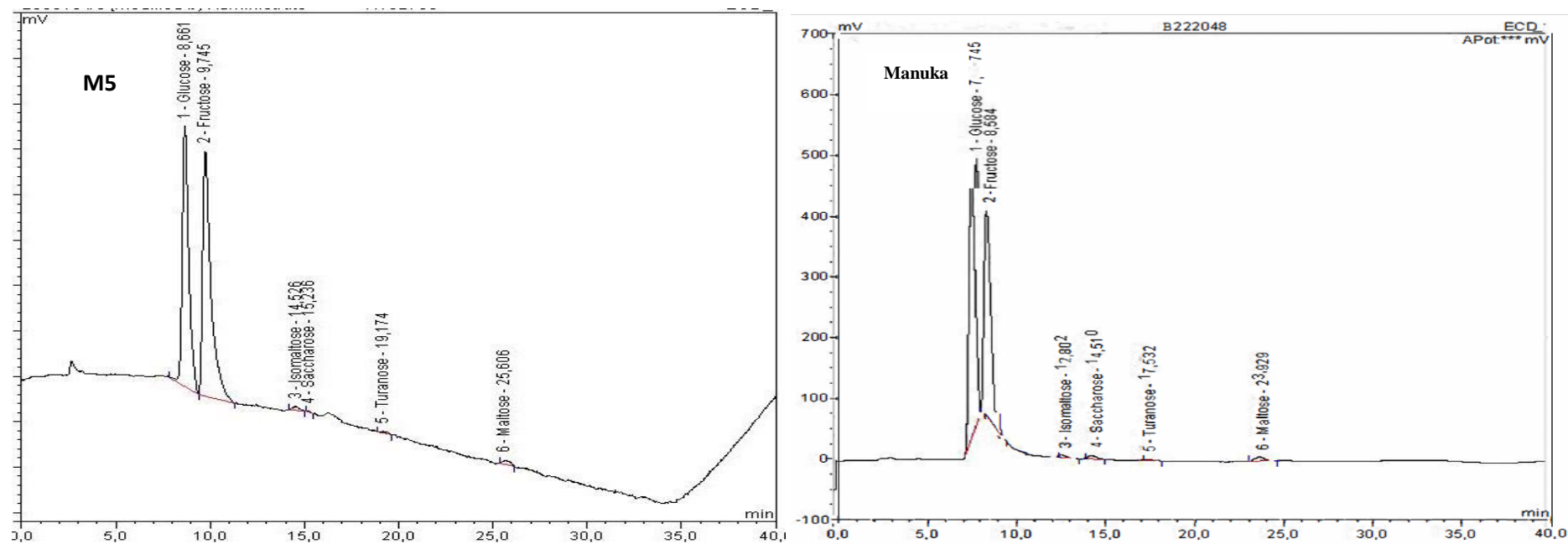


Figure 40: Profils chromatographiques HPAE-PAD des sucres dans les échantillons de miel (M3, M4)



**Figure 41:** Profils chromatographiques HPAEC-PAD des sucres dans l'échantillons de miel M5 et miel de Manuka

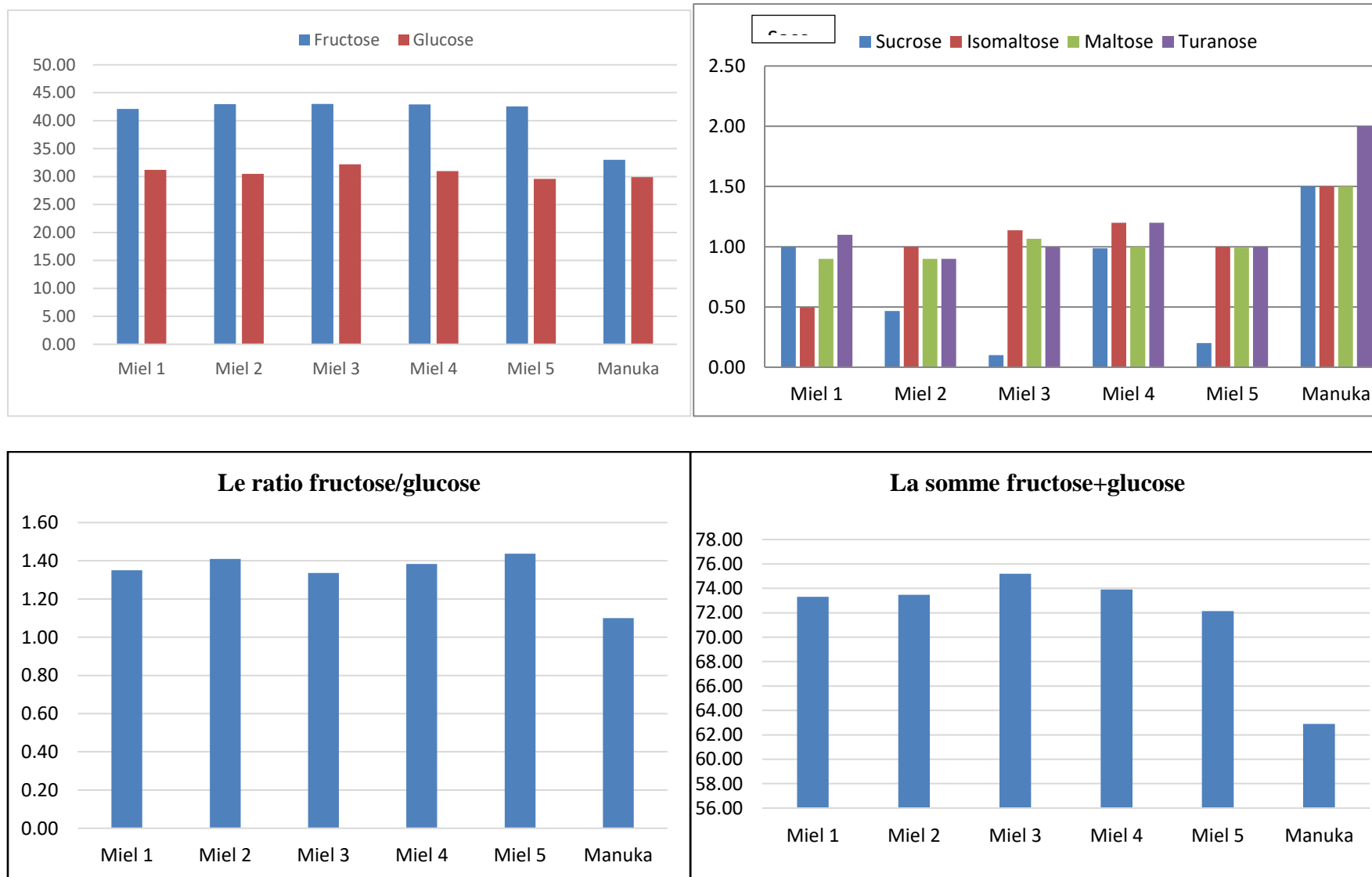


Figure 42 : Résultats du profil glucidique des échantillons de miel identifié par HPLC (HPAEC-PAD).

Le fructose est quantitativement le principal sucre du miel. Cependant, sa teneur est plus élevée dans certains types de miel que dans d'autres, et elle dépend de la source botanique, précisément de sa richesse en fructose dans le nectar. Ce sucre majeur est quantitativement très important dans le miel suivi par le glucose, le turanose, l'isomaltose, le maltose et enfin le saccharose. Selon White (1962), la teneur en fructose du miel varie entre 27,25 % et 44,26 %, avec une moyenne de 28,19 % (White, 1962). Les résultats de la teneur en fructose des échantillons étudiés varient de 33 à 43,97% avec une moyenne de 41,2% sont proches de la fourchette de valeurs de White, 1962.

Les valeurs de glucose varient entre 29,60% et 32,20% avec une moyenne de 30,73%. Les teneurs en glucose des échantillons étudiés sont semblables à ceux rapportés par Haouam *et al.*, 2016, Benaziza-Bouchema et Schweitzer (2010) mais d'autres auteurs ont trouvé des valeurs différentes Zerrouk *et al* (2018) Haderbache *et al* (2013) et Ouchemoukh *et al* (2010) Il est clair que la teneur en fructose est plus élevée dans certains miels que dans d'autres, cela dépend de la source botanique et plus précisément de la richesse en fructose de son nectar.

La qualité des échantillons de miel est confirmée par le fait que la teneur en glucose est inférieure à celle du fructose dans tous les échantillons algériens, ce qui prouve également que les abeilles algériennes sont nourries naturellement. De plus, les résultats retrouvés correspondent à ceux précédemment rapportés par plusieurs auteurs (Baloš *et al.*, 2020; Haouam *et al.*, 2016; Haderbache *et al.*, 2013).

Selon la norme internationale du Codex pour le miel, la teneur en saccharose ne doit pas dépasser 5 % (Codex Alimentarius, 2001). Cette recherche a montré une très faible teneur en saccharose, entre moins de 0,1% jusqu'à 1,5%. La plus faible teneur en saccharose a été détectée dans le miel M4 et la plus élevée par le Manuka. La teneur en saccharose est réduite par l'action de l'enzyme invertase, ce qui se produit lorsque le miel est en phase de maturation dans les rayons des cellules, alors que sa récolte avant la maturation conduit à des niveaux élevés de saccharose (Belay *et al.*, 2017 ; Bogdanov *et al.*, 1996).

Selon Molan, la composition de la sécrétion végétale affecte la proportion (F/G)(Molan, 1996). Les résultats varient entre 1,1% et 1,46 % , si ce rapport dépasse 1,5% le miel se présente sous une forme liquide. Cette proportion correspond à celles trouvées par plusieurs auteurs (Zerrouk *et al.*, 2018; Haouam *et al.*, 2016; Draiaia *et al.*, 2015).

Outre le rapport F/G, la somme F+G joue un rôle important dans la qualité du miel, il s'agit de l'indice de réduction des sucres, qui est un indicateur de la qualité du miel. Par ailleurs, la

somme du fructose (F) et du glucose (G) correspondant au taux du sucre réducteur est très important pour évaluer la qualité du miel. Le miel M3 représente la valeur la plus élevée de sucres réducteurs (75,2%), tandis que le miel de Manuka a montré les valeurs les plus faibles (62,9%). Selon la norme du codex pour le miel, la valeur minimale est fixée à 60% au moins (figure 42).

Les valeurs de fructose et de glucose dans tous les échantillons de miel sont dominantes, et aucune valeur maximale n'a été fixée pour ces deux sucres ; inversement, la valeur minimale totale est fixée à 60 g/100 g au moins (White et Doner 1980; Codex Alimentarius, 2001). Tous les échantillons ont fourni des valeurs en sucres réducteurs qui correspondent aux valeurs acceptées par le Codex Alimentation (figure 42).

Parmi les disaccharides, le saccharose est un facteur crucial dans la détection de la qualité du miel. Selon les réglementations internationales, la teneur en saccharose ne doit pas dépasser 5 g/100 g (Codex Alimentations, 2001 ). La teneur en saccharose dans tous les échantillons est bien en dessous de cette valeur limite. Les résultats des échantillons étaient proche à celle de plusieurs auteurs (Haouam *et al.*, 2016; Haderbache *et al.*, 2013; Benaziza-Bouchema et Schweitzer, 2010; Ouchemoukh *et al.*, 2010). La teneur en saccharose est réduite par l'action de l'enzyme invertase, ce qui se produit lorsque le miel est en phase de maturation dans les alvéoles, tandis que sa récolte avant maturation conduit à des niveaux élevés de saccharose (Belay *et al.*, 2017; Bogdanov, 1997).

Le turanose est le principal disaccharide présent dans tous les échantillons. Sa teneur varie de 0,90% à 2 %. Les teneurs en turanose sont similaires à celles publiés auparavant par Ouchemoukh *et al* (2010) Haouam *et al* (2016), certaines valeurs sont inférieures à celles rapportées par Zerrouk *et al* (2018).

La quantification du maltose a donné des résultats bien inférieurs aux rapports des miels de Haouam *et al* (2016) et Ouchemoukh *et al* (2010). Le miel M3 contient moins de maltose que les miels étudiés par Zerrouk *et al.*(2018) et Ouchemoukh *et al.* (2010) ; d'autre part, le miel d'Ouchemoukh *et al.* (2010) a révélé un niveau de maltose plus élevé que notre teneur en turanose.

Les rapports sur la concentration d'isomaltose dans le miel algérien sont rares, Ouchemoukh *et al.* (2010) ont quantifié ce sucre dans divers échantillons, dans le miel de M1 nous avons trouvé des résultats très similaires, cependant dans chacun des miels de M2, M4 et M5 une

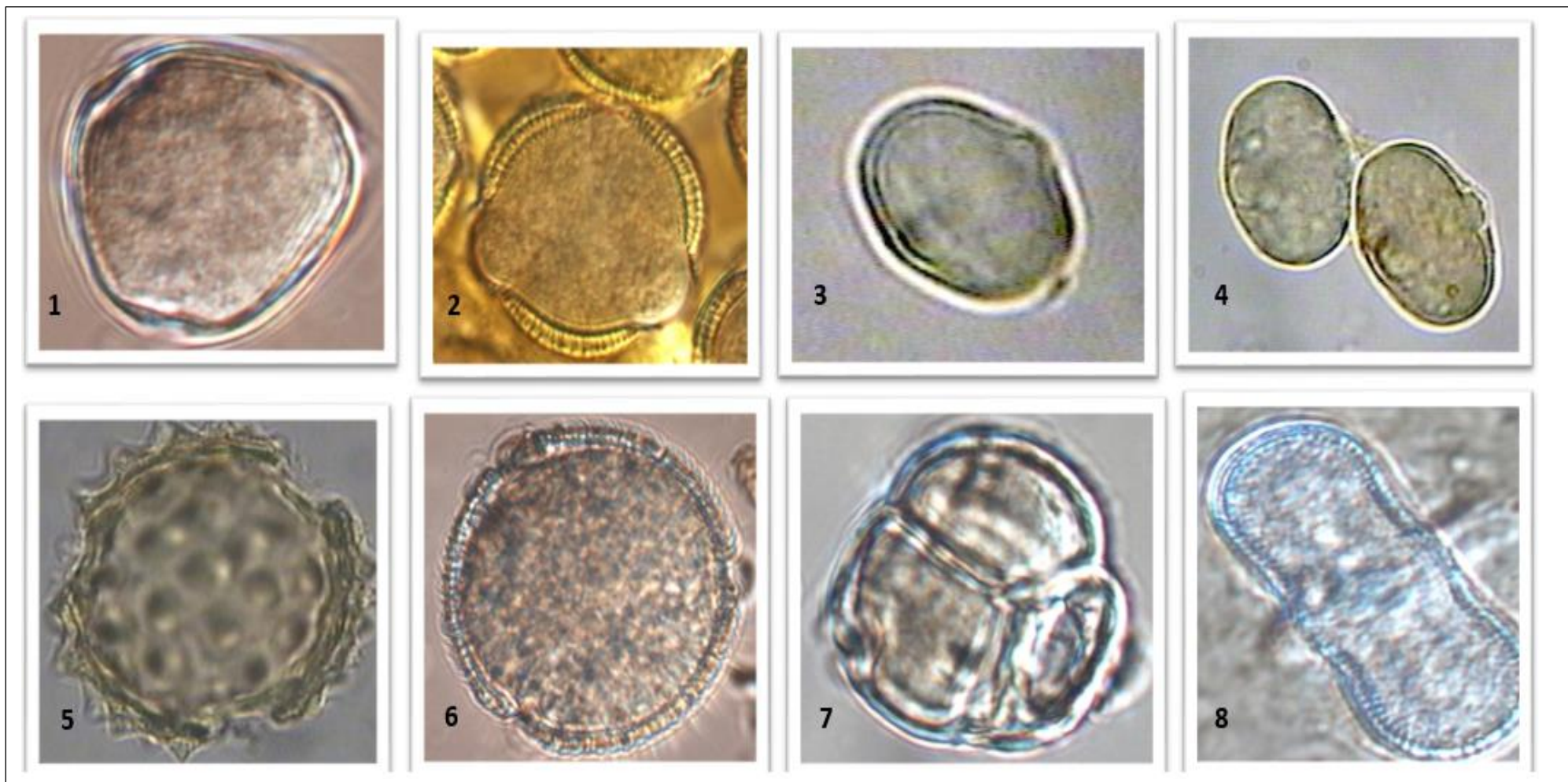
concentration plus élevée de turanose a été trouvée par rapport à la découverte d'Ouchemoukh et al (2010).

#### 4. Résultats de l'étude palynologique

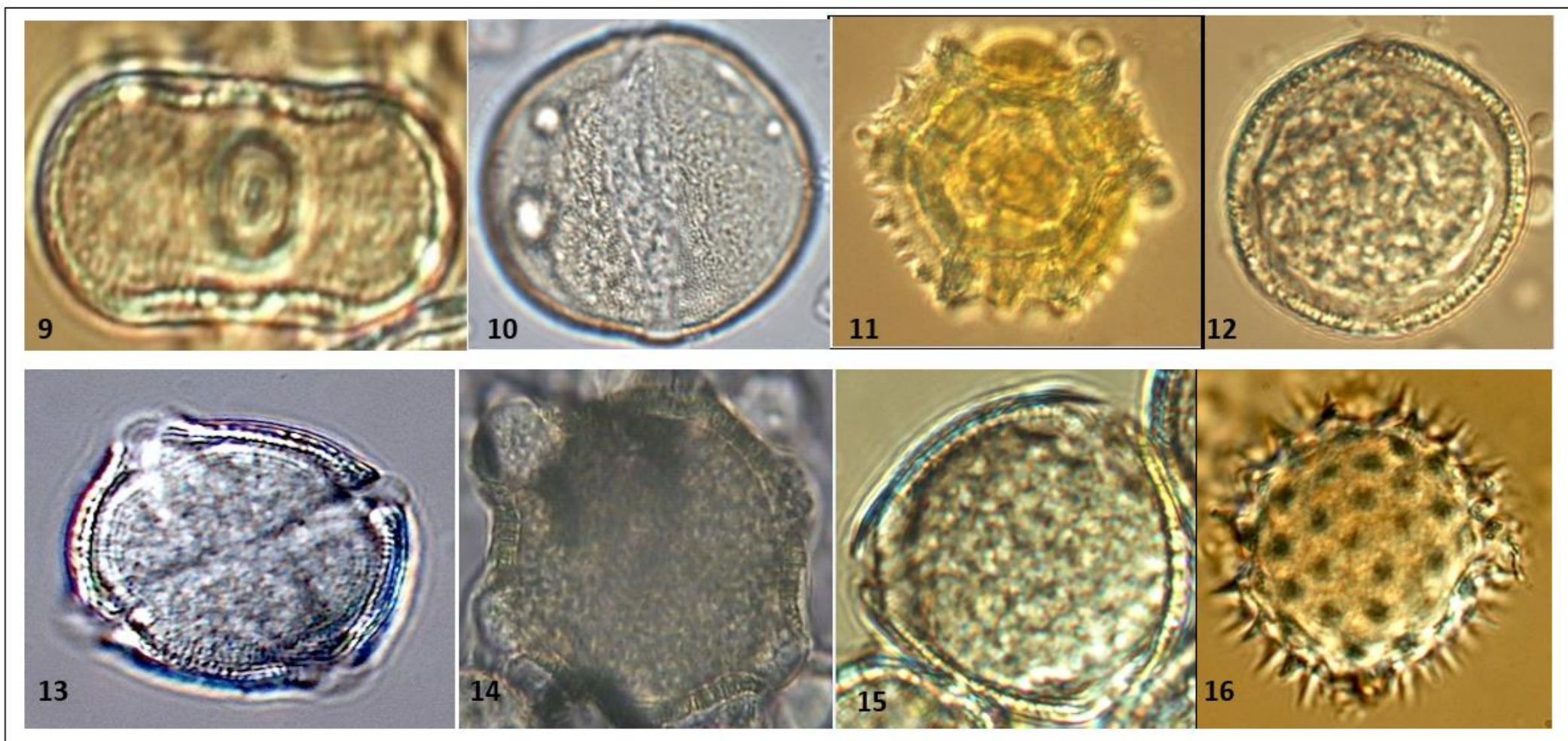
Les résultats de la détermination de la composition en miel sont regroupés sur le tableau 08.

**Tableau 08** : Les types de pollen présent dans les miels testés (%) (palynologie qualitative)

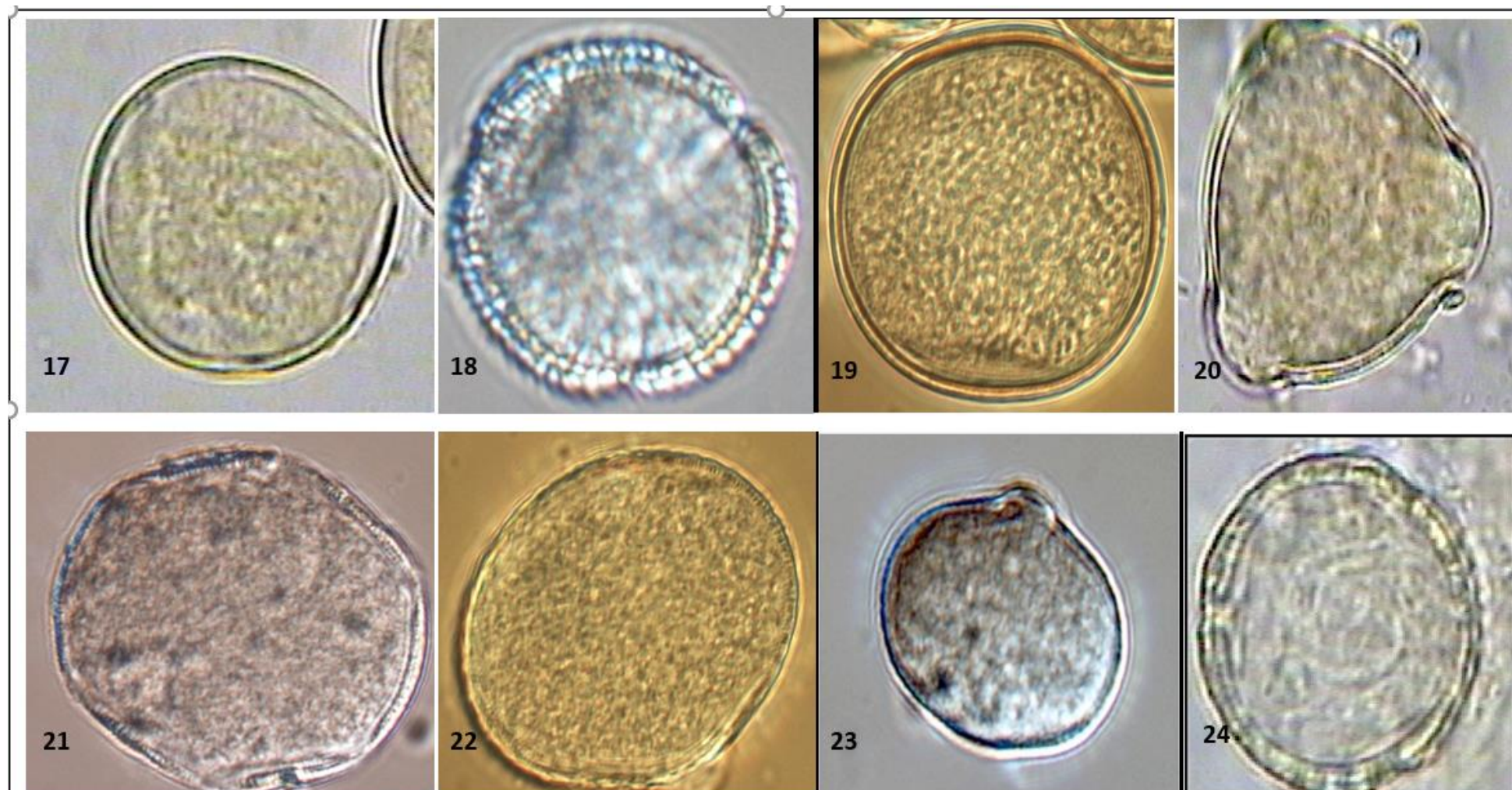
Echantillon	Pollens dominants (≥ 45 %)	%	Pollens d'accompagnements (≥ 16 % and < 45 %)	%	Pollen Minoritaires (≥ 3 % et < 16 %)	%	Pollen très minoritaire (< 3 %)	Pollens anémophiles ou de plantes réputées non nectarifères (% en pollens totaux)	%
M1	<i>Hedysarum coronarium</i>	49	<i>Brassica napus</i>	25	<i>Lotus sp</i>	4	<i>Stachys type, buxus sempervirens, ranunculaceae, brassicaceae, prunus dulcis, genista type, eucalyptus sp, medicago sativa, fabaceae, rosmarinus officinalis, asphodelus sp, asteraceae, myrthaceae, carduus type, forms avorteas.</i>	<i>Cistus sp</i>	18
M2	0	/	<i>Rhamnaceae</i> <i>Apiacea</i>	29 18	<i>Helianthus sp,</i> <i>myrthaceae,</i> <i>brassicaceae,</i> <i>ceratonia</i> <i>siliqua,</i> <i>genista type</i>	11 7 4 4 4	<i>Carduus type, heder helix, convolvulaceae, chrozophora tinctoria, prunus/pyrus, erica arborea, asteraceae liguliflore, trifolium sp, solidago type,</i>	<i>Olea europaus</i> <i>cistus sp poaceae</i>	13 11 4
M3	<i>Ziziphus sp</i>	51	<i>Brassica sp</i>	33	<i>Erica arborea</i> <i>carduus type</i> <i>lotus sp</i>	4 3 3	<i>Xanthium sp, asteraceae liguliflore, apiaceae, trifolium sp, prunus/pyrus, arctium type</i>	<i>Cistus sp</i>	3
M4	<i>Apiaceae type coriandrum</i>	91	0	/	<i>Brassica sp</i>	4	<i>Erica arborea, rubus type, prunus/pyrus, formes avorteas</i>	0	/
M5	<i>Apiaceae</i>	47	<i>Ziziphus sp</i>	40	0	/	<i>Trifolium sp, arctium type, Trigonella sp, rubus sp, brassica sp, asteraceae, dipsacaceae, centaurea sp, fabaceae,</i>	<i>Olea europaeus</i> <i>Cistus sp</i>	5 /
Manuka	<i>Leptospermum scoparium</i>	94	0		<i>Trifolium sp</i>	5	<i>Knightsia excelsa, lamiaceae, eucalyptus sp, asteraceae liguliflore, apiaceae, mentha sp, brassicaceae, carduus type, prunus/ pyrus</i>	<i>Plantago sp</i> <i>poaceae</i>	



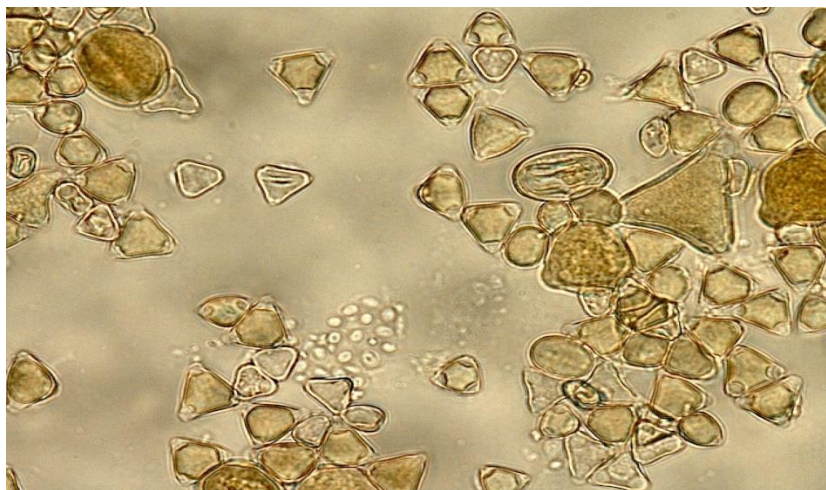
**Figure 43-a** : Photographies en microscopie optique de quelques grains de pollen observés dans des échantillons de miel (X1000). 1 : *Ziziphus sp*, 2 : *Brassica napus*, 3 : *Lotus sp*, 4 : *Hedysarum coronarium*, 5 : *Type Carduus*, 6 : *Cistus sp*, 7 : *Erica arborea*, 8 : *Type Apiaceae Coriandrum*



**Figure 43-b :** Photographies en microscopie optique de quelques grains de pollen observés dans des échantillons de miel (X1000). 9 : Apiaceae, 10 : *Asphodelus sp*, 11 : *Asteraceae liguliflore*, 12 : *Buxus sempervirens*, 13 : *Ceratonia siliqua*, 14 : *Chrozophora tinctoria*, 15 : *Hedera helix*, 16 : *Helianthus sp*.



**Figure 43-c :** Photographies en microscopie optique de quelques grains de pollen observés dans des échantillons de miel (X1000). 17: *Medicago sativa*, 18 : *Olea europæus*,19 : Poaceæ 20 : *Prunus dulcis*, 21 : *Rosmarinus officinalis*, 22 : *Trifolium sp*, 23 : *Trigonella sp*, 24 : *Xanthium sp*.



**Figure 44:** Observation microscopique des pollens du Miel de Manuka (X100)

L'analyse du miel M1 montre que le pollen dominant est *Hedysarum coronarium* (49 %). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Ouchemoukh *et al.* (2007) (tableau 08).

L'analyse du miel M5 et M4 montre que le pollen dominant est celui de la famille des Apiaceae (47 %) et (type *Coriandrum*) (91 %) respectivement. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par Zerrouk *et al.* (2017).

Le pollen d'Apiaceae (18%) accompagne le pollen de Rhamnaceae à 29% dans le miel M2. Cet échantillon ne contient pas de pollens dominants, mais la famille des Apiaceae est détectée comme pollen d'accompagnement. L'échantillon M4 ne contient pas de pollens secondaires. Quelques pollens isolés existent dans tous les échantillons de miel. Les différents types de pollens de la famille des Brassicaceae enregistrent un pourcentage de 25 % et 33 % en tant que pollen d'accompagnement dans les échantillons M1 et M3, respectivement ; ils étaient des pollens mineurs avec un pourcentage de 4 % dans les échantillons M2 et M4. Une grande variété de pollens mineurs caractérise les échantillons de miel M2 et M3 ; *Helianthus sp* 11%, Myrtaceae 7% et 4% pour *Ceratonia siliqua*, et type genista pour le miel M2, tandis que le miel M3 a *Erica arborea* 4%, type *Carduus* 3%, *lotus sp* 3%. *Lotus sp* est également présent en tant que pollen mineur avec le même pourcentage (3%) dans l'échantillon M1, tandis que M5 ne contient pas de pollens mineurs (figures 43).

Les pollens d'arbres fruitiers (*Prunus/Pyrus*) existent dans un très faible pourcentage dans tous les échantillons de miel, à l'exception du miel M5 d'El bayadh (zone saharienne). Ces arbres existent à l'état sauvage ou sont cultivés pour leurs fruits ou leur valeur ornementale.

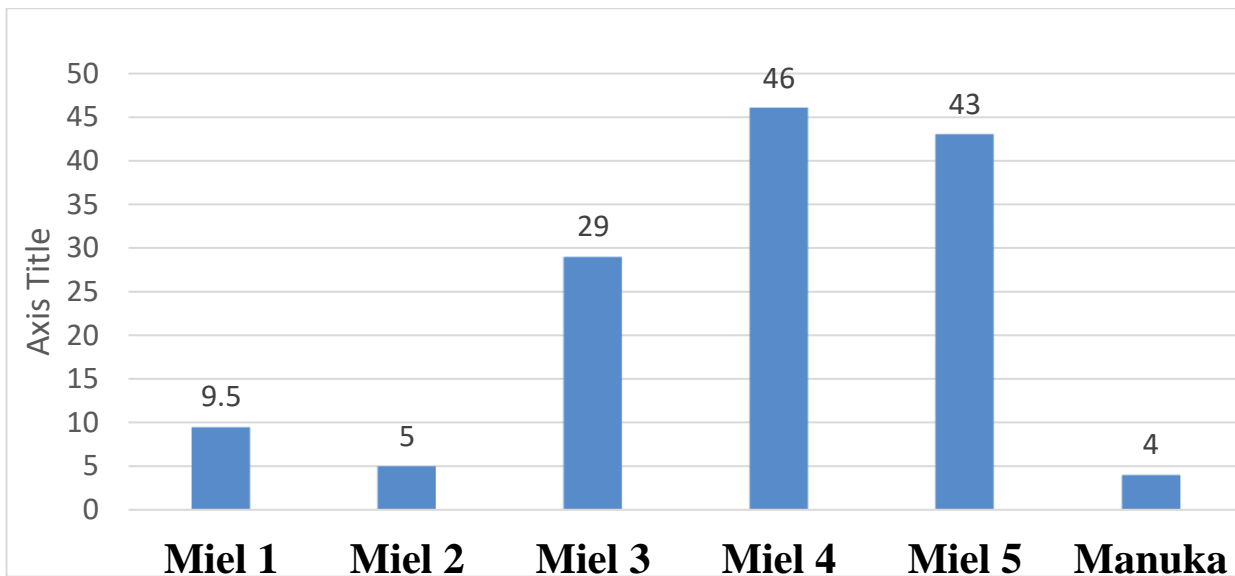
Les pollens anémophiles ou pollens de plantes sont considérés comme non-nectarifères. Ils sont présents dans tous les échantillons de miel sauf le M4. Les pollens les plus détectés sont les pollens de *Cistus sp*, puis d'*Olea Europaea* (M3, M5). Makhloufi *et al.* (2007) ont trouvé la présence de ces genres dans le miel algérien. Cependant, le pollen de la famille des Poaceae a été détecté uniquement dans l'échantillon M3.

L'analyse du miel de Manuka montre que le pollen dominant est celui de l'espèce *Leptospermum scoparium* (94%) et le pollen minoritaire de l'espèce *Trifolium sp* (5%) (figure 44).

Dans ce travail, la méthode méliissopalynologique a confirmé l'identité des sources de miel. Deux échantillons de miel peuvent être classés comme monofloraux (M1 : *Hedysarum coronarium*, M3 : *Ziziphus sp*), tandis que les trois autres sont des miels multifloraux (M2, M4, M5) et confirmer également que le Miel de Manuka est Monoflorale et provient réellement de l'espèce *Leptospermum scoparium* ce qui est en accord avec la bibliographie (Moar, 1985).

## 5- Evaluation de l'activité GOx

Les résultats de l'activité glucose oxydase sont portés sur la figure 45.



**Figure 45 :** Histogramme illustrant la répartition des niveaux de glucose oxydase relevés dans les échantillons de miel analysés et celui du Manuka.

Les données fournies montrent les niveaux de glucose oxydase dans différents types de miel. Cette enzyme a des propriétés antibactériennes et antioxydantes, ce qui en fait un composant important du miel. En analysant les résultats, on peut noter les variations significatives des niveaux de glucose oxydase entre les différents échantillons de miel :

Dans le miel 1, une quantité relativement élevée de glucose oxydase (9.5) est présente, ce qui suggère une activité enzymatique considérée comme supérieure. En revanche, le miel 2 affiche un niveau modéré de glucose oxydase (5), ce qui traduit une activité enzymatique moins intense en comparaison avec le miel 1 (figure 45).

En poursuivant l'analyse, le miel 3 se distingue avec un niveau élevé de glucose oxydase (29), indiquant une activité enzymatique considérablement plus élevée que celle observée dans les deux premiers miels. Le miel 4, quant à lui, présente un niveau encore plus élevé de glucose oxydase (46), témoignant d'une activité enzymatique particulièrement prononcée. Des constatations similaires sont faites pour le miel 5, qui révèle également un niveau élevé de glucose oxydase (43), suggérant ainsi une activité enzymatique marquée.

En contraste, le miel Manuka affiche une quantité relativement basse de glucose oxydase (4), ce qui suggère une activité enzymatique moins marquée que dans les autres miels évalués. Ces variations

significatives dans les niveaux de glucose oxydase reflètent les différences d'activité enzymatique potentielle dans les différents types de miel.

Ces variations dans les niveaux de glucose oxydase peuvent être influencées par plusieurs facteurs, tels que la source florale du miel, les conditions environnementales, les méthodes de récolte et de traitement du miel, ainsi que le type de miel.

### 6. Profil d'Antibiorésistance

#### 6.1. Résistance des souches de *S.aureus* aux antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme des 26 souches de *S.aureus* en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé, ont révélé des niveaux de résistances très élevés aux différentes familles d'antibiotique testées, particulièrement aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides (Figure 46-48).

Au milieu du vingtième siècle, l'introduction des antibiotiques a révolutionné le traitement des infections bactériennes, y compris celles causées par *S. aureus*. Des antibiotiques tels que la pénicilline et la méthicilline ont été largement utilisés avec succès pour traiter les infections à *S. aureus*. Dans les années 1940, peu après l'introduction de la pénicilline, des souches de *S. aureus* résistantes à cet antibiotique ont commencé à apparaître. La résistance à la pénicilline est principalement due à la production d'une enzyme, la bêtalactamase (Pénicillinase), qui dégrade l'antibiotique et le rend inefficace (Amenu, 2014).

Toutes les souches de cette étude sont résistantes à la pénicilline, on note aussi des niveaux de résistances très élevés vis-à-vis des autres  $\beta$ -lactamines avec un taux de 76% vis-à-vis de l'oxacilline et 68% vis-à-vis de la céfoxitine.

Les souches ont montré une résistance très importante pour les aminosides, traduisant un taux de résistance de 89 % pour la kanamycine et la gentamycine suivi par un taux de 73. % pour l'amikacine.

#### 6.2. Détection de *S.aureus* méthicillino-résistant

Au début des années 1960, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) sont apparues, posant un défi majeur au traitement des infections à *S.aureus*. Le SARM se caractérise par la production de la protéine PBP2a, qui a une faible affinité pour les antibiotiques *bêta-lactamines*, y compris la méthicilline (Harkins *et al.*, 2017).

La recherche phénotypique des souches SARM par la méthode de diffusion du disque d'oxacilline (1 $\mu$ g) a montré que parmi les souches de *S.aureus* sélectionnées, 42% des souches ont présenté des

zones d'inhibitions autour du disque d'oxacilline inférieur à 10 mm, ce qui indique leur résistances à la méthicilline.

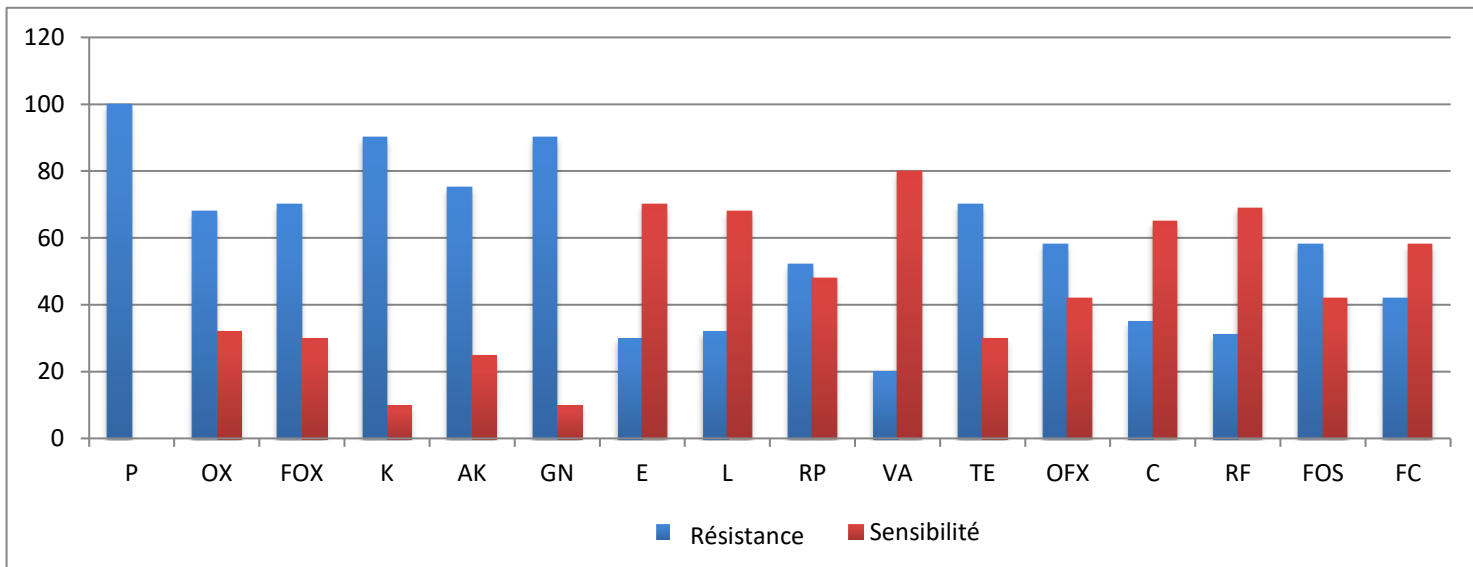


Figure 46 : Profil de résistance des souches *S.aureus* aux antibiotiques cliniques.

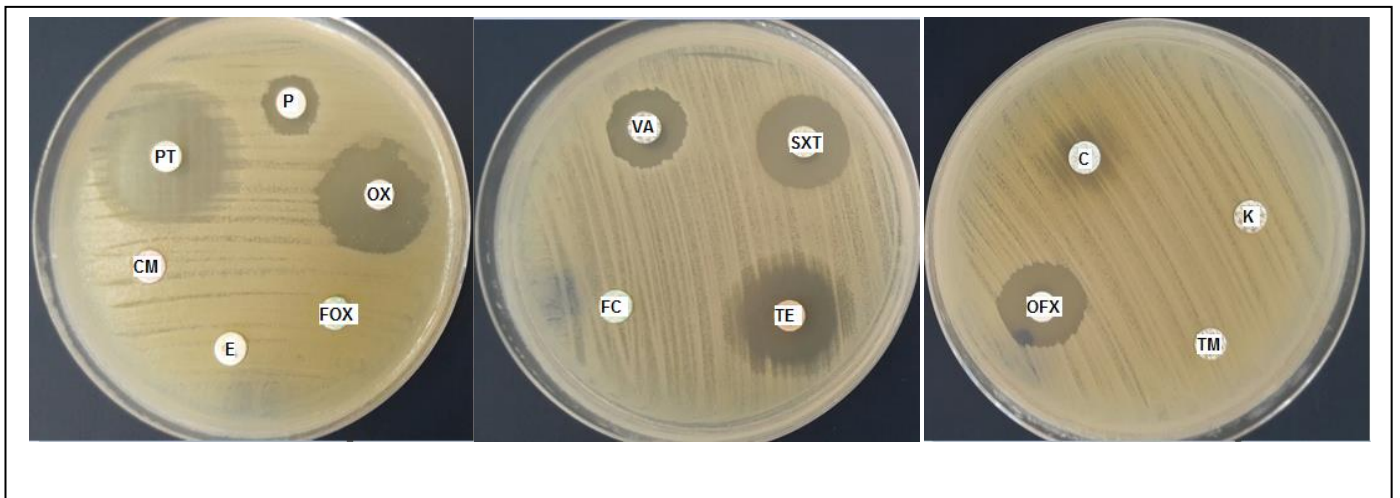


Figure 47 : Activité des antibiotiques sur les souches de *Staphylococcus.aureus*

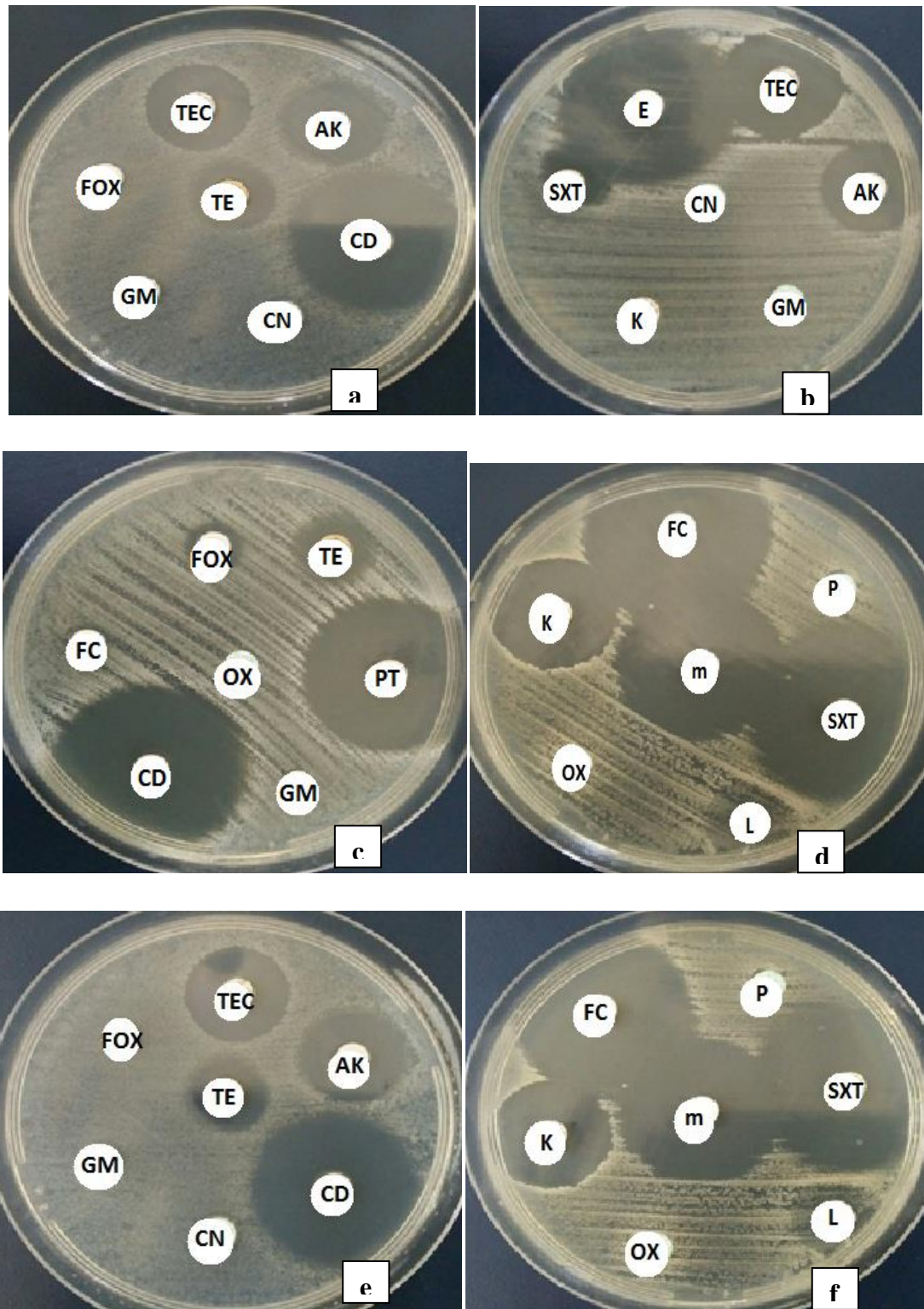


Figure 48 : Antibiogramme des souches de *S.aureus* ; a : *S.aureus* n°3 ; b : *S.aureus* n° 4 ;

c : *S.aureus* n°5 ; d : *S.aureus* n°7 ; e : *S.aureus* n°8 ; f : *S.aureus* n°11

La dissémination de la résistance : La résistance aux antibiotiques de *S. aureus*, en particulier du SARM, s'est rapidement répandue dans les hôpitaux et les établissements de soins de santé du monde entier. Cette propagation a été facilitée par des facteurs tels que la transmission nosocomiale, l'utilisation excessive ou inappropriée d'antibiotiques et la capacité de *S. aureus* à développer et à transférer des gènes de résistance (Rahmani et Meradi, 2023).

On note une résistance assez élevée vis-à-vis de la pristinamycine (43%) vis-à-vis de l'érythromycine (31%) et un taux de 21% pour la lincomycine. La résistance à la tétracycline a été remarquée chez 68% des souches.

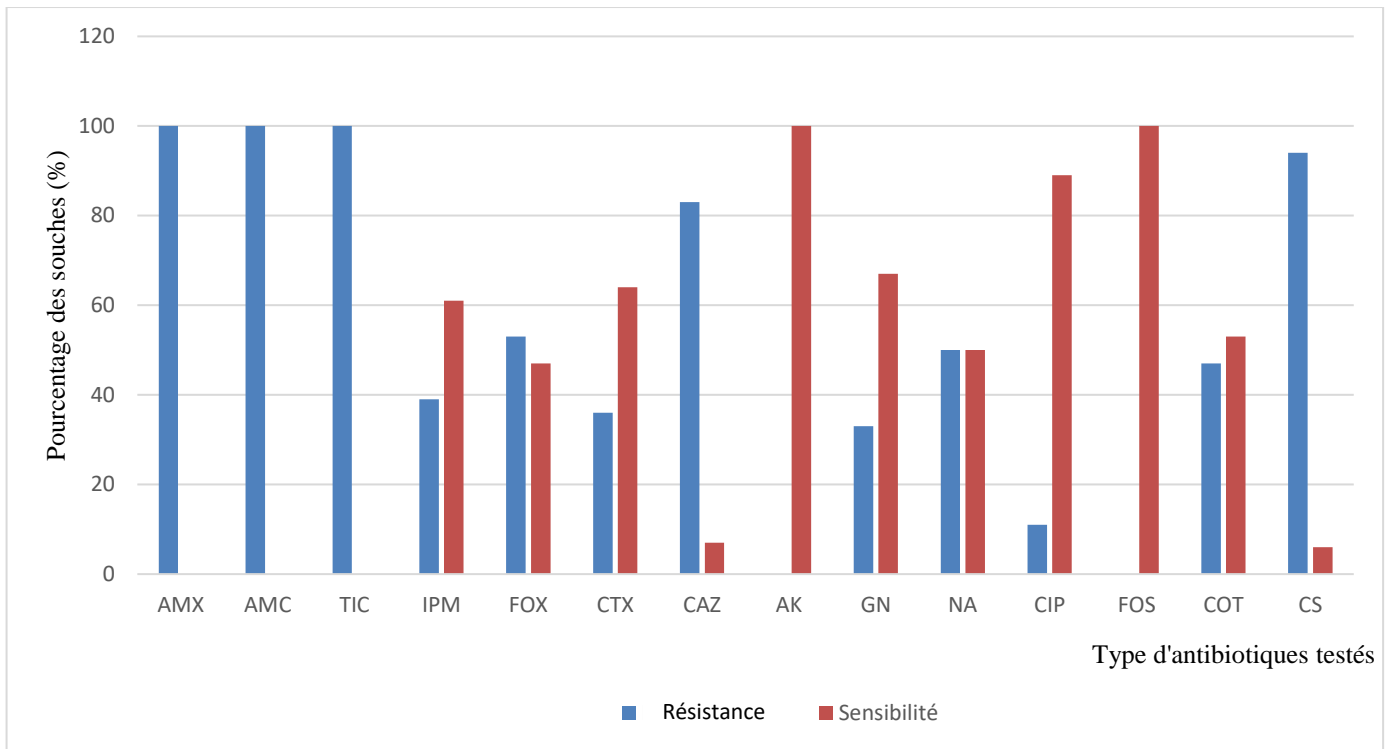
Des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (VRSA) ont également été identifiées. Cette résistance est souvent associée à l'acquisition de gènes de résistance provenant d'autres espèces bactériennes, telles que *Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium*, qui sont résistantes à la vancomycine (Adoui et Lahouel, 2019). 15% des souches isolées ont montré une résistance vis-à-vis de la vancomycine.

La résistance à l'ofloxacine et à la fosfomycine était également importante avec un taux égal à 58%. De même la rifampicine et le chloramphénicol, elles ont présenté respectivement des pourcentages de résistance de 21% et 26%.

L'émergence de nouveaux antibiotiques : En réponse à la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques existants, de nouveaux antibiotiques ont été développés, tels que le linézolide, la daptomycine et la ceftaroline. Toutefois, au fil du temps, des cas de résistance de *S. aureus* à ces nouveaux antibiotiques ont également été signalés (CÔTÉ, 2019).

L'évolution de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques cliniques souligne la nécessité d'une utilisation prudente des antibiotiques, des mesures de contrôle des infections, des stratégies de prévention et du développement continu de nouveaux agents antimicrobiens pour lutter contre cette bactérie pathogène.

### 6.3 Résistance des souches Gram négative aux antibiotiques



**Figure 49 :** Profil de résistance des souches d’*E.coli* aux antibiotiques cliniques

La résistance des *Escherichia coli* (*E.coli*) aux antibiotiques est un problème de santé publique important et complexe. Les bactéries *E. coli* sont normalement présentes dans le tractus intestinal des humains mais certaines souches peuvent causer des infections, notamment des infections urinaires, des infections gastro-intestinales et des infections généralisées potentiellement mortelles (Vaillancourt, 2015).

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques des 26 souches d’*E.coli* sont illustrés dans l’histogramme (Figure 49).

La résistance aux antibiotiques chez *E. coli* et d'autres bactéries peut être due à différents mécanismes. L'un des mécanismes courants est l'acquisition de gènes de résistance par transfert horizontal, où les bactéries peuvent échanger des morceaux d'ADN contenant des gènes de résistance avec d'autres bactéries. Ces gènes de résistance peuvent coder pour des enzymes capables de dégrader les antibiotiques, de modifier la cible de l'antibiotique ou de pomper l'antibiotique hors de la cellule bactérienne (Colomer-Lluch *et al.*, 2011).

Durant cette étude, les *E.coli* ont montré un taux de résistance très élevé vis-à-vis les 7  $\beta$ -lactamines testées.

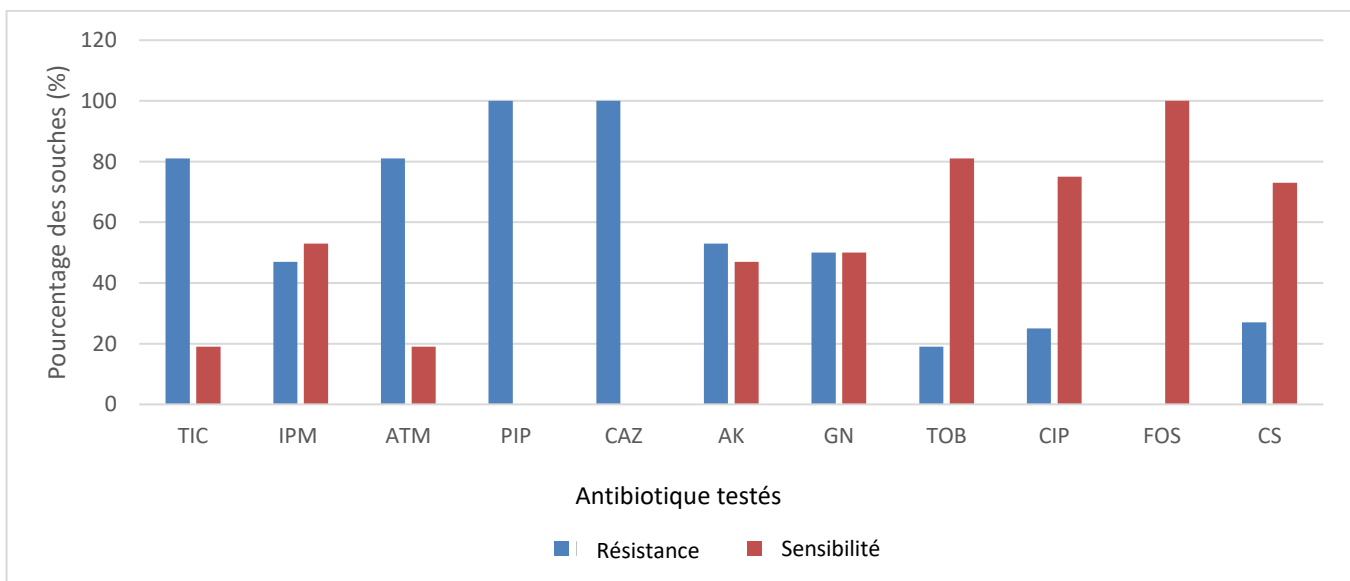
- La résistance à l'amoxicilline, l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique et la ticarcilline a été observée chez 100% des souches.

- La céftazidime et la céfoxitine ont présenté respectivement des taux de résistance de 84% et 53%. Bien que les souches, ont montré une résistance assez élevée exprimant un taux de 38% pour l'imipénème et la céfotaxime.

Concernant les aminosides, on observe une résistance assez marquée pour la gentamicine de 38%, en revanche toutes les souches (100%) étaient sensibles à L'amikacine.

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 12 souches étudiées, on note une résistance de 58% vis-à-vis l'acide nalidixique et un taux de résistance le plus faible a été observé pour la ciprofloxacine (15%).

Pour les autres antibiotiques testés, la fosfomycine s'est montré le plus efficace avec un taux de sensibilité de 100%, suivie du Co-trimoxazole (46%). Concernant la colistine, une activité a été maintenue sur 7% des souches.



**Figure 50 :** Profil de résistance des souches *P.aeruginosa* aux antibiotiques cliniques

*P. aeruginosa* est une bactérie Gram négatif largement répandue dans l'environnement et qui peut causer des infections opportunistes chez les personnes immunodéprimées, les patients hospitalisés et les personnes atteintes de fibrose kystique (Diggle et Whiteley, 2020).

Au fil des années, *P. aeruginosa* a développé une résistance à de nombreux antibiotiques, y compris aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et aux carbapénèmes, qui sont des antibiotiques souvent utilisés pour traiter les infections graves. La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques est un

problème sérieux, car cette bactérie possède une capacité intrinsèque à résister à de nombreux médicaments. En outre, elle a une grande aptitude à développer de nouvelles résistances par l'acquisition de gènes de résistance. Cette résistance est souvent liée à l'utilisation répétée de ces antibiotiques dans les hôpitaux, où *P. aeruginosa* peut acquérir de nouveaux gènes de résistance par transfert horizontal (Reygaert, 2018).

Les résultats du test de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux 11 antibiotiques choisis sont présentés dans la figure 50.

La totalité des souches sélectionnées ont montré une résistance à la pipéracilline et la céftazidime.

Un taux de résistance très élevé (80%) a été observé vis-à-vis l'aztréonam et la ticarcilline et un pourcentage de 40% vis-à-vis de l'imipénème.

Les aminosides, La tobramycine s'est montré le plus efficace avec un taux de sensibilité de 80%, suivie de la gentamicine et l'amikacine (60%).

La résistance à la ciprofloxacine a été observée chez 20% des souches testées. Une résistance assez remarquée vis-à-vis la colistine avec un taux de 20%. En revanche, aucune souche n'a été résistante à la fosfomycine.

La résistance de *P. aeruginosa* est multifactorielle. Parmi les mécanismes de résistance courants, on trouve la production d'enzymes appelées bêtalactamases qui dégradent les antibiotiques de la classe des bêtalactamines, tels que les pénicillines et les céphalosporines. *P. aeruginosa* peut également développer une résistance par modification de la cible de l'antibiotique, par altération des porines (les canaux qui permettent l'entrée des antibiotiques dans la cellule bactérienne) ou par activation de systèmes d'efflux qui pompent les antibiotiques hors de la cellule (Mancuso *et al.*, 2021).

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème mondial majeur, rendant certaines infections difficiles, voire impossibles à traiter. Les infections à *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S.aureus* résistantes aux antibiotiques peuvent entraîner une augmentation de la morbidité et de la mortalité, des séjours hospitaliers prolongés, des coûts de soins de santé plus élevés et une diminution de l'efficacité des traitements médicaux (Sanders *et al.*, 2011).

Pour faire face à ce problème, il est essentiel de promouvoir l'utilisation rationnelle des antibiotiques en limitant leur utilisation inappropriée et excessive. De plus, la recherche continue dans le développement de nouveaux antibiotiques efficaces contre *P. aeruginosa* et l'amélioration des stratégies de prévention des infections sont nécessaires pour lutter contre la résistance aux antibiotiques de cette bactérie pathogène (Mangin, 2016).

**7. Résultats de l'activité antibactérienne du miel :**

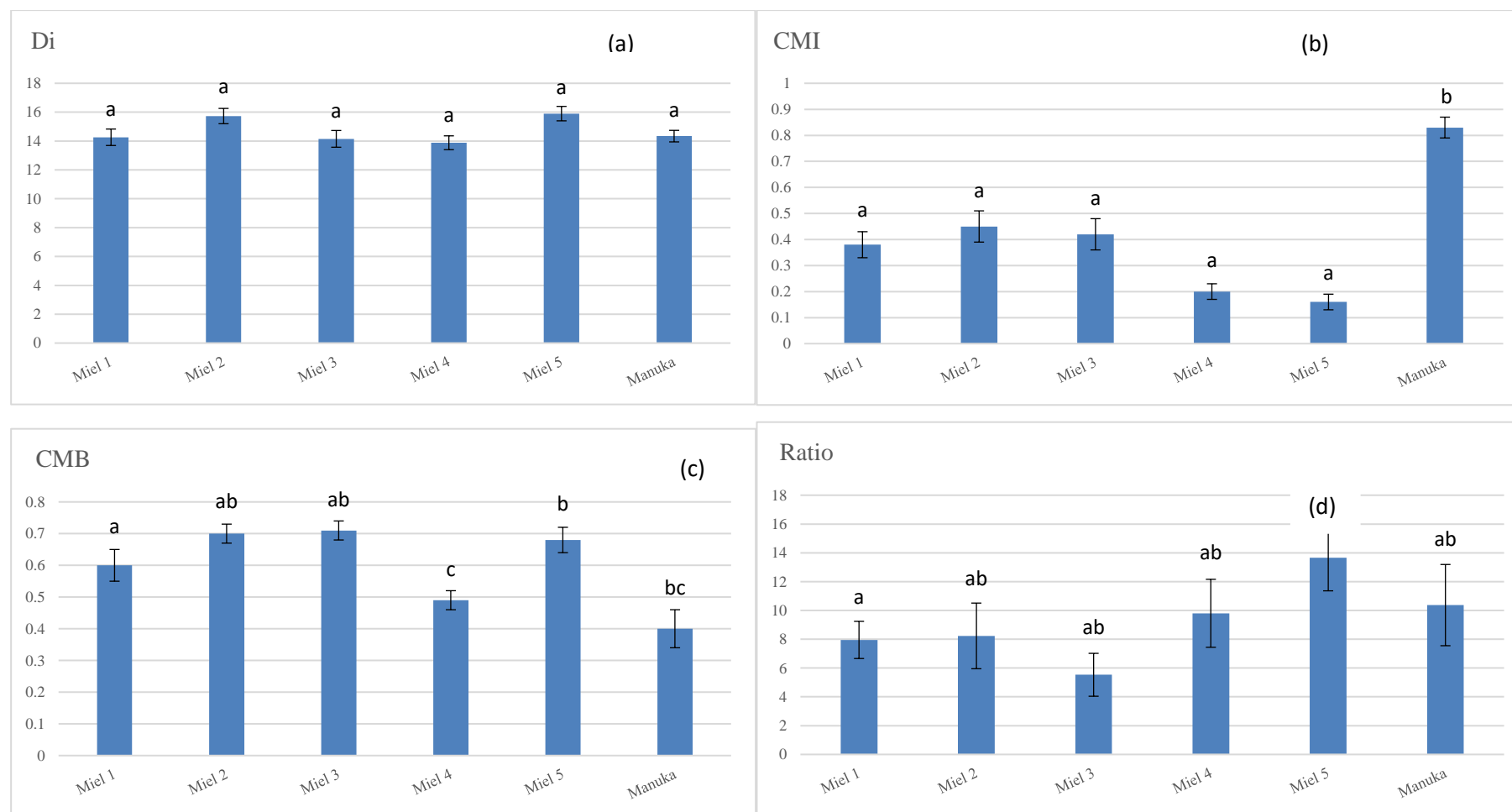
Les résultats des diamètres d'inhibition des échantillons de miel, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) ont été déterminées contre les souches cliniques : *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Les résultats sont présentés dans les figures (51-55).

**Tableau 09 :** Résultats des analyses statistiques de l'activité antibactériennes des échantillons de miels vis-à-vis des souches pathogènes (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*)

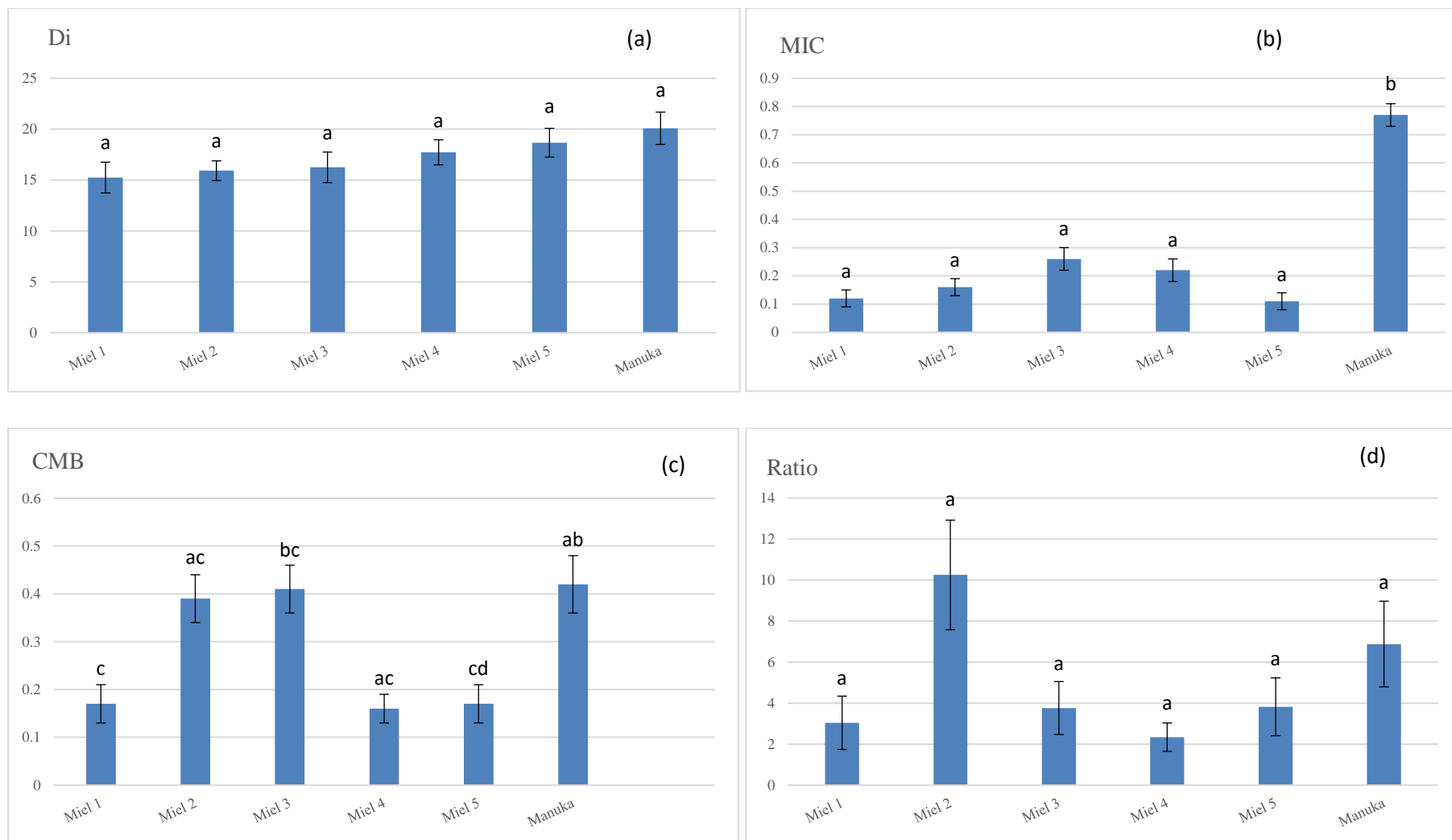
Souche bactérienne	Paramètre	Moyenne ± SE					
		Miel 1	Miel 2	Miel 3	Miel 4	Miel 5	Manuka
<i>E.coli</i>	DI	14.26 ± 0.57 <sup>a</sup>	15.73 ± 0.53 <sup>a</sup>	14.15 ± 0.58 <sup>a</sup>	13.88 ± 0.48 <sup>a</sup>	15.90 ± 0.50 <sup>a</sup>	14.34 ± 0.40 <sup>a</sup>
	CMI	0.38 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>b</sup>
	CMB	0.60 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.06 <sup>bd</sup>
	Ratio	1.57 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.22 <sup>ab</sup>	1.69 ± 0.14 <sup>ab</sup>	2.45 ± 0.23 <sup>ab</sup>	4.25 ± 0.22 <sup>bc</sup>	0.48 ± 0.02 <sup>ab</sup>
<i>P.aeruginosa</i>	DI	15.25 ± 1.51 <sup>a</sup>	15.92 ± 0.97 <sup>a</sup>	16.25 ± 1.50 <sup>a</sup>	17.73 ± 1.23 <sup>a</sup>	18.67 ± 1.41 <sup>a</sup>	20.09 ± 1.59 <sup>a</sup>
	CMI	0.12 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.04 <sup>b</sup>
	CMB	0.17 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.05 <sup>ae</sup>	0.41 ± 0.05 <sup>bc</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>ac</sup>	0.17 ± 0.04 <sup>cd</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>ab</sup>
	Ratio	1.41 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.43 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.02 <sup>a</sup>
<i>S.aureus</i>	DI	21.34 ± 1.53 <sup>a</sup>	19.35 ± 1.34 <sup>a</sup>	20.63 ± 1.70 <sup>a</sup>	21.69 ± 1.64 <sup>a</sup>	24.51 ± 1.69 <sup>a</sup>	22.38 ± 1.73 <sup>a</sup>
	CMI	0.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.05 <sup>b</sup>
	CMB	0.43 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>a</sup>
	Ratio	1.59 ± 0.11 <sup>ac</sup>	2.48 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.35 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.47 ± 0.08 <sup>ca</sup>	2.04 ± 0.07 <sup>ca</sup>	0.29 ± 0.19 <sup>b</sup>

Les moyennes suivies des mêmes lettres dans chaque colonne ne sont pas significativement différentes (test de comparaison par paire de Kruskal-Wallis), P<0,05 ajusté par la correction de Bonferroni pour les tests multiples) DI: diamètre d'inhibition ; Ratio : CMB/CMI

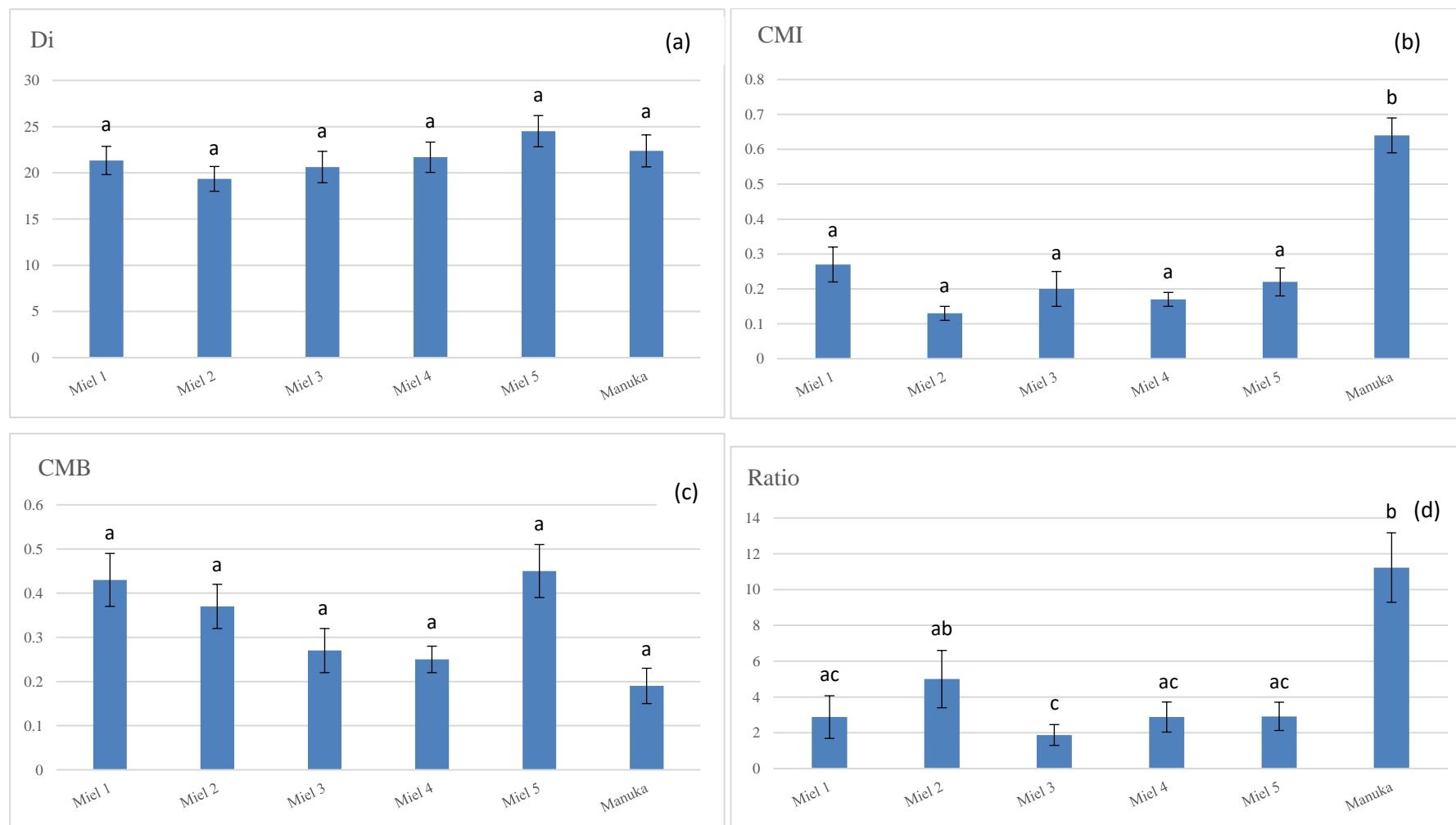
Tous les échantillons de miel ont présenté un bon effet antibactérien contre les bactéries pathogènes (Figure 51-54, Tableau 09). Cependant, *S. aureus* est plus sensible que les bactéries Gram-négatives. En effet, les bactéries Gram-négatives possèdent une enveloppe qui comprend la membrane externe et la membrane cytoplasmique ; la perméabilité de ces deux structures joue un rôle important dans la sensibilité des bactéries. Elle peut moduler la diffusion des substances antibactériennes, et réguler leur expulsion. Les porines de la membrane externe et les pompes d'efflux qui forment des complexes intra- et intermembranaires sont les principaux facteurs impliqués dans les mécanismes médicamenteux (Pagés et Garnotel, 2003). L'analyse statistique a montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre les échantillons de miel. De nombreuses études ont également montré précédemment qu'il n'y a pas de différence significative entre les miels malaisiens (Zainol *et al.*, 2013), les miels d'Australie occidentale (Roshan *et al.*, 2017) et les miels algériens (Bouacha *et al.*, 2018, 2022a). Cependant, d'autres études ont montré qu'il existe des différences significatives entre l'effet antibactérien des échantillons de miel provenant de différentes flores et de différentes régions (Sherlock *et al.*, 2010 ; Alzahrani *et al.*, 2012 ; Abbas, 2014 ; Moghadam et Khaledi, 2021). En effet, la similitude ou la divergence des résultats de l'activité antibactérienne de différents échantillons de miel peut être influencée par plusieurs facteurs, dont certains sont liés à l'abeille comme l'espèce d'abeille, sa région géographique, et les espèces de plantes butinées. D'autres sont liés au miel, comme les conditions de récolte, les conditions de stockage et la teneur en composés actifs, notamment la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes. Ces éléments dépendent fortement de l'origine géographique et botanique des échantillons de miel. La variation des conditions expérimentales et des tests d'évaluation utilisés pour évaluer l'effet antibactérien, ainsi que le niveau de susceptibilité des souches bactériennes, peuvent également conduire à des différences dans les résultats de l'effet antibactérien des miels.



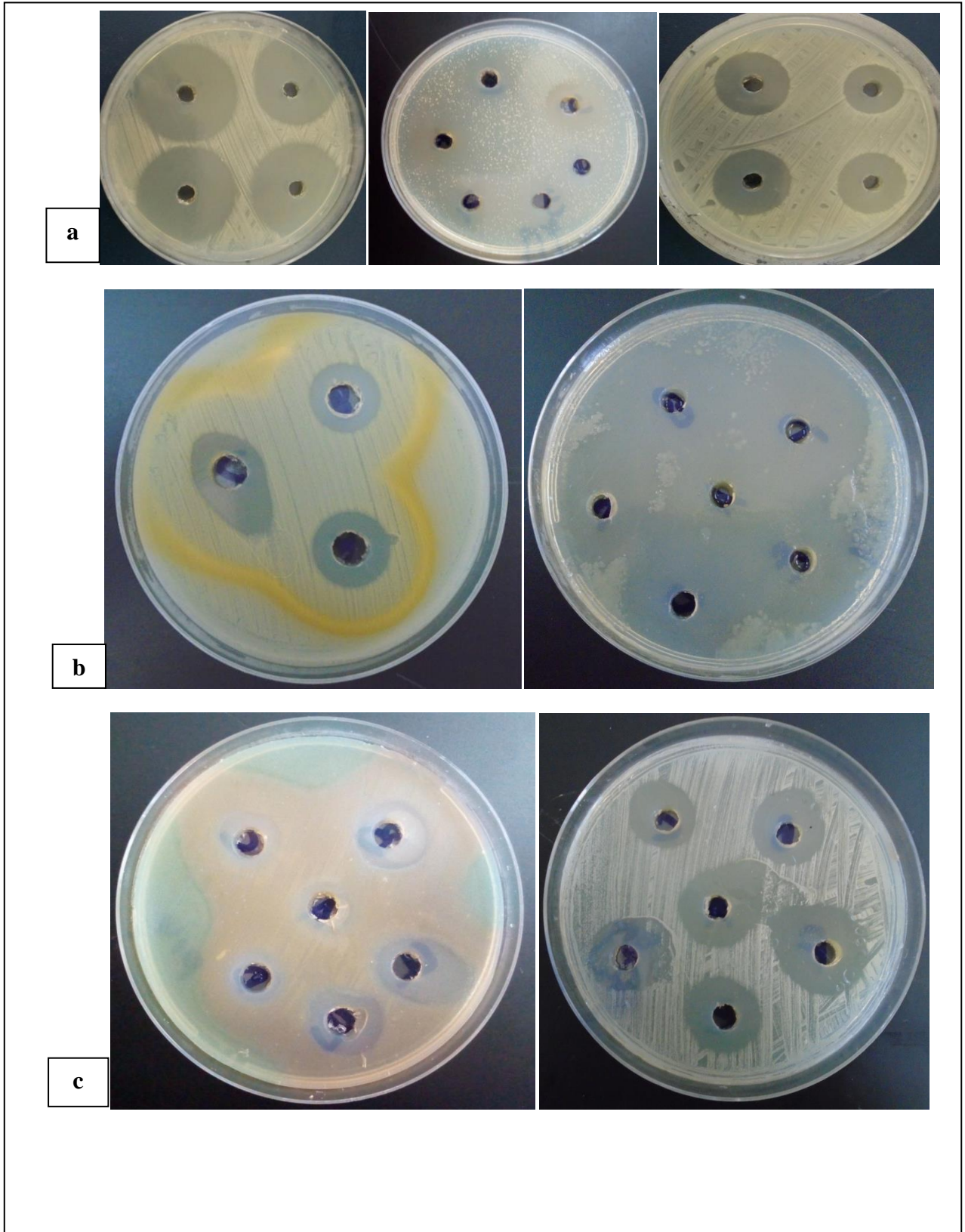
**Figure 51** : (a) Activité antibactérienne (zone d'inhibition en mm) des échantillons de miel multifloral contre *Escherichia.coli*, évaluée par la méthode de diffusion en puits ; (b) Moyennes de l'activité antibactérienne des échantillons de miel multifloral contre *E.coli* évaluée par la méthode MIC ; (c) Moyennes de l'activité bactéricide des échantillons de miel multifloral contre *E.coli* évaluée par la méthode MBC ; (d) diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne en (mm).



**Figure 52** : (a) Activité antibactérienne (zone d'inhibition en mm) des échantillons de miel multifloral contre les souches *Pseudomonas.aeruginosa* évaluée par la méthode de diffusion en puits.; (b) Moyennes de l'activité antibactérienne des échantillons de miel multifloral contre les souches de *S.aureus*, évaluée par la méthode CMI; (c) Moyennes de l'activité bactéricide des échantillons de miel multifloral contre *E.coli* évaluée par la méthode CMB.



**Figure 53** : (a) Activité antibactérienne (zone d'inhibition en mm) des échantillons de miel multifloral contre les souches *Staphylococcus.aureus*, évaluée par la méthode de diffusion en puits.; (b) Moyennes de l'activité antibactérienne des échantillons de miel multifloral contre les souches de *S.aureus*, évaluée par la méthode CMI; (c) Moyennes de l'activité bactéricide des échantillons de miel multifloral contre *E.coli* évaluée par la méthode CMB.



**Figure 54 :** Zone d'inhibition des échantillons de miels vis-à-vis des Souches (a : *S.aureus* ; b : *P.aeruginosa* ; c : *E.coli*)

Statistiquement, les diamètres d'inhibition enregistrés ne présentent aucune variation significative contre les *E.coli*, les diamètres étaient entre 15.25 à 20.09 mm

Il existe une différence significative entre le miel de Manuka (M6= 0.83) et les autres échantillons de miels testés, d'où sa valeur de concentration minimale inhibitrice CMI est la plus élevée, ce qui signifie que son potentiel d'inhibition bactérienne contre les souches *E.coli* est le plus faible. Les échantillons Algériens sont plus efficaces sur ces souches .

Les résultats du test de CMB concentration minimale bactéricide ont permis de détecter l'apparition d'une différence significative entre le miel de Manuka (M6= 0.40) ayant donné la valeur la plus faible et l'échantillon M1 (M1= 0.60) ceci est dû à plusieurs facteurs tels que la zone géographique de récolte, le climat, le type de plantes et de pollen ...etc d'un échantillon à un autre.

Tous les échantillons de miel possèdent une activité antibactérienne bactériostatique sur les souches d'*E.coli*. L'échantillon M5 varie de l'échantillon M1, le miel M5 a donné un rapport très élevé ce qui signifie qu'il exerce une activité bactériostatique plus forte que celle du miel M1, alors que l'activité bactériostatique du miel de Manuka est similaire à celle des autres échantillons.

La taille des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches *P.aeruginosa* était entre 15.25 mm et 20.09 mm mais aucune différence significative n'a été détectée, tous les miels ont donné des résultats statistiquement similaires les uns des autres.

Les résultats de CMI montrent une divergence significative entre le miel de Manuka (Miel 6=0.64) et les autres miels Algériens. On observe que la CMI du miel de Manuka est la plus élevée ceci signifie que ce miel est le plus faible en terme d'activité antibactérienne contre les *P.aeruginosa* par rapport aux échantillons Algériens qui sont dotés d'un potentiel plus fort.

Les valeurs de CMB varient entre 0.19 à 0.45 mais aucune différence significative entre les échantillons de miels testés n'a été détectée.

Le miel de Manuka a donné un rapport CMB CMI de 11.23, cette valeur est la plus élevée et diffère significativement des échantillons Algériens testés. Ces derniers ont donné des valeurs plus faibles donc un puissant potentiel bactéricide vis-à-vis des *P.aeruginosa*. Le miel de Manuka et le miel M2 sont d'une activité bactériostatique sur ces souches alors que le reste des miels sont bactéricides

Comme pour les souches *E.coli* et *P.aeruginosa*, on observe l'absence de différence significative entre les valeurs des diamètres des zones d'inhibition chez les *S.aureus* avec un diamètre allant de 19.35 à 24.51 mm

La CMI du miel de Manuka (M6= 0.64) varie significativement de celle enregistrée par les autres échantillons locaux. On observe que ces miels Algériens sont plus efficace et ont donné des résultats de concentration minimale inhibitrice plus faibles que celle du manuka contre les *S.aureus*.

Les résultats des CMB ne présentent aucune différence significative entre les échantillons de miel testés contre les souche *S.aureus*. Les valeurs étaient entre 0.19 et 0.45.

Le rapport du miel de Manuka varie de manière significative des autres miels, d'où le rapport CMB/CMI est le plus élevé est donc ce miel est le moins efficace contre les souches *S.aureus*

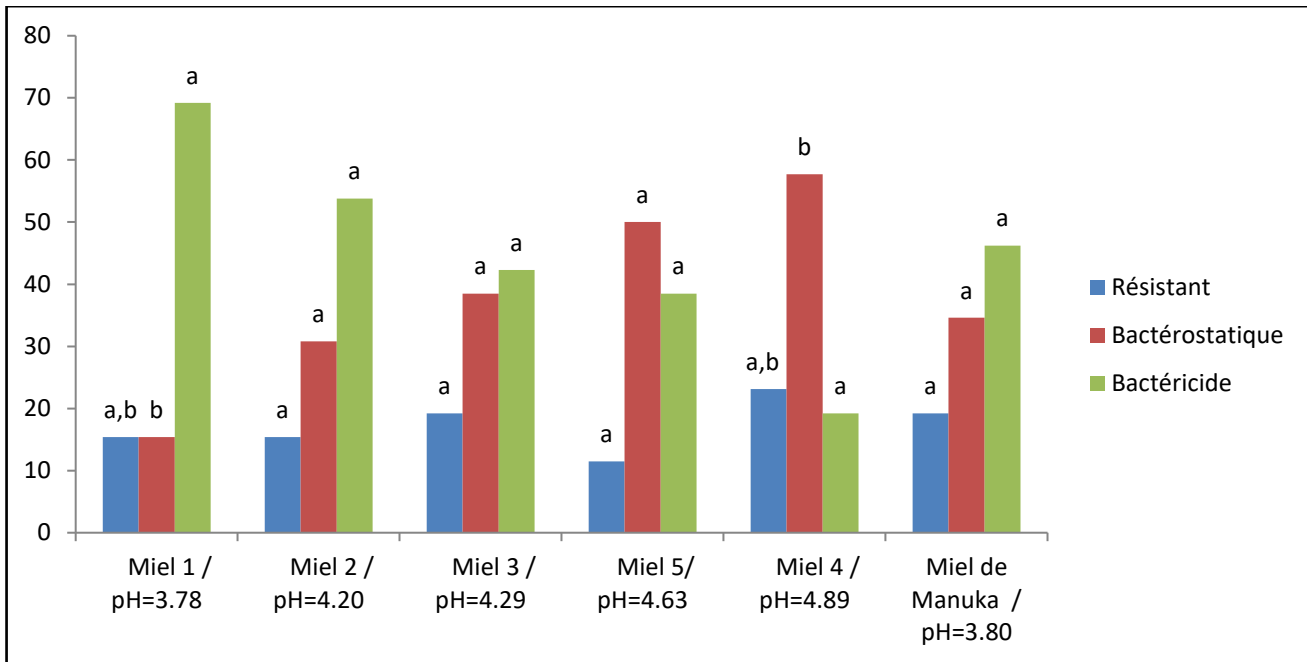
Le miel de Manuka et le miel M2 exercent une activité bactériostatique alors que les échantillons M1, M3, M4, M5 sont bactéricides. Le type d'activité antibactérienne des miels testés (bactériostatique ou bactéricide) est le même chez les souches de *P.aeruginosa*.

**8. Etude de la corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne :**

**Tableau 10 :** Résultats de l'étude de corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches d'*E. coli*

Activité antibactérienne	Résistante		Bactériostatique		Bactéricide		Totale	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<b>Miel</b>								
Miel 1 / pH=3.78	4 <sup>ab</sup>	15.4%	4 <sup>b</sup>	15.4%	18 <sup>a</sup>	69.2%	26	100%
Miel 2 / pH=4.20	4 <sup>a</sup>	15.4%	8 <sup>a</sup>	30.8%	14 <sup>a</sup>	53.8%	26	100%
Miel 5 / pH=4.29	5 <sup>a</sup>	19.2%	10 <sup>a</sup>	38.5%	11 <sup>a</sup>	42.3%	26	100%
Miel 3 / pH=4.63	3 <sup>a</sup>	11.5%	13 <sup>a</sup>	50.0%	10 <sup>a</sup>	38.5%	26	100%
Miel 4 / pH=4.89	6 <sup>ab</sup>	23.1%	15 <sup>b</sup>	57.7%	5 <sup>a</sup>	19.2%	26	100%
Miel de Manuka / pH=3.80	5 <sup>a</sup>	19.2%	9 <sup>a</sup>	34.6%	12 <sup>b</sup>	46.2%	26	100%
Test de Chi-Square				Valeur	df	P valeur		
$\chi^2$				16.832	10	0.078		
<i>V</i>				0.232 <sup>c</sup>		0.078		
<i>N</i>				156				

Note : *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). Le % est à l'intérieur du type de miel. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $\chi^2$  Valeur du test du Khi-deux. *v* taille de l'effet (*V* de Cramer). *c* Une différence significative avec une taille de l'effet  $\geq$  la définition de Cohen de "moyen". Test post-hoc Les valeurs dans la même ligne ne partageant pas le même indice sont significativement différentes à  $p < 0,05$ .



**Figure 55 :** Résultats de la corrélation entre le pH et l’activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches d’*E.coli*

Les résultats montre que la valeur p du chi-carré de Pearson est supérieur à 0,05;  $p= 0.078$ ; il n’existe pas de différence significatif entre la variation du pH et l’activité antibactérienne des miels étudiés (tableau 10, figure 55). Le changement du type de miel (valeur de pH différente) n’a aucune influence sur son activité antibactérienne contre les souches d’*E.coli*.

**Tableau 11 :** Résultats de l'étude de corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de *P. aeruginosa*.

Activité antibactérienne	Résistante		Bactériostatique		Bactéricide		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<b>Miel</b>								
Miel 1 / pH=3.78	1 <sup>a</sup>	3.8%	6 <sup>a</sup>	23.1%	19 <sup>a</sup>	73.1%	26	100%
Miel 2 / pH=4.20	1 <sup>a</sup>	3.8%	9 <sup>a</sup>	34.6%	16 <sup>a</sup>	61.5%	26	100%
Miel 5 / pH=4.29	0 <sup>a</sup>	0.0%	11 <sup>a</sup>	42.3%	15 <sup>a</sup>	57.7%	26	100%
Miel 3 / pH=4.63	1 <sup>a</sup>	3.8%	11 <sup>a</sup>	42.3%	14 <sup>a</sup>	53.8%	26	100%
Miel 4 / pH=4.89	7 <sup>a</sup>	26.9%	8 <sup>b</sup>	30.8%	11 <sup>b</sup>	42.3%	26	100%
Miel de Manuka / pH=3.80	3 <sup>a</sup>	11.5%	11 <sup>a</sup>	42.3%	12 <sup>a</sup>	46.2%	26	100%
Test de Chi-Square				Valeur	df	P valeur		
$\chi^2$				20.302*	10	0.027		
V				0.255* <sup>c</sup>		0.027		
N				156				

Note : N = 156 (n = 26 pour chaque condition). N = 156 (n = 26 pour chaque condition). Le % est à l'intérieur du type de miel. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $\chi^2$  Valeur du test du Khi-deux. v taille de l'effet (V de Cramer).c Une différence significative avec une taille de l'effet  $\geq$  la définition de Cohen de "moyen" .a,b Test post-hoc Les valeurs dans la même ligne ne partageant pas le même indice sont significativement différentes à  $p < 0,05$  (Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du pH afin d'effectuer l'étude des corrélations (Miel A= miel 1 ; Miel B=miel 2 ; Miel C= miel5 ; Miel D= miel 3 ; Miel E= miel 4).

La valeur p du chi-carré de Pearson et l'effet-taille V de Cramer est inférieure à 0,01,  $\chi^2(8, N = 130) = 20,267$ ,  $p < 0,01$ ,  $V = 0,27$ . Par conséquent, il existe une corrélation significative entre l'activité antibactérienne des échantillons de miel vis a vis des souches de *P.aeruginosa* et le pH du miel avec un ampleur d'effet (effect size) supérieure à la moyenne (25%) (tableau 11). Une analyse post hoc du test z par paire avec correction de Bonferroni a révélé une différence significative entre l'activité bactéricide et bactériostatique avec les pourcentages de résistance uniquement pour l'échantillon de miel 4 (pH=4,89).

*Pseudomonas aeruginosa* est connue pour sa capacité à développer plusieurs mécanismes de résistance aux agent antibactérien Efflux actif, Modification de la cible, Production d'enzymes dégradantes, Modification de la perméabilité membranaire, Formation de biofilms, Acquisition de gènes de résistance). Cette résistance peut être multifactorielle, impliquant une combinaison de ces mécanismes de résistance antibiotiques (Phan, 2008; Tenover, 2006; Molinari *et al.*, 1993).

Les souches *P.aeruginosa* ont résisté à l'échantillon de Miel M1 , M2, M3 avec un faible pourcentage (3.8%), aucune souche n'a résisté au miel M5 tandis qu'un pourcentage élevé de 11.5% des souches ont résisté au Miel de Manuka .Le pourcentage le plus élevé de souches résistantes (26.9%) a été détecté contre l'échantillon M4.

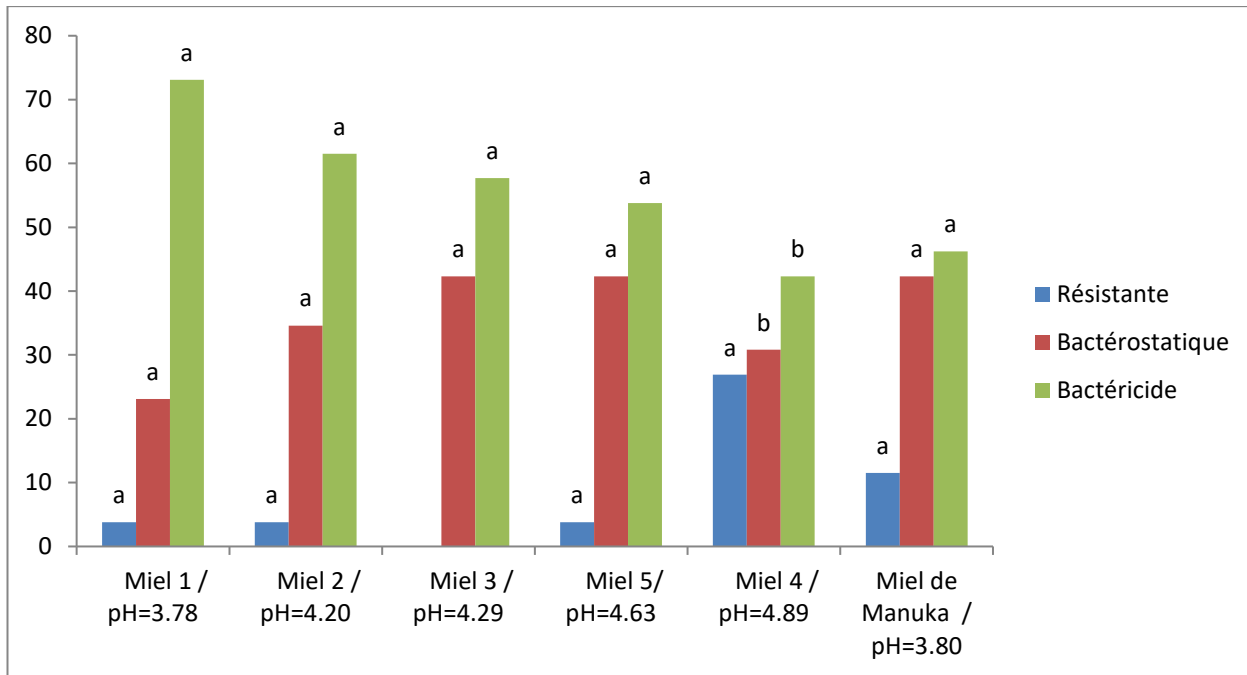
Le miel M1 possède un fort potentiel antibactérien contre les souches de *P.aeruginosa* (96.2%) ; la majorité des souches 73.1% sont tuées (activité bactéricide) alors que la croissance de 23.1% des souches a été inhibée (activité bactériostatique) .Il n'existe pas de différence significatif entre les différentes activités antibactériennes de cet échantillon ,le pH du miel n'a aucune influence sur son activité antibactérienne vis-à-vis des souches *P.aeruginosa* c à d qu'il n'ya pas de corrélation entre la valeur du pH et le potentiel antibactérien du miel M1.

L'échantillons M2 a possèdent un effet bactériostatique sur 34.6% des souches *P.aeruginosa* testés, les miels M3,M5 ainsi que le miel de Manuka inhibent la croissance de 42.3% des souches.

L'activité bactéricide des échantillons M2, M5 est presque similaire avec un pourcentage 61.5% 57.7% respectivement. L'échantillon M3 a tué 53.8% des souche *P.aeruginosa*. L'activité bactéricide du miel de Manuka a permis de détruire 46.2% des souches.

Les Miel M1, M2, M3, M5 et celui du Manuka Il n'existe pas de différence significatif entre leur pH et potentiel antibactérien, le pH n'a aucune influence sur son activité antibactérienne vis-à-vis des souches *P.aeruginosa* c à d qu'il n'ya pas de corrélation entre la valeur du pH et le potentiel antibactérien de ses miel. Ces miels ont des valeurs de pH très proche les une des autre ceci peut expliquer l'absence de différence significatif entre eux. Le pouvoir antibactérien est influencé significativement par d'autres facteurs autres que le pH (L'enzyme glucose oxydas GOx, activité antibactérienne non peroxyde causée par les lysozymes, les acides phénoliques et les flavonoïdes).

L'échantillon de Miel M4 a inhibé la croissance de 30.8% et a détruit 42.3% des souches, 26.9% des souches ont résisté à ce type de miel. Seul cet échantillon a révélé une forte corrélation entre sa valeur de pH et son activité antibactérienne. Quand le pH de ce type de miel atteint cet valeur de 4.89, la corrélation apparait fortement ce qui signifie que le changement de la valeur du pH conduit au changement de l'activité antibactérienne avec un coefficient d'impact moyen (25%).



**Figure 56 :** Résultats de la corrélation entre le pH et l’activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches de *P.aeruginosa*.

Nous avons enregistré une valeur p du chi-carré de Pearson et une taille d'effet V de Cramer inférieure à 0,01,  $\chi^2(8, N = 130) = 20,267$ ,  $p < 0,01$ ,  $V = 0,027$  (figure 56). Par conséquent, il existe une association significative entre l'activité antibactérienne des types de miel des souche *Pseudomonas aeruginosa* et le pH du miel avec une taille d'effet supérieure à la moyenne (27%). Une analyse post hoc du test z par paire avec correction de Bonferroni a révélé une différence significative entre l'activité bactéricide et bactériostatique avec les pourcentages d'activité résistante uniquement pour l'échantillon de miel 5 (PH=4,89).

**Tableau 12 :** Résultats de l'étude de corrélation entre le pH et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de *S.aureus*

Activité antibactérienne	Résistante		Bactériostatique		Bactéricide		Totale		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<b>Miel</b>									
Miel 1 / pH=3.78	0 <sup>a,b</sup>	0.0%	5 <sup>b</sup>	19.2%	21 <sup>a</sup>	80.8%	26	100%	
Miel 2 / pH=4.20	0 <sup>a</sup>	0.0%	7 <sup>a</sup>	26.9%	19 <sup>a</sup>	73.1%	26	100%	
Miel 5 / pH=4.29	0 <sup>a</sup>	0.0%	10 <sup>a</sup>	38.5%	16 <sup>a</sup>	61.5%	26	100%	
Miel 3 / pH=4.63	1 <sup>a</sup>	3.8%	10 <sup>a</sup>	38.5%	15 <sup>a</sup>	57.7%	26	100%	
Miel 4 / pH=4.89	2 <sup>a,b</sup>	7.7%	16 <sup>b</sup>	61.5%	8 <sup>a</sup>	30.8%	26	100%	
Miel de Manuka / pH=3.80	2 <sup>a</sup>	7.7%	18 <sup>a</sup>	69.2%	6 <sup>b</sup>	23.1%	26	100%	
Test de Chi-Square				Valeur	df	P valeur			
	$\chi^2$				30.060**	10	0.001		
	<i>v</i>				0.310***c		0.001		
	<i>N</i>				156				

Note. N = 156 (n = 26 pour chaque condition). % se situe dans le type de miel. \* p ≤0,05, \*\* p ≤0,01, \*\*\* p ≤0,001. Valeur du test du Chi-carré  $\chi^2$ . Taille de l'effet *v* (Cramer's V). c Une différence significative avec une taille d'effet ≥ la définition de Cohen de "moyen". a, b Les valeurs des tests post-hoc dans la même ligne qui ne partagent pas la même lettre en exposant sont significativement différentes à p < 0,05 (Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du pH afin d'effectuer l'étude des corrélations).

Les résultats retrouvés P=0.001 est inférieur à 0.05 donc il existe une différence significative tant que le test de Pearwise a montré qu'il existe une différence significative entre l'activité antibactérienne pour les échantillons de miel 1, 2, 3, 5 (tableau 12).

Le miel 1 (pH= 3.78) est doté d'une très forte activité bactéricide, 80.8% des souches de *S.aureus* sont tuées. Ce miel possède également une activité bactériostatique contre les *S.aureus*, mais reste minime a 19.2% seulement. Il existe une différence significative entre l'activité bactéricide et bactériostatique de cet échantillon contre les *S.aureus*.

Le Miel M2 (pH=4.20) est à 73.1% bactéricide et a 26.9% bactériostatique contre les souches de *S.aureus*. Le miel M5 (pH=4.29) a tué 61.5% des staphylocoques et inhibé la croissance de 38.5% . Aucune résistance de ces souches n'a été enregistrée contre les échantillons 1,2,3.

Contrairement au Miel3 (pH=4.63), 3.8% des souches ont résisté a cet échantillons, 61.5% sont inhibées (activité bactériostatique) et 30.8% sont tuées (activité bactéricide).

Le miel M4 (pH=4.89) possède une activité bactéricide à 30.8%, bactériostatique a 61.5% contre les souches *S.aureus* alors que 7.7% des souches ont résisté. Il existe une différence significative entre l'activité bactéricide et bactériostatique de l'échantillon.

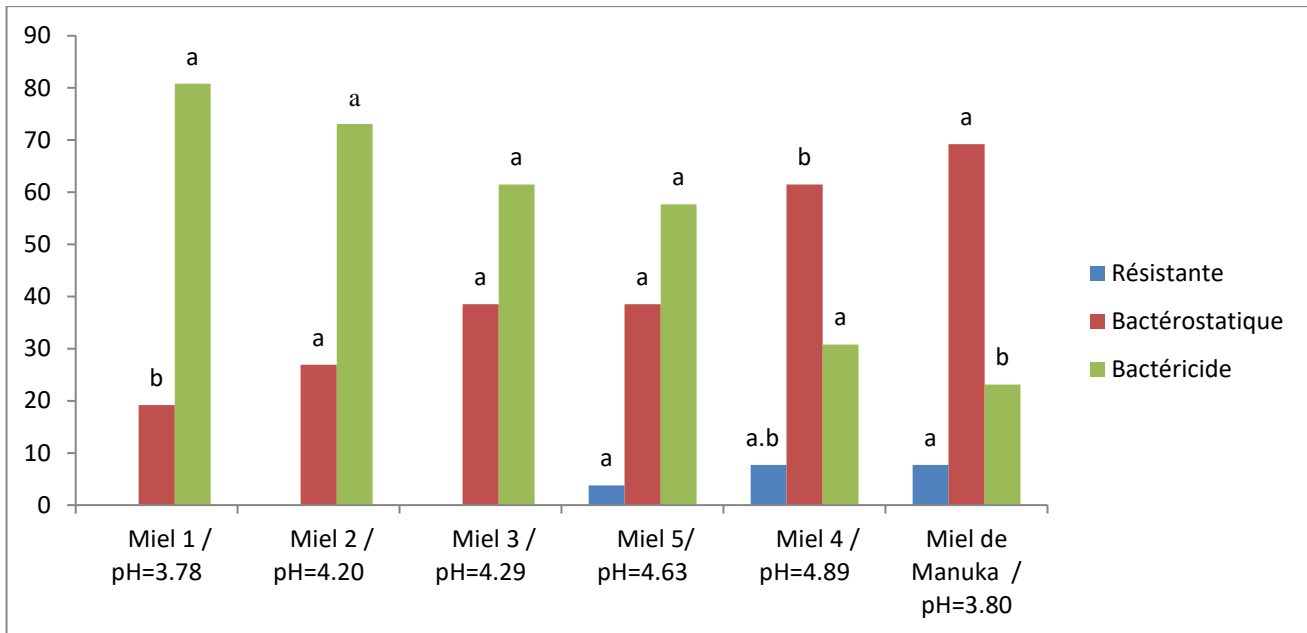
Pour les miels Algériens testés, plus la valeur du pH diminue (l'acidité augmente) plus l'activité bactéricide augmente, alors que l'augmentation de la valeur du pH du miel permet l'augmentation du potentiel bactériostatique et l'apparition de quelques souches résistantes (*S.aureus*) mais cette résistance reste non significatif.

Le miel de Manuka (pH= 3.80) est doté d'une forte activité bactéricide ; 69.2% des souches *S.aureus* sont inhibées alors qu'un faible pourcentage de 23.1% des souches sont détruites (activité bactéricide). Le pourcentage de Staphylocoques résistante est similaire a celui de l'échantillon M4 (7.7%).

Le miel de Manuka peut être utilisé comme un agent bactériostatique très puissant vis-à-vis des souches *S.aureus* (son activité est plus bactériostatique que bactéricide). Son pH reste inférieur à celui des miels testés M2, M3, M4 et M5). Il existe une différence significative entre l'activité bactéricide et l'activité bactériostatique, et même entre la résistance des souches et l'activité bactéricide.

Le Miel de Manuka (*Leptospermum scoparium*) provenant de la nouvelle Zélande (commercialisé) est différent par rapport aux miel algériens naturels testés dans les conditions climatiques, zone géographique, le type de pollen...etc. Qui ont un impact important sur les facteurs contrôlant le potentiel antibactérien du miel en question.

En conclusion, la faible valeur du pH confère au miel un puissant potentiel antibactériens Majoritairement bactéricide.



**Figure 57 :** Résultats de la corrélation entre le pH et l’activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches *S.aureus*

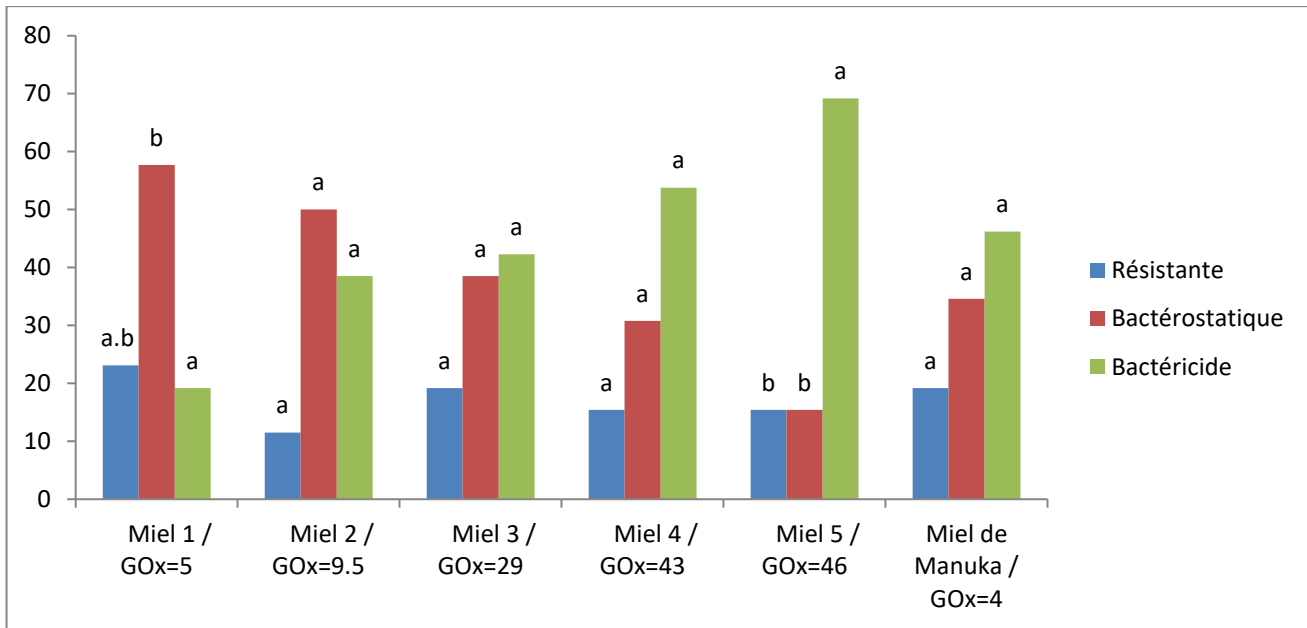
Nous avons noté une valeur p du Chi-Square de Pearson et une taille d'effet V de Cramer inférieure à 0,05,  $\chi^2(8, N = 130) = 18,795, p < 0.05, V = 0.26$ . Il existe une association significative entre l'activité bactéricide des types de miel de la famille des staphylocoques et le pH du miel avec une taille d'effet supérieure à la moyenne (26%). Une analyse post hoc z-test par paire avec correction de Bonferroni a révélé une différence significative entre le pourcentage bactéricide et les pourcentages d'activité bactériostatique et résistante, car nous avons observé les mêmes valeurs "a" dans les deux cas pour Miel1/pH=3,78 et Miel4/pH=4,89 (figure 57).

**9. Etude de la corrélation entre le contenu enzymatique en Glucose oxydase (GOX) et l'activité antibactérienne**

**Tableau 13 :** Résultats de l'étude de corrélation entre la teneur en GOX et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches d'*E. coli*

Activité antibactérienne	Résistant		Bactériostatique		Bactéricide		Totale	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<b>Miel</b>								
Miel 2 / Gox=5	6 <b>a,b</b>	23.1%	15 <b>b</b>	57.7%	5 <sup>a</sup>	19.2%	26	100%
Miel 1 / Gox=9.5	3 <sup>a</sup>	11.5%	13 <sup>a</sup>	50.0%	10 <sup>a</sup>	38.5%	6	100%
Miel 3 / Gox=29	5 <sup>a</sup>	19.2%	10 <sup>a</sup>	38.5%	11 <sup>a</sup>	42.3%	26	100%
Miel 5 / Gox=43	4 <sup>a</sup>	15.4%	8 <sup>a</sup>	30.8%	14 <sup>a</sup>	53.8%	26	100%
Miel 4 / Gox=46	4 <b>a,b</b>	15.4%	4 <b>b</b>	15.4%	18 <sup>a</sup>	69.2%	26	100%
Manuka Honey / Gox=4	5 <sup>a</sup>	19.2%	9 <sup>a</sup>	34.6%	12 <sup>a</sup>	46.2%	26	100%
Test de Chi-Square			Valeur		df	P valeur		
	$\chi^2$		16.832		10	0.078		
	$V_c$		0.232 <sup>c</sup>			0.078		
	<i>N</i>		156					

Note : *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). Le % est à l'intérieur du type de miel. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $\chi^2$  Valeur du test du Khi-deux. *v* taille de l'effet (V de Cramer). <sup>c</sup> Une différence significative avec une taille de l'effet  $\geq$  la définition de Cohen de "moyen". Test post-hoc Les valeurs dans la même ligne ne partageant pas le même indice sont significativement différentes à  $p < 0,05$ . (Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du Gox afin d'effectuer l'étude des corrélations.



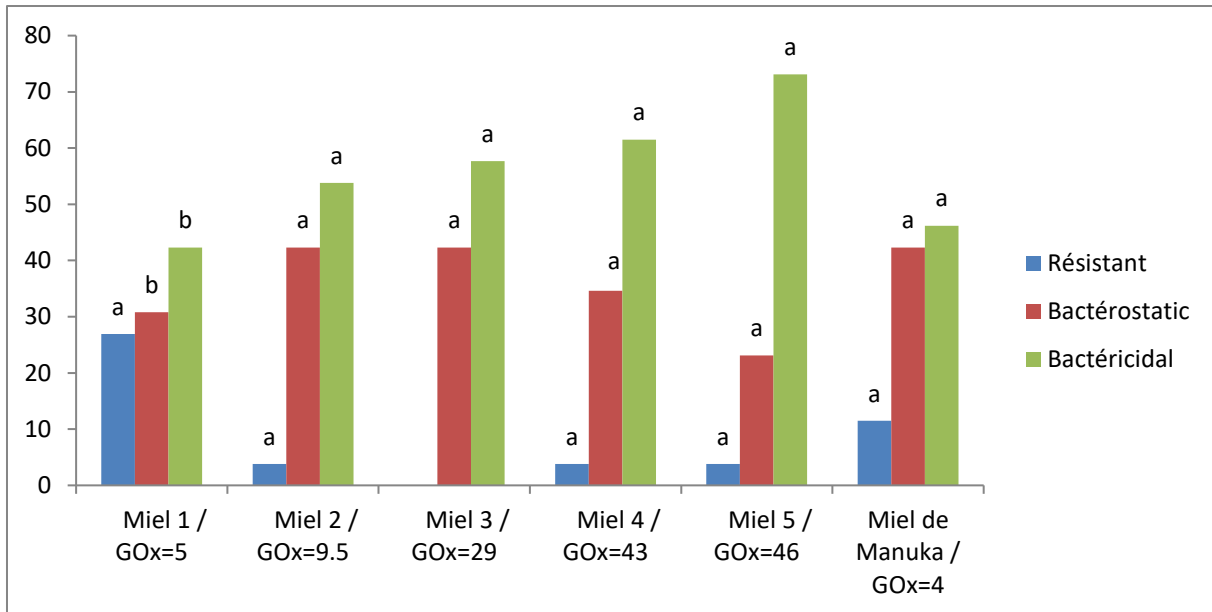
**Figure 58** : Résultats de la corrélation entre l'enzyme glucose oxydase (GOx) et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches d'*E.coli*.

Les résultats ont montrés que la valeur p du chi-carré de Pearson est supérieur à 0,05;  $p= 0.078$ ; il n'existe pas de différence significatif entre la variation du Gox et l'activité antibactérienne des miels étudiés (tableau 13). Le changement du type de miel (valeur de Gox différente) n'a aucune influence sur son activité antibactérienne contre les souches d'*E.coli* (figure 58).

**Tableau 14:** Résultats de l'étude de corrélation entre la teneur en GOX et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de *P.aeruginosa*.

Activité antibactérienne	Résistant		Bactériostatique		Bactéricide		Totale	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<b>Miel</b>								
Miel 2 / Gox=5	7 <sup>a</sup>	26.9%	8 <sup>b</sup>	30.8%	11 <sup>b</sup>	42.3%	26	100%
Miel 1 / Gox=9.5	1 <sup>a</sup>	3.8%	11 <sup>a</sup>	42.3%	14 <sup>a</sup>	53.8%	6	100%
Miel 3 / Gox=29	0 <sup>a</sup>	0.0%	11 <sup>a</sup>	42.3%	15 <sup>a</sup>	57.7%	26	100%
Miel 5 / Gox=43	1 <sup>a</sup>	3.8%	9 <sup>a</sup>	34.6%	16 <sup>a</sup>	61.5%	26	100%
Miel 4 / Gox=46	1 <sup>a</sup>	3.8%	6 <sup>a</sup>	23.1%	19 <sup>a</sup>	73.1%	26	100%
Manuka Honey / Gox=4	3 <sup>a</sup>	11.5%	11 <sup>a</sup>	42.3%	12 <sup>a</sup>	46.2%	26	100%
Teste de Chi-Square			Valeur		df	P value		
$\chi^2$			20.302*		10	0.027		
<i>v</i>			0.279* <sup>c</sup>		10	0.027		
<i>N</i>			156					

Note : *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). Le % est à l'intérieur du type de miel. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $\chi^2$  Valeur du test du Khi-deux. *v* taille de l'effet (*V* de Cramer).<sup>c</sup> Une différence significative avec une taille de l'effet  $\geq$  la définition de Cohen de "moyen" .*a,b* Test post-hoc Les valeurs dans la même ligne ne partageant pas le même indice sont significativement différentes à  $p < 0,01$ . Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du Gox afin d'effectuer l'étude des corrélations.



**Figure 59 :** Résultats de la corrélation entre l’enzyme glucose oxydase (GOx) et l’activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches *P.aeruginosa*.

Les résultats de la valeur p du chi-carré de Pearson et de l’ampleur de l’effet V de Cramer sont inférieurs à 0,01,  $\chi^2(8, N = 130) = 20,267, p < 0,01, V = 0,27$ . Ainsi, il existe une association significative entre l’activité bactéricide des types de miel sur les souche du genre *Pseudomonas* et le miel Gox avec une taille d’effet supérieure à la moyenne (27%). Une analyse post hoc par test z par paire avec correction de Bonferroni a révélé une différence significative entre le pourcentage d’activité résistante et les pourcentages bactéricides et bactériostatiques du miel 1 (tableau 14). Plus la composition du miel en GOX est élevée, plus l’activité bactériostatique se transforme en bactéricide et l’effectif de souches *P.aeruginosa* résistantes diminue. Donc le miel acquiert des propriétés lui permettant de tuer les souches de *P.aeruginosa* au lieu d’inhiber leur croissance (figure 59).

Certaines souches de *P.aeruginosa* ont résisté aux échantillons 1,2,4,5 et celui du Manuka avec de faible pourcentage allant de 3.8 % pour les miels 4,et 5, 11,5% chez le Manuka jusqu’à 26.9% chez le Miel 2.

L’absence totale de souches résistante pour l’échantillon M3.

Le pourcentage des souches résistantes diminue avec l’augmentation du contenu en enzyme Gox (relation inversement proportionnelle), alors que l’activité bactéricide du miel augmente avec l’augmentation de son contenu en Gox, ce qui signifie que la présence de cette enzyme en grande quantité favorise le processus d’élimination des souches de *P.aeruginosa* au lieu

d'inhiber leur croissance seulement. Cette enzyme permet la production du peroxyde d'hydrogène doté de propriétés antiseptique et désinfectantes. En ce qui concerne l'activité bactériostatique, lorsque le contenu en Gox varie de 5 a 9.5 le pourcentage de souches résistante diminue de 26.9% a 3.8% et leurs croissance est inhibées. Celle qui ont été inhibé a Gox=5 sont tué puisque le potentiel bactéricide devient plus puissant. Le Miel 3 (Gox=29) exerce une activité antibactérienne sur les souche de *P.aerugenosa* soit bactéricide ou bactériostatique ,mais aucune souche n'a résisté a ce type de miel, ceci peut être expliqué par l'influence d'autres facteurs spécifique a cet échantillon (climat, site de récolte, pollen..etc).

Le pourcentage de *P.aerugenosa* résistantes au miel 4 et 5 est faible (3.8%).Le miel 4 a tué 61.5% et inhibé la croissance de 34.5% des *P.aerogenosa*. L'échantillon 5 a inhibé la croissance de 23.1% mais a tué 73.1%. La contenance en Gox des miels 4 et 5 est très proche 43 et 46 respectivement, l'activité antibactérienne se transforme partiellement d'une activité bactériostatique a bactéricide.

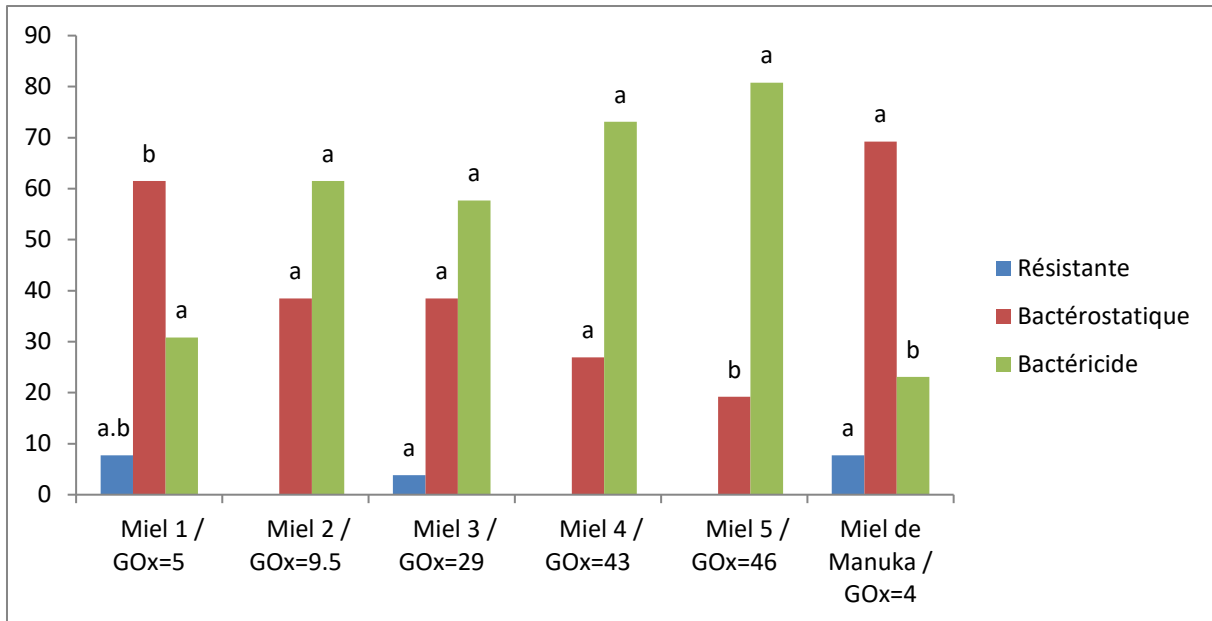
Le miel de Manuka de la nouvelle Zélande est bactériostatique a 42.3% et bactéricide a 46.2% sur les souches de *P.aerugenosa*. Ce Miel utilisé comme référence dans cette étude a donné de bon resultats par rapport a son contenu enzymatique faible en Gox, ceci peut être du a d'autres facteur (pays, zone géographique, climats, source florale, type d'abeille et alimentation).

Le miel locale M4 a donné les meilleur resultants, son potentiel bactericide est le plus puissant parmi tous les échantillons testés.

**Tableau 15:** Résultats de l'étude de corrélation entre Gox et l'activité antibactérienne des échantillons de miel contre les souches de *S.aureus*

Activité antibactérienne	Résistant		Bactériostatique		Bactéricide		Total	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<b>Miel</b>								
Miel 2 / Gox=5	2 <b>a.b</b>	7.7%	16 <b>b</b>	61.5%	8 <b>a</b>	30.8%	26	100%
Miel 1 / Gox=9.5	0 <sup>a</sup>	0.0%	10 <sup>a</sup>	38.5%	16 <sup>a</sup>	61.5%	6	100%
Miel 3 / Gox=29	1 <sup>a</sup>	3.8%	10 <sup>a</sup>	38.5%	15 <sup>a</sup>	57.7%	26	100%
Miel 5 / Gox=43	0 <sup>a</sup>	0.0%	7 <sup>a</sup>	26.9%	19 <sup>a</sup>	73.1%	26	100%
Miel 4 / Gox=46	0 <b>a.b</b>	0.0%	5 <b>b</b>	19.2%	21 <sup>a</sup>	80.8%	26	100%
Manuka Honey / Gox=4	2 <sup>a</sup>	7.7%	18 <sup>a</sup>	69.2%	6 <b>b</b>	23.1%	26	100%
Chi-Square Test			Value	df	P value			
$\chi^2$			30.060**	10	0.001			
<i>v</i>			0.310** <sup>c</sup>	10	0.001			
<i>N</i>			156					

Note : *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). *N* = 156 (*n* = 26 pour chaque condition). Le % est à l'intérieur du type de miel. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $\chi^2$  Valeur du test du Khi-deux. *v* taille de l'effet (*V* de Cramer). <sup>c</sup> Une différence significative avec une taille de l'effet  $\geq$  la définition de Cohen de "moyen" .<sup>a,b</sup>Test post-hoc Les valeurs dans la même ligne ne partageant pas le même indice sont significativement différentes à  $p < 0,05$ . Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du Gox afin d'effectuer l'étude des corrélations.



**Figure 60 :** Résultats de la corrélation entre l'enzyme glucose oxydase (GOx) et l'activité antibactérienne des échantillons de miel et du miel de Manuka contre les souches *S.aureus*

La valeur p de la taille de l'effet du chi carré de la personne et du V de Cramer a enregistré des valeurs inférieures à 0,05,  $\chi^2(8, N = 130) = 18,795, p < 0,05, V = 0,26$  (tableau 15). Il existe donc une association significative entre l'activité bactéricide des types de miel sur les souches de *S.aureus* et le Gox du miel avec une taille d'effet supérieure à la moyenne (26%). Une analyse post hoc par test z par paire avec correction de Bonferroni a révélé une différence significative entre les pourcentages d'activité bactéricide et les pourcentages d'activité bactériostatique et résistante dans les échantillons Miel1 et Miel5 (figure 60).

Les résultats obtenus montrent que très peu de souches *S.aureus* ont résisté 7.7% et 3.8% aux échantillons M2 et M3 respectivement, tandis qu'aucune souche *S.aureus* n'a résisté au miel M1, M3 et M4. Le miel de Manuka 7.7% des *Staphylococcus aureus* étaient résistantes.

Le miel M2 (Gox=5), a inhibé la croissance de 61.5% des souches et 30.8% sont tuées, ce dernier est majoritairement bactériostatique contre les *S.aureus*. Tandis que le miel M1 a tué 61.5% et inhibé 38.5% donc contrairement au miel M2 il est majoritairement bactéricide des *S.aureus* (absence de souche résistante au M2).

Le miel M3 (Gox=29), les résultats donne un pourcentage faible de 3.8% de souches résistante 38.5% de souches inhibées et 57.7% de souches tuées, ces résultats ont très proche de ceux du miel M1.

Le miel 5 (Gox= 43) exerce une activité bactéricide sur 73.1% des souches *S.aureus*, et bactériostatique sur 26.9%. Le pourcentage de souches inhibées diminue chez le miel 4 (Gox=46) alors que celui de la bactéricidie augmente à 80.8%. Ce miel est le plus fort et a donné les meilleurs résultats et aucune souche *S.aureus* n'a pu résister à ce dernier. Cela peut être expliqué par sa teneur (la plus riche) en polyphénols et flavonoïdes. Les polyphénols peuvent inhiber la croissance bactérienne, perturber la membrane cellulaire ou inhiber les enzymes bactériennes des souches.

Le miel de Manuka et le miel M2 ont des valeurs proches de l'enzyme Gox (4,5 respectivement), en conséquence le même pourcentage de souche résistante de *S.aureus* a été enregistré (7.7%). Mais le miel 1 a donné de meilleurs résultats.

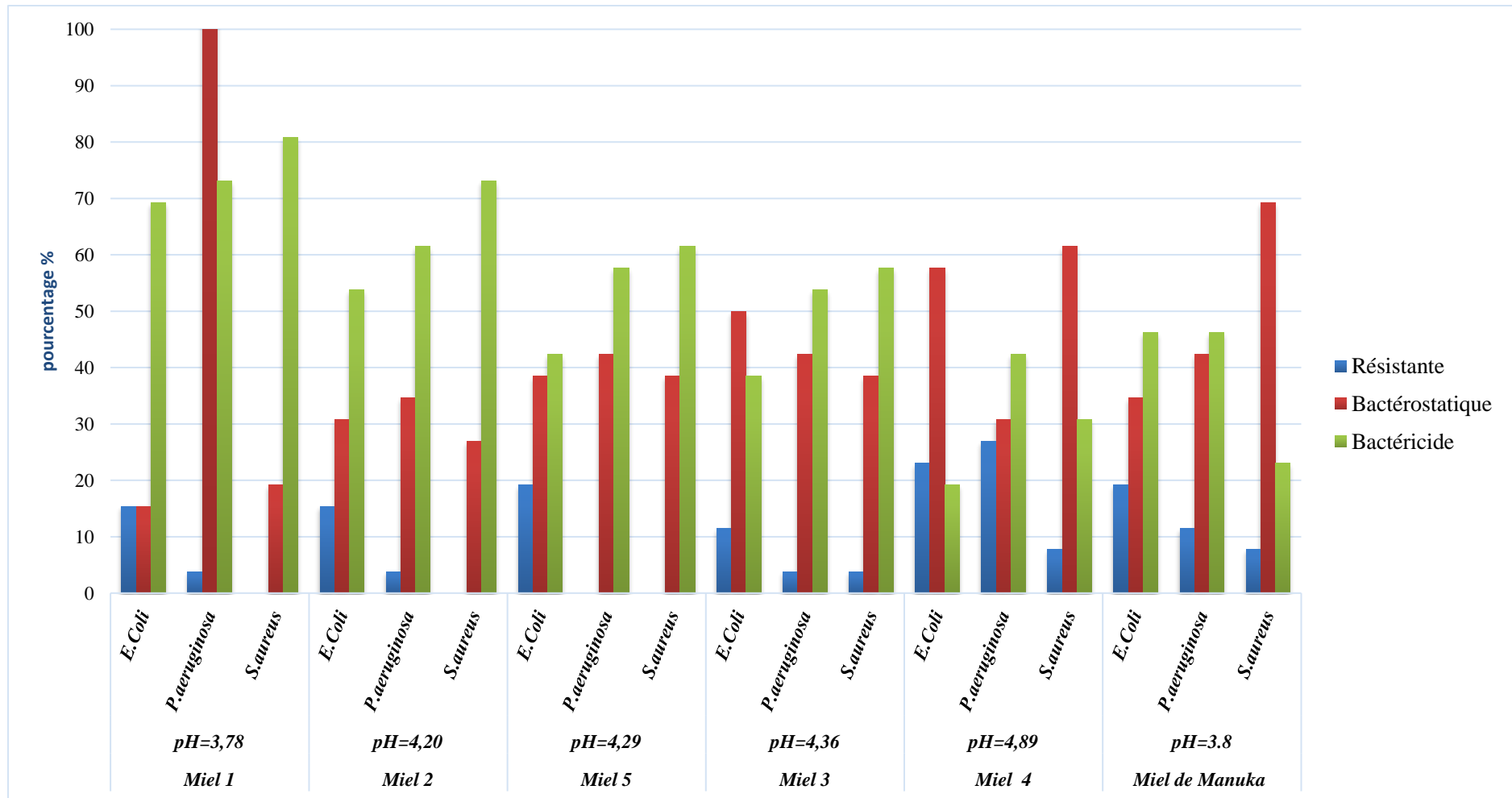
L'existence de souche *S.aureus* résistante à la méthiciline (SARM) explique l'apparition de souches résistantes mais cet effectif est très faible. Le miel de Manuka possède la plus faible activité bactéricide 23.1%.

En conclusion l'enzyme Gox du miel lui confère des propriétés antibactériennes, la quantité élevée accentue son pouvoir bactéricide à partir de la valeur 43, aucune souche de *S.aureus* résiste soit tuée (la majorité) ou inhibée.

**Tableau 16 :** Résultats des tests de Chi-Deux de Pearson de l'activité antibactérienne des miels avec les espèces bactériennes étudiés (*E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*) au sein de chaque espèce

Activité antibactérienne	<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>S.aureus</i>		
	Résistant	Bactérostatique	Bactéricide	Résistant	Bactérostatique	Bactéricide	Résistant	Bactérostatique	Bactéricide
Miel									
Miel 1 / pH=3.78	15.4%	15.4%	69.2%	3.8%	23.1%	73.1%	0.0%	19.2%	80.8%
Miel 2 / pH=4.20	15.4%	30.8%	53.8%	3.8%	34.6%	61.5%	0.0%	26.9%	73.1%
Miel 5 / pH=4.29	19.2%	38.5%	42.3%	0.0%	42.3%	57.7%	0.0%	38.5%	61.5%
Miel 3 / pH=4.63	11.5%	50.0%	38.5%	3.8%	42.3%	53.8%	3.8%	38.5%	57.7%
Miel 4 / pH=4.89	23.1%	57.7%	19.2%	26.9%	30.8%	42.3%	7.7%	61.5%	30.8%
Miel de Manuka / pH=3.80	19.2%	34.6%	46.2%	11.5%	42.3%	46.2%	7.7%	69.2%	23.1%
Test du Chi-Deux de Pearson									
Khi-Chi-deux	16.832			20.302			30.060		
Ddl	10			10			10		
Sig	0.078			0.027			0.001		

Note : N = 156 (n = 26 pour chaque condition). N = 156 (n = 26 pour chaque condition). Le % est à l'intérieur du type de miel. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Valeur du test du Khi-deux  $\chi^2$ . Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du pH afin d'effectuer l'étude des corrélations



**Figure 61 :** Résultat de l'activité antibactérienne des miels testés et du miel de Manuka (M6) vis-à-vis de toutes les espèces bactériennes étudiés (*E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*) au sein de chaque espèce. (Les miels ont été classé en ordre croissant selon la valeur du pH afin d'effectuer l'étude des corrélations°).

Les résultats de l'étude montrent que l'échantillon de miel 1 a montré la plus grande capacité bactéricide parmi les miels testés, en particulier sur les souches *S.aureus* (80.8%). Le Miel de Manuka était doté du plus fort potentiel bactériostatique contre les souches *S.aureus* (69.2%) (tableau 16, figure 61).

Le miel 2 a présenté le plus fort pouvoir bactéricide envers *S.aureus* (73.1%) et s'est distingué par son efficacité bactériostatique, notamment contre les souches *P.aeruginosa* (34.6%).

Le miel 3 et 4 ont présentés le plus fort potentiel bactéricide envers *S.aureus* (61.5%) et (57.7%) respectivement. Ces miels ainsi que celui du Manuka ont démontrés les plus forts potentiels bactériostatiques d'une manière équivalent contre les souches de *P.aeruginosa* (42.3%).

Le miel de Manuka s'est également révélé efficace en tant qu'agent bactériostatique contre les *S.aureus* (69.2%) suivi par l'échantillons 5 avec un pourcentage de 61.5%.

Enfin, le miel de Manuka a démontré un puissant effet bactéricide, avec une efficacité similaire contre *E.coli* (46.2%) et *Pseudomonas aeruginosa* (46.2%), mais une activité légèrement moins forte contre *S.aureus* (23.1%).

En conclusion, pour cibler les souches *S.aureus*, *E.coli*, il est préférable d'utiliser le miel 1, qui a montré la plus grande efficacité bactéricide. Pour les souches de *P.aeruginosa*, les échantillons 2 et 3 étaient d'une forte efficacité bactéricide similaire.

Le miel 1 a démontré la plus forte action bactéricide suivi par le miel 2 contre les trois espèces étudiées.

### 10. Dosage des Polyphénols totaux et des Flavonoïdes des échantillons de miel

Les résultats de la détermination de la concentration du contenu polyphénolique total, des flavonoïdes dans les échantillons de miel sont représentés dans le tableau 17. Ces résultats montrent que tous les échantillons de miel ont une teneur élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Toutefois, l'échantillon de miel 5 présente les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

**Tableau 17** : Détermination de la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes dans les échantillons de miel

Echantillon de miel	Teneur totale en polyphénols ( $\mu\text{g}$ de GAE/mg de miel)	Flavonoïdes ( $\mu\text{g}$ de QE/mg de miel)
Miel 1	122.84 $\pm$ 04.32	33.25 $\pm$ 01.37
Miel 2	178.24 $\pm$ 01.24	48.25 $\pm$ 03.25
Miel 3	248.00 $\pm$ 04.22	68.32 $\pm$ 00.97
Miel 4	180.25 $\pm$ 01.25	49.36 $\pm$ 05.32
Miel 5	307.00 $\pm$ 04.49	68.22 $\pm$ 01.32
Manuka	680.00 $\pm$ 01.23	71,90 $\pm$ 00.91

La détermination de la teneur totale en polyphénols, des flavonoïdes et de la couleur des échantillons de miel a montré que tous les échantillons de miel ont des couleurs différentes et des concentrations différentes en teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes. Cela est dû à leurs différentes origines florales et géographiques. Des résultats similaires ont également été rapportés précédemment par Ahmed *et al* (2013) qui ont montré que la concentration de la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes dans les échantillons de miel est fortement influencée par les sources botaniques (Ahmed *et al.*, 2013). Le miel contient un large éventail de constituants phénoliques tels que la quercétine, l'ester phénylique de l'acide caféique, l'acétine, le kaempférol et la galangine (Khalil et al., 2010). La composition particulière de chaque miel dépend de la fleur dont il est issu mais aussi des conditions de récolte et de stockage (Bouacha *et al.*, 2022).

## 11. Activité antioxydante :

### 11.1 Pouvoir antiradicalaire (Méthode de balayage du radical libre DPPH)

**Tableau 18** : Résultats du test de balayage du radical libre DPPH

	Miel 1	Miel 2	Miel 3	Miel 4	Miel 5	Manuka
<b>IC50%</b>	22.24	19.25	27.36	22.56	25.11	24.12

Les activités de piégeage des radicaux des échantillons de miel ont été déterminées à l'aide du test de piégeage des radicaux DPPH. Le DPPH est un radical stable à base d'azote qui a été largement utilisé pour tester le piégeage des radicaux de diverses substances.

En général, une forte activité de piégeage de DPPH confère à l'échantillon une activité antioxydante. Le miel M3 présente la capacité de piégeage des radicaux DPPH la plus élevée (27,36 %) suivi par l'échantillon M5, pour tous les échantillons de miel. L'activité de piégeage du miel de Manuka est proche de celle de l'échantillon M5 (tableau 18).

Leur activité élevée de piégeage des radicaux peut être due à leur teneur élevée en composés phénoliques et flavonoïdes, car le potentiel antioxydant du miel est directement proportionnel à la quantité de phénols et de flavonoïdes (Bakchich et al., 2018).

Dans l'ensemble, tant le piégeage du DPPH et le potentiel antioxydant du miel malaisien sont comparable à ceux qui ont été rapportés précédemment par plusieurs auteurs (Gül et Tuba, 2018 ; Moniruzzaman et al., 2013).

## 11.2 Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

**Tableau 19** : Activité antioxydante des échantillons de miels, du BHT et de l' $\alpha$ -tocophérol dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique

Echantillon de miel	Pourcentage d'inhibition (%)
Miel 1	16,02
Miel 2	23.44
Miel 3	14.17
Miel 4	34.84
Miel 5	19.64
Miel de Manuka	21.87
$\alpha$ -tocophérol	70.23 $\pm$ 1.2
BHT	90.02 $\pm$ 0.89

Le degré et la position du groupe hydroxyle sur le noyau aromatique de la molécule constituent les facteurs les plus importants influençant et affectant l'activité antioxydante (Grecka et al., 2018 ; Can et al., 2015).

Les résultats de l'activité antioxydante par le test  $\beta$ . Carotène montrent un pourcentage d'inhibition varie entre 14.17 et 34.84 mg/mL, dont la meilleure activité a été enregistrée dans l'échantillon M4 (tableau 19).

Le pourcentage d'inhibition du miel de Manuka est inférieur à celle de l'échantillon M4 et M2 et supérieur aux autres échantillons.

Les résultats obtenus se concordent bien avec les travaux de Boussaid et al. (2018)

## 12. Résultat de l'activité anti-mutagène

Les résultats de la détermination de l'effet antimutagénique sont regroupés sur le tableau 20.

**Tableau 20** : Effet mutagène et antimutagène du miel algérien dans l'essai AMES.

Echantillons	<i>S.typhimurium</i> TA98		<i>S.typhimurium</i> TA100		<i>S.typhimurium</i> TA102	
	RC±SD	I±SD%	RC±SD	I±SD%	RC±SD	I±SD%
M 1	1.02±0.11	47.14±07.12 <sup>a</sup>	1.55±0.12	39.87±10.89 <sup>a</sup>	1.14±0.15	28.09±09.85 <sup>d</sup>
M 2	1.18±0.01	58.84±11.65 <sup>b</sup>	1.08±0.22	43.18±12.85 <sup>a</sup>	1.23±0.21	30.85±11.17 <sup>d</sup>
M 3	1.37±0.33	47.32±11.84 <sup>a</sup>	1.41±0.21	49.28±07.84 <sup>a</sup>	1.21±0.32	29.68±07.95 <sup>d</sup>
M 4	1.09±0.15	51.84±09.21 <sup>b</sup>	1.20±0.31	53.44±11.32 <sup>b</sup>	1.38±0.21	39.57±04.85 <sup>a</sup>
M 5	1.44±0.14	71.47±11.74 <sup>c</sup>	1.28±0.19	69.32±09.85 <sup>c</sup>	1.29±0.34	46.35±03.58 <sup>a</sup>
Manuka	1.19±0.34	43.41±01.15	1.11±0.02	44.11±11.27	1.02±0.85	32.85±08.24

Données exprimées en tant que moyennes de trois expériences indépendantes ± SD. Il n'y a pas de différences significatives ( $P > 0,05$ ) entre les échantillons de miel qui ont les mêmes lettres mais il y a des différences significatives ( $P < 0,001$ ) entre les échantillons de miel qui ont des lettres différentes. RC = coefficient de réversion, SD = écart-type, I = pourcentage d'inhibition.

Dans le tableau 20, tous les échantillons de miel ont présenté un effet antimutagène significatif, qui varie entre 28,09% pour l'échantillon de miel 1 et 71,49% pour l'échantillon de miel 5. Il existe des différences significatives dans l'inhibition de la mutagénicité ; ceci est lié à la composition et aux différentes origines botaniques des échantillons de miel.

Selon Wang *et al.* (2002), l'effet antimutagène du miel est lié à sa teneur en sucre et à ses composants phénoliques. En tant que composé phénolique commun dans le miel, la quercétine, l'acide p-coumarique et l'acide caféique sont des exemples d'antioxydants qui ont précédemment montré une activité antimutagène (Wang *et al.*, 2002). Bien que très peu d'études aient été menées sur l'effet antimutagène du miel, cependant, certains chercheurs s'intéressent récemment de plus en plus à l'effet antimutagène du miel de différentes régions. Saxena *et al.* (2017) ont rapporté que les échantillons de miel d'Inde présentent une inhibition significative de l'effet mutagène du méthanesulfonate d'éthyle dans les cellules de cellules E. coli MG1655 par le biais d'un test de résistance à la rifampicine. Cependant, Sipahi *et al.* (2017) ont montré que les échantillons de miel turc ont une faible activité antimutagène en utilisant le test AMES (Saxena *et al.*, 2017; Sipahi *et al.*, 2017).

**13. Résultats d'étude de la corrélation polyphénol flavonoïdes et couleur :**

**Tableau 21 :** Corrélation entre les effets antibactériens, antimutagènes et TPC, FLV et couleur.

Parameters	Coloration	TPC	FLV	ABE	AMEinTA98	AMEinTA100	AMEinTA102
Coloration		0.151	-0.028	0.187	0.245	0.057	-0.090
TPC	0.151		0.951	0.855	0.677	0.871	0.673
FLV	-0.028	0.951		0.721	0.461	0.729	0.497
ABA	0.187	0.855	0.721		0.936	0.801	0.718
AMEinTA98	0.245	0.677	0.461	0.936		0.777	0.792
AMEinTA100	0.057	0.871	0.729	0.801	0.777		0.941
AMEinTA102	-0.090	0.673	0.497	0.718	0.792	0.941	

TPC = contenu polyphénolique total (µg de GAE/mg de miel), FLV = flavonoïdes (µg de QE/mg de miel), ABE = effet antibactérien (mm), AME dans TA98 = effet antimutagène dans *S. tyhimurium* TA98, AME dans TA100 = effet antimutagène dans *S. tyhimurium* TA100, AME dans TA102 = effet antimutagène dans *S. tyhimurium* TA102.

La détermination du contenu polyphénolique total, des flavonoïdes et de la couleur des échantillons de miel (tableau 21) a montré que tous les échantillons de miel ont des couleurs différentes et des concentrations différentes de contenu polyphénolique total et de flavonoïdes. Ceci est dû à leurs différentes origines florales et géographiques. Des résultats similaires ont également été rapportés précédemment par Ahmed *et al.* (2013) qui ont montré que la concentration du contenu polyphénolique total et des flavonoïdes dans les échantillons de miel est fortement influencée par les facteurs suivants par les sources botaniques (Ahmed *et al.*, 2013). Une large gamme de constituants phénoliques est présente dans le miel comme la quercétine, l'ester phénéthylique de l'acide caféique, l'acétine, le kaempférol et la galangine (Khalil et Sulaiman, 2010). La composition particulière de chaque miel dépend de la fleur dont il est issu mais aussi des conditions de récolte et de stockage (Bouacha *et al.*, 2022a).

Pour déterminer la corrélation entre la composition du miel en teneur polyphénolique et en flavonoïdes, la couleur, l'effet antibactérien et l'effet antimutagène, une matrice de Pearson a été établie. Les résultats montrent clairement qu'il existe une forte corrélation entre les effets antibactériens et antimutagènes et le contenu polyphénolique total et les flavonoïdes. En outre, il n'y a pas de corrélation entre les effets thérapeutiques et la couleur des échantillons de miel. De nombreuses études ont également rapporté que le contenu polyphénolique total et les flavonoïdes sont les constituants les plus importants qui participent à l'effet thérapeutique du miel (Khalil et Sulaiman, 2010 ; Pontis *et al.*, 2014). Ils constituent le groupe le plus important de métabolites secondaires des plantes, ils ont différentes fonctions dans les plantes qui incluent des activités antibactériennes, antifongiques et antioxydantes (Pontis et al, 2014). Dans cette

étude, Il a été montré que les échantillons de miel de différentes origines florales et géographiques ont de bons effets antibactériens et antimutagènes. Ces deux effets thérapeutiques sont fortement influencés par la concentration du contenu polyphénolique total et des flavonoïdes dans le miel. Par conséquent, ils pourraient être de bons facteurs pour déterminer la qualité et les effets thérapeutiques des échantillons de miel.

# Conclusion et perspectives

### Conclusion et perspectives

Cette étude a identifié les principales sources botaniques du miel algérien dans cinq régions présentant des climats et une flore botanique variés. *Apis mellifera* a exploité une diversité de plantes comme sources de pollen et de nectar, avec 50 types de pollen appartenant à 18 familles différentes identifiés dans les échantillons. Les familles les plus représentées étaient les *Apiaceae*, *Fabaceae* et *Rhamnaceae*, tandis que les types de pollen dominants étaient *Hedysarum coronarium*, *Ziziphus* sp, et *Apiaceae* type *Coriandrum*.

L'origine géographique du miel et l'environnement de collecte influent sur les propriétés du miel, y compris son activité antibactérienne. Les caractéristiques physico-chimiques des composés végétaux varient selon chaque type de miel issu de la même source botanique. L'activité antibactérienne des échantillons est attribuée à divers facteurs, tels que la provenance et les propriétés physico-chimiques (pH, teneur en glucose et fructose, quantité de l'enzyme glucose oxydase).

Les résultats de la caractérisation physico-chimique indiquent une faible teneur en humidité dans les échantillons algériens, favorisant ainsi une conservation prolongée. Tous les échantillons sont conformes aux normes de l'Union européenne, du Codex Alimentarius et de la Commission internationale du miel, tant pour la composition en sucre que pour les paramètres physico-chimiques.

De plus, les échantillons de miel ont démontré une activité antibactérienne notable contre les souches bactériennes testées. Cela suggère que le miel algérien possède des composés bioactifs capables d'inhiber la croissance bactérienne. L'identification précise de ces composés pourrait ouvrir la voie au développement de nouveaux agents antimicrobiens naturels.

La capacité antimutagénique du miel est un élément prometteur pour la protection contre les mutations génétiques. Les résultats indiquent un potentiel pour atténuer les effets néfastes des agents mutagènes, suggérant ainsi une application potentielle dans la prévention des maladies liées aux mutations génétiques.

La forte activité antioxydante observée dans les échantillons de miel souligne leur capacité à neutraliser les radicaux libres. Cette propriété est cruciale pour la santé, car elle peut contribuer à la prévention du stress oxydatif et à la réduction du risque de maladies chroniques.

Ces résultats confirment la présence de composés bioactifs dans le miel algérien qui peuvent avoir des bénéfices significatifs pour la santé. Ainsi, ils soulignent le potentiel du miel en tant qu'agent fonctionnel, pouvant être exploré dans le développement de produits alimentaires ou de compléments alimentaires visant à améliorer la santé globale.

Ces résultats ouvrent des perspectives très intéressantes pour continuer ce travail sur plusieurs aspects tel que des études approfondies sur la composition en substances bioactives du miel et les mécanismes de leurs activités biologiques. Des observations au microscope électronique des structures cellulaires en contact avec le miel pourraient être réalisées, tout comme une étude de l'influence des produits naturels sur la structure et le génome des microorganismes. Ces résultats ouvrent des opportunités pour la commercialisation et l'exportation internationale des miels algériens de haute qualité.

# Références bibliographiques

**Références bibliographique**

Abolhassani, S., Alipour, H., Alizadeh, A., Nemati, M. M., Najafi, H., & Alavi, O. (2022). Antibacterial effect of electrospun polyurethane-gelatin loaded with honey and ZnO nanoparticles as potential wound dressing. *Journal of Industrial Textiles*, 51(1\_suppl), 954S-968S.

Acquarone, C., Buera, P., & Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food chemistry*, 101(2), 695-703.

Adimi, L. Z. (2018). *Contribution à l'étude des effets antimicrobiens et antioxydants d'une plante médicinale: la Mélisse (Melissa officinalis)* (Doctoral dissertation).

Adoui, M., & Lahouel, M. *Caractérisation des souches de Staphylococcus aureus résistantes à la méticilline (SARM) et évaluation de leur sensibilité à la propolis* (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).

Afrin, S., Haneefa, S. M., Fernandez-Cabezudo, M. J., Giampieri, F., Al-Ramadi, B. K., & Battino, M. (2020). Therapeutic and preventive properties of honey and its bioactive compounds in cancer: An evidence-based review. *Nutrition research reviews*, 33(1), 50-76.

Ahmed, M., Djebli, N., Aissat, S., Zerrouki, K., & Bourabeh, A. (2013). In vitro synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. *J Plant Pathol Microb*, 4(152), 2.

Ahmed, S., Sulaiman, S. A., Baig, A. A., Ibrahim, M., Liaqat, S., Fatima, S., ... & Othman, N. H. (2018). Honey as a potential natural antioxidant medicine: an insight into its molecular mechanisms of action. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

Albaridi, N. A. (2019). Antibacterial potency of honey. *International Journal of Microbiology*, 2019.

Allen HK, Donato J, Huimi Wang H, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(4):251-59.

Alimentarius, C. (2001). Revised codex standard for honey. *Codex stan*, 12, 1982.

- Al-Kafaween, M. A., Hilmi, A. B. M., Al-Jamal, H. A. N., Elshoryi, N. A., Jaffar, N., & Zahri, M. K. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* exposed to Malaysian trigona honey in vitro demonstrated downregulation of virulence factor. *Iranian Journal of Biotechnology*, 18(4), e2542.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition research*, 22(9), 1041-1047.
- Almasaudi, S. (2021). The antibacterial activities of honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2188-2196.
- Almasaudi, S. B., Al-Nahari, A. A., El Sayed, M., Barbour, E., Al Muhayawi, S. M., Al-Jaouni, S., ... & Harakeh, S. (2017). Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi journal of biological sciences*, 24(6), 1255-1261.
- Aloush V, Navon-Venezia S, Seigmen-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*.2006; 50(1):43-8.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., ... & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2490-2499.
- Alvarez-Suarez, J. M., Gasparri, M., Forbes-Hernández, T. Y., Mazzoni, L., & Giampieri, F. (2014). The composition and biological activity of honey: a focus on Manuka honey. *Foods*, 3(3), 420-432.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., ... & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2490-2499.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3, 15-23.

- Al-Waili, N. S. (2003). Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. *Journal of medicinal food*, 6(2), 135-140.
- Amenu, D. (2014). Antimicrobial activity of medicinal plant extracts and their synergistic effect on some selected pathogens. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(1), 18-29.
- Ames, B. N. (1973). Carcinogens are mutagens: their detection and classification. *Environmental health perspectives*, 6, 115-118.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Ananias, K. R., Melo, A. A. M. D., & Moura, C. J. D. (2013). Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 679-683.
- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (Eds.). (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, 63(4), 549-562.
- Anthimidou, E., & Mossialos, D. (2013). Antibacterial activity of Greek and Cypriot honeys against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in comparison to manuka honey. *Journal of medicinal food*, 16(1), 42-47.
- AOAC, H. K. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA: Off. Anal. Chem.
- Ariefdjohan, M. W., Martin, B. R., Lachcik, P. J., & Weaver, C. M. (2008). Acute and chronic effects of honey and its carbohydrate constituents on calcium absorption in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2649-2654.
- Aron, S., & Passera, L. (2009). *Les sociétés animales: évolution de la coopération et organisation sociale*. De Boeck Supérieur.

- Armour AD, Shankowsky HA, Swanson T, Lee J, Tredget EE. The impact of nosocomially-acquired resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a burn unit. *J Trauma*. 2007; 63(1):164-71.
- Babarinde, G. O., Babarinde, S. A., Adegbola, D. O., & Ajayeoba, S. I. (2011). Effects of harvesting methods on physicochemical and microbial qualities of honey. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 628-634.
- BAKCHICHE, B., HABATI, M., BENMEBAREK, A., & GHERIB, A. (2018). Caractéristiques physico-chimiques, concentrations des composés phénoliques et pouvoir antioxydant de quatre variétés de miels locales (Algérie). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(1), 118-123.
- Baldensperger, P. J. (1924). *L'apiculture méditerranéenne*. Andre Lesot.
- Baloš, M. M. Ž., Popov, N. S., Radulović, J. Z. P., Stojanov, I. M., & Jakšić, S. M. (2020). Sugar profile of different floral origin honeys from Serbia. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 398-405.
- Balouri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., & Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food chemistry*, 101(2), 502-514.
- BANQUES, P. D. N. A. A., & GÈNES, D. (2013). COMMISSION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE. *PROJET*, 15, 19.
- Basset, P., Feil, E. J., Zanetti, G., & Blanc, D. S. (2011). The evolution and dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Genetics and Evolution of Infectious Disease* (pp. 669-688). Elsevier.
- Becker, K., Skov, R. L., & von Eiff, C. (2015). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. *Manual of clinical microbiology*, 354-382.
- Belay, A., Haki, G. D., Birringer, M., Borck, H., Lee, Y. C., Cho, C. W., ... & Melaku, S. (2017). Sugar profile and physicochemical properties of Ethiopian monofloral honey. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2855-2866.

- Belitz, H. D., Grosch, W., Belitz, H. D., & Grosch, W. (1999). Sugars, sugar alcohols and honey. *Food Chemistry*, 801-828.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 3-44). Woodhead Publishing.
- Benaziza-Bouchema, D., & Schweitzer, P. (2010). Caractérisation des principaux miels des régions du Nord de l'Algérie. *Cahiers Agricultures*, 19(6), 432-438.
- BENSEFIA Fadila, B. A. L. I. (2019). *Analyses physico-chimiques et propriétés antioxydantes du miel* (Doctoral dissertation).
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- Berhanu, S., Tadesse, D. M., & Jorge, A. (2022). Physicochemical Properties of Ethiopian Apis mellifera Honey: Review. *Int. J. Agri. Sci. Food Technol*, 8(1), 38-44.
- Bertrand, X., Thouverez, M., Patry, C., Balvay, P., & Talon, D. (2001). Pseudomonas aeruginosa: antibiotic susceptibility and genotypic characterization of strains isolated in the intensive care unit. *Clinical microbiology and infection*, 7(12), 706-708.
- Bessas, A., Benmoussa, L., & Kerarma, M. (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. *Diplôme d'Ingénieur d'Etat en biologie, faculté des sciences, Université Djillah Liabes, Sidi Bel Abbes, Algérie*, 81.
- Betty, A. F., Dani, F. S. and Alice, S. W.; Diagnostic Microbiology, Bailey and Scott's, 1998; 10th edition.
- Birhanu, T. A. (2015). Honeybee production and honey quality assessment in Guji Zone, Ethiopia. *Journal of Food Processing and Technology*, 6(11).
- Bitrus, A. A., Peter, O. M., Abbas, M. A., & Goni, M. D. (2018). *Staphylococcus aureus*: A review of antimicrobial resistance mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 4(2), 43-54.

- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American college of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bogdanov, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *LWT-Food Science and Technology*, 30(7), 748-753.
- Bogdanov, S., Martin, P., & Lullmann, C. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld*, 5, 1-62.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.
- Bogdanov, S. (2012). Honey as nutrient and functional food. *Proteins*, 1100, 1400-2700.
- Bogdanov, S., & Blumer, P. (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue suisse d agriculture*, (5), 219-222.
- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., Von Der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., ... & Vit, P. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission. *Bee world*, 80(2), 61-69.
- Bogdanov, S., & Martin, P. (2002). Honey authenticity: a review. *Mitt. Lebensm. Hyg*, 93, 232-254.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S4-S17.
- Bohmker, H. (1917). Beitrage zur Kenntnis der floralen und extrafloralen Nektarien. Beiheft z. bot. *Zentralbl.*
- Bonnier, M. G. (1878). Étude sur l'anatomie et la physiologie des nectaires. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 25(8), 262-271.
- Bouacha, M., Ayed, H., & Grara, N. (2018). Honey bee as alternative medicine to treat eleven multidrug-resistant bacteria causing urinary tract infection during pregnancy. *Scientia pharmaceutica*, 86(2), 14.
- Bouacha, M., & Benbouzid, H. (2020). Antibacterial properties of honey from different Algerian regions against *Staphylococcus aureus* strains from wounds. *J. Pure Appl. Microbiol*, 14(1), 447-453.

Bouacha, M., Besnaci, S., Boudiar, I., & Al-Kafaween, M. A. (2022). Screening of the antibacterial and antibiofilm effect of multifloral honey against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiologica Hellenica*, 67(1), 27-37.

BOUACHA, M., BOUDIAR, I., Akila, A. B. D. I., Al-KAFAWEEN, M. A., & KHALLEF, M. (2022). The antimutagenic effect of multifloral honey in salmonella/microsomal assay and its correlation with the total polyphenolic content. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 11(6), e5557-e5557.

Boudib, S., Zaimeche, M., & Roula, S. P. (2004). *Extraction et séparation des différentes fractions flavonoïdiques de la plante Ranunculus repens L et évaluation de l'activité antibactérienne sur quelques espèces des bacilles Gram négatif* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

Boukendour, O. (2011). *Contribution à l'automatisation de la détection et de la reconnaissance du pollens* (Doctoral dissertation, Tizi-ouzou).

Boukraâ, L. (Ed.). (2013). *Honey in traditional and modern medicine*. CRC Press.

Boussaid, A., Chouaibi, M., Rezig, L., Hellal, R., Donsi, F., Ferrari, G., & Hamdi, S. (2018). Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. *Arabian journal of chemistry*, 11(2), 265-274.

Brazel, M., Desai, A., Are, A., & Motaparathi, K. (2021). Staphylococcal scalded skin syndrome and bullous impetigo. *Medicina*, 57(11), 1157.

Bredenstein EBM, de la Fuente-Nunez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance*. *Trends Microbiol.*2011; 19(8):419-25.

Bruneau, B. G. (2002). Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circulation research*, 90(5), 509-519.

Bucekova, M., Jardekova, L., Juricova, V., Bugarova, V., Di Marco, G., Gismondi, A., ... & Majtan, J. (2019). Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. *Molecules*, 24(8), 1573.

Bucekova, M., Buriova, M., Pekarik, L., Majtan, V., & Majtan, J. (2018). Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Scientific reports*, 8(1), 9061.

- Bucekova, M., Jardekova, L., Juricova, V., Bugarova, V., Di Marco, G., Gismondi, A., ... & Majtan, J. (2019). Antibacterial activity of different blossom honeys: New findings. *Molecules*, 24(8), 1573.
- Burgett DM. Glucose oxidase: a food protective mechanism in social Hymenoptera. *Ann Entomol Soc Am*. 1974;67(4):545-6.
- Camille, D. E. L. A. R. R. A. S. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Lavoisier.
- Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(6):1379-82.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E. A., Silici, S., & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food chemistry*, 180, 133-141.
- Cattoir, V. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance.
- Cavia, M. M., Fernández-Muiño, M. A., Gómez-Alonso, E., Montes-Pérez, M. J., Huidobro, J. F., & Sancho, M. T. (2002). Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food chemistry*, 78(2), 157-161.
- Celep, E., & Yeşilada, E. (2017). Influence of honey addition on the bioaccessibility of phenolic contents and antioxidant capacities of different coffee types. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(4), 906-914.
- Chefrour, C., Draiaia, R., Tahar, A., Kaki, Y. A., Bennadja, S., & Battesti, M. J. (2009). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 9(5).
- Chuang, Y. Y., & Huang, Y. C. (2013). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia. *The Lancet infectious diseases*, 13(8), 698-708.
- Chung, Y. C., Chien, C. T., Teng, K. Y., & Chou, S. T. (2006). Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & zucc. *Food Chemistry*, 97(3), 418-425.
- Chuttong, B., Chanbang, Y., Sringarm, K., & Burgett, M. (2016). Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South east Asia (Thailand). *Food chemistry*, 192, 149-155.

- Cilia, G., Fratini, F., Marchi, M., Sagona, S., Turchi, B., Adamchuk, L., ... & Kačániová, M. (2020). Antibacterial activity of honey samples from Ukraine. *Veterinary sciences*, 7(4), 181.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 106-112.
- Clément, H., Bruneau, E., Barbançon, J. M., Bonnaffé, P., Domérgo, R., Fert, G., ... & Vaissière, B. (2002). *Traité Rustica*; Paris: 2002. *Le traité Rustica de l'apiculture*, 528.
- Codex, A., & Intergovernmental, T. F. O. (2001). Joint FAO/WHO Food Standard Programme Codex Alimentarius Commission Twenty-Fourth Session Geneva, 2-7 July 2001. *Codex*.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one*, 6(3), e17549.
- Cornuet, J. M., Daoudi, A., & Fresnaye, J. (1988). Étude biométrique de populations d'abeilles Marocaines. *Apidologie*, 19(4), 355-366.
- Corradini, C., Cavazza, A., & Bignardi, C. (2012). High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: principles and applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012.
- CÔTÉ, H. (2019). DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PRODUITS ANTIBACTÉRIENS ISSUS DE LA FORÊT QUÉBÉCOISE.
- Council, E. U. (2002). Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official Journal of the European Communities L*, 10, 47-52.
- Crane, E., & International Bee Research Association. (1975). Honey: a comprehensive survey. (*No Title*).
- Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S., & Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032-1043.
- Da Luz, C. F. P., Barbuglio-Santiago, L. D. O., Simões, A. R. G., Da Silva, J. H., Santos, V. L. D., & Kirizawa, M. (2020). Pollen morphology of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) from the Atlantic

Forest in southeast Brazil (São Paulo) with a contribution to the systematics of Neotropical species. *Grana*, 59(4), 239-257.

Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food chemistry*, 196, 309-323.

Daffe, F. M. (2018). Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches *Klebsiella pneumoniae* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017 [thèse]. *Faculté de pharmacie de l'université de Bamako*.

Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Rossi, R., Colombo, R., & Milzani, A. (2003). Reversible S-glutathionylation of Cys374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1), 23-32.

D'Arcy, B. (2005). *Antioxidants in Australian Floral Honeys: Identification of Health-enhancing Nutrient Components: a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation*. Rural Industries Research and Development Corporation.

DARRIGOL, J. (1979). O mel. *O mel e a saúde*. Lisboa-Portugal: *Presença*, 31-57.

Daumann, E. (1928). Zur Biologie der Blüte von *Nicotiana glauca* Grah. *Biol. gen.*, 4, 571-588.

Daumann, E. (1930). Das Blütennektarium von *Magnolia* und die Futterkörper in der Blüte von *Calycanthus*. *Planta*, 11(1), 108-116.

Dawson, M. (1997). A history of *Leptospermum scoparium* in cultivation-discoveries from the wild. *New Plantsman*, 4, 51-59.

DE, P. L. D. D. E. (1985). *LE MIEL, UN COMPOSE COMPLEXE AUX PROPRIETES SURPRENANTES* (Doctoral dissertation, Université de Limoges, France).

De Almeida-Muradian, L. B., Stramm, K. M., Horita, A., Barth, O. M., da Silva de Freitas, A., & Estevinho, L. M. (2013). Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), 1698-1706.

Decision, C., & MEMORANDUM, E. (2002). Council of the European Union. *Official Journal L*, 130(15/05), 0001-0003.

- Delacharlerie, S., de Biourge, S., Chéné, C., Sindic, M., & Deroanne, C. (2008). HACCP organoleptique: Guide pratique. Presses agronomiques de Gembloux.
- Denis, J. (2007). La prescription ordinaire. Circulation et énonciation des règles au travail. *Sociologie du travail*, 49(4), 496-513.
- Denton, M. (2007). Enterobacteriaceae. *International journal of antimicrobial agents*, 29, S9-S22.
- Derndorfer, E., Schneider-Häder, B., & Food, D. C. C. Sensory Analysis of Honey.
- Díez, M. J., Andrés, C., & Terrab, A. (2004). Physicochemical parameters and pollen analysis of Moroccan honeydew honeys. *International journal of food science & technology*, 39(2), 167-176.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30.
- Djebli, N., Mustafa, M. R., Keskin, M., & Kolayli, S. (2021). Anti-Ulcerogenic and cytoprotective effects of Saharian (Sidr) honey from Algeria. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 24(10), 1664-1670.
- Doran, J. W., & Linn, D. M. (1979). Bacteriological quality of runoff water from pastureland. *Applied and environmental microbiology*, 37(5), 985-991.
- Draiaia, R., Dainese, N., Borin, A., Manzinello, C., Gallina, A., & Mutinelli, F. (2015). Physicochemical parameters and antibiotics residuals in Algerian honey. *African Journal of Biotechnology*, 14(14), 1242-1251.
- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., & Rubtsova, M. Y. (2018). Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 10(4 (39)), 33-48.
- El-kott, A. F. (2008). Ki-67 And P53 Expression Of Melatonin Hepatoprotective Effects Against Toxicity Of Carbon Tetrachloride In Rats. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3(1), 53-59.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2012). Honey: a novel antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400-4423.

- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. A. (2014). Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. *Molecules*, *19*(2), 2497-2522.
- Erler, S., & Moritz, R. F. (2016). Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie*, *47*, 389-411.
- Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*. 2002; *28*(4):637-41.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and chemical toxicology*, *46*(12), 3774-3779.
- EUROPÉENNE, L. U. (2002). *CONSEIL DE L UNION EUROPÉENNE*. Directive 2010/45/UE du Conseil du 13 juillet 2010 modifiant la directive 2006/112/CE relative au système commun de taxe sur la valeur ajoutée en ce qui concerne les règles de facturation. 13 juillet 2010. Article 11.
- Fahey, J. W., & Stephenson, K. K. (2002). Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): a potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(25), 7472-7476.
- Farh, I. A. E. (2016). *Detection of the Identification Some Sudanese Bee Honey Samples* (Doctoral dissertation, Sudan University of Science and Technology).
- Faust, M. A. (1976). Coliform bacteria from diffuse sources as a factor in estuarine pollution. *Water Research*, *10*(7), 619-627.
- Febriyenti, F., Lucida, H., Almahdy, A., Alfikriyah, I., & Hanif, M. (2019). Wound-healing effect of honey gel and film. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *11*(2), 176.
- Feldhofen, E. (1933). *Beiträge zur physiologischen Anatomie der nuptialen Nektarien aus den Reihen der Dikotylen*. Heinrich.
- Fell, R. D. (1978). Queen cell production and control in the honey bee (*Apis mellifera* L.) colony (Hymenoptera: Apidae).

- Feller-Demalsy, M. J., Vincent, B., & Beaulieu, F. (1989). Mineral content and geographical origin of Canadian honeys. *Apidologie (France)*.
- Ferreira, I.C., Aires, E., Barreira, J., Estevinho, L.M.: Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chemistry*, **2009**, **114** (4), 1438-1443;
- Ferrerres, F., Tomás-Barberán, F. A., Soler, C., García-Viguera, C., Ortiz, A., & Tomás-Lorente, F. (1994). A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*, *25*(1), 21-30.
- Ferrerres, F., Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., & Tomás-Lorente, F. (1991). An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *56*(1), 49-56.
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjeric, D., & Primorac, L. (2016). Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *Journal of Apicultural Science*, *60*(1), 39-48.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, *13*(5), 269-284.
- Frankel, S., Robinson, G. E., & Berenbaum, M. R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, *37*(1), 27-31.
- French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1107-1117.
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm*, *7*(1), 11-27.
- Gary, N. E. (1992). Activities and behavior of honeybees. *The hive and the honey bee*.
- Geană, E. I., Ciucure, C. T., Costinel, D., & Ionete, R. E. (2020). Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and  $\delta^{13}\text{C}$  signature. *Food Control*, *109*, 106919.

- Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3050-3055.
- Gheldof, N., Wang, X. H., & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 5870-5877.
- Gheldof, N., Wang, X. H., & Engeseth, N. J. (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1500-1505.
- Gichora, M. (2003). *Towards realization of Kenya's full beekeeping potential: A case study of Baringo district*. Göttingen: Cuvillier.
- Gil, M. I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., & Tomas-Barberan, F. A. (1995). Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2833-2838.
- Gilca, M., Stoian, I., Atanasiu, V., & Virgolici, B. (2007). The oxidative hypothesis of senescence. *Journal of postgraduate medicine*, 53(3), 207.
- Gniadkowski, M.; Evolution and epidemiology of extended-spectrum B– lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin. Microbiol.Infect.*2001; 7:597-608.
- Gomes, T. A., & Gonzalez-Pedrajo, B. (2010). Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.*: Betham Science Publishers Ltd, 25-47.
- Gómez-Maqueo, A., Escobedo-Avellaneda, Z., Cano, M. P., & Welte-Chanes, J. (2018). Phenolic compounds in food. In *Phenolic Compounds in Food* (pp. 33-58). CRC Press.
- Gonnet, M., Aubert, S., & Ferry, P. (1986). Evolution de la couleur du miel lors de sa cristallisation. *Apidologie*, 17(1), 49-62.
- Gonnet, M. (1997). Judging the quality of honey by sensory analysis. In *Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy* (pp. 247-251). Boston, MA: Springer US.

- González, M. M., de Lorenzo, C., & Pérez, R. A. (2010). Development of a structured sensory honey analysis: Application to artisanal Madrid honeys. *Food Science and Technology International*, 16(1), 19-29.
- Gorelik, S., Ligumsky, M., Kohen, R., & Kanner, J. (2008). A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *The FASEB Journal*, 22(1), 41-46.
- Goro, A. A. (2021). *Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées à Bamako de janvier 2020 à juin 2020* (Doctoral dissertation, USTTB).
- Green, K. J., Dods, K., & Hammer, K. A. (2020). Development and validation of a new microplate assay that utilises optical density to quantify the antibacterial activity of honeys including Jarrah, Marri and Manuka. *PloS one*, 15(12), e0243246.
- Grecka, K., Kuś, P. M., Worobo, R. W., & Szweda, P. (2018). Study of the anti-staphylococcal potential of honeys produced in Northern Poland. *Molecules*, 23(2), 260.
- Gribaldo, S., Cookson, B., Saunders, N., Marples, R., & Stanley, J. (1997). Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative staphylococcal species important in hospital infection. *Journal of medical microbiology*, 46(1), 45-53.
- Grissa, K., Cornuet, J. M., Msadda, K., & Fresnaye, J. (1990). Étude biométrique de populations d'abeilles tunisiennes. *Apidologie*, 21(4), 303-310.
- Guerriat, H. (1996). *Etre performant en apiculture*. H. Guerriat.
- Guerzou, M., Aouissi, H. A., Guerzou, A., Burlakovs, J., Doumandji, S., & Krauklis, A. E. (2021). From the beehives: Identification and comparison of physicochemical properties of Algerian honey. *Resources*, 10(10), 94.
- Gül, A., & Pehlivan, T. (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi journal of biological sciences*, 25(6), 1056-1065.
- Guillon, N. (1996). *Etude de l'activité antibactérienne du miel* (Doctoral dissertation).
- Haderbache, L., Bousdira, M., & Mohammedi, A. (2013). Ziziphus lotus and Euphorbia bupleuroides Algerian honeys.

- Haouam, L., Tahar, A., Dailly, H., Lahrichi, A., Chaqroune, A., & Abdennour, C. (2016). Physicochemical properties and major elements contents of Algerian honeys from semi-arid regions. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 107-115.
- Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., ... & Holden, M. T. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome biology*, 18(1), 1-11.
- Hartl, D. L., & Dykhuizen, D. E. (1984). The population genetics of *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, 18(1), 31-68.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 36(6), 2090-2097.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- Hazrati, M., Mehrabani, D., Japoni, A., Montasery, H., Azarpira, N., Hamidian-Shirazi, A. R., & Tanideh, N. (2010). Effect of honey on healing of *Pseudomonas aeruginosa* infected burn wounds in rat. *Journal of Applied Animal Research*, 37(2), 161-165.
- Hepburn, H. R., & Radloff, S. E. (1996). Morphometric and pheromonal analyses of *Apis mellifera* L along a transect from the Sahara to the Pyrenees. *Apidologie*, 27(1), 35-45.
- Herbert, E. W. (1992). Honey bee nutrition. *The hive and the honey bee*, 1, 197-233.
- Hermosín, I., Chicón, R. M., & Cabezudo, M. D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food chemistry*, 83(2), 263-268.
- Hills, S. P., Mitchell, P., Wells, C., & Russell, M. (2019). Honey supplementation and exercise: a systematic review. *Nutrients*, 11(7), 1586.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., & Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 9(10), 486-493.
- HOMRANI, M. (2020). *Caractérisation physico-chimique, spectre pollinique et propriétés biologiques de miels algériens crus de différentes origines botaniques* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).

- Hopkins RS, Abbott DO, Wallace LE. Follicular dermatitis outbreak caused by *Pseudomonas aeruginosa* associated with a motel's indoor swimming pool. *Public Health Rep.* 1981; 96(3):246-9.
- Hooton, T. M. 2003. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 17:303-332.
- Hoseinzadeh, E., Makhdoumi, P., Taha, P., Hossini, H., Pirsahab, M., Omid Rastegar, S., & Stelling, J. (2017). A review of available techniques for determination of nano-antimicrobials activity. *Toxin Reviews*, 36(1), 18-32.
- Iglesias, M. T., De Lorenzo, C., Polo, M. D. C., Martín-Álvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 84-89.
- Inglis TJJ. Evidence for dynamic phenomena in residual tracheal tube biofilm. *Br J Anaesth.* 1993; 70(1):22-4.
- Inoue, K., Murayama, S., Seshimo, F., Takeba, K., Yoshimura, Y., & Nakazawa, H. (2005). Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), 872-878.
- Irina D., Georgiia G., Livia P., Alina M.E., Rodica S.(2010). *The antioxydant activity of selected Romanian honeys.* *Food Tech.* 34:77-83.
- Islam, S. (2008). *Chromosomal antibiotic resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and Neisseria gonorrhoeae.* Karolinska Institutet (Sweden).
- ISO 5492. (2008). *Sensory Analysis—Vocabulary.*
- Jevons, M. P. (1961). 'Celebenin'-resistant staphylococci. *Bmj*, 1, 124-125.
- Kahraman, T., Buyukunal, S. K., Vural, A., & Altunatmaz, S. S. (2010). Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food chemistry*, 123(1), 41-44.
- Karadal, F., Onmaz, N. E., Abay, S., Yildirim, Y., Al, S., Tatyuz, I., & Akcay, A. (2018). A study of antibacterial and antioxidant activities of bee products: Propolis, pollen and honey samples. *Ethiopian Journal of Health Development*, 32(2).

- Khalafi, R., Goli, S. A. H., & Behjatian, M. (2016). Characterization and classification of several monofloral Iranian honeys based on physicochemical properties and antioxidant activity. *International journal of food properties*, 19(5), 1065-1079.
- Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Boukraa, L. (2010). Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1).
- Khalil, M. I., Mahaneem, M., Jamalullail, S. M. S., Alam, N., & Sulaiman, S. A. (2011). Evaluation of radical scavenging activity and colour intensity of nine Malaysian honeys of different origin. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 3(1), 04-11.
- Khalil, M. I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, M. A., Islam, M. N., ... & Gan, S. H. (2012). Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. *Molecules*, 17(9), 11199-11215.
- Khan, S., Somerville, D., Frese, M., & Nayudu, M. (2020). Environmental gut bacteria in European honey bees (*Apis mellifera*) from Australia and their relationship to the chalkbrood disease. *Plos one*, 15(8), e0238252.
- Kinati, C., Tolemariam, T., & Debele, K. (2011). Quality evaluation of honey produced in Gomma Woreda of South Western Ethiopia. *Livestock research for rural development*, 23(9), 06-14.
- Kishore, R. K., Halim, A. S., Syazana, M. N., & Sirajudeen, K. N. S. (2011). Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. *Nutrition research*, 31(4), 322-325.
- Kleman, K. T., Bannerman, T. L., & Kloos, W. E. (1993). Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *Journal of clinical microbiology*, 31(5), 1318-1321.
- Kloos, W. E., & Schleifer, K. H. (1986). Genus 4. *Staphylococcus* Rosenbach 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD, 2, 1013-1035.
- Kloos, W. E., & Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(1), 117-140.

- Knapp, A. P., Rehmus, W., & Chang, A. Y. (2020). Skin diseases in displaced populations: a review of contributing factors, challenges, and approaches to care. *International Journal of Dermatology*, 59(11), 1299-1311.
- Koehler, S. (2015). *Le miel dans la cicatrisation des plaies: un nouveau médicament?* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Kone, S. G. N., Toure, S., Bana, A., Kone, S. A., & Dogba, E. (2016). Traitement des plaies par le miel à Abidjan. *Mali médical*, 31(3).
- Kumar, S., Sandhir, R., & Ojha, S. (2014). Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of Lantana camara leaves. *BMC Research Notes*, 7, 1-9.
- Kunin C.M. 1997. Urinary Tract Infections. Detection, Prevention, and Management. Williams & Wilkins, 5th.edition
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6).
- Kramer, B., & Kanof, A. (1960). Diarrhea in children: a historical review. *The Journal of Pediatrics*, 57(5), 769-783.
- Kwakman, P. H., & Zaat, S. A. (2012). Antibacterial components of honey. *IUBMB life*, 64(1), 48-55.
- Laaidi, K., Laaidi, M., & Besancenot, J. P. (1997). Pollens, pollinoses et météorologie. *La météorologie*, 1997(20), 41-56.
- Lambert PA. *Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa*. *J RSoc Med*. 2002; 95(suppl 41):22-6.
- Lawal, R. A., Lawal, A. K., & Adekalu, J. B. (2009). Physico-chemical studies on adulteration of honey in Nigeria. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 12(15), 1080-1084.
- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2021). *A photographic atlas for the microbiology laboratory*. Morton Publishing Company.
- Lequet, L. (2010). *Du nectar à un miel de qualité: contrôles analytiques du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur* (Doctoral dissertation).

- Lewoyehu, M., & Amare, M. (2019). Comparative evaluation of analytical methods for determining the antioxidant activities of honey: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1685059.
- Liao, J., Li, C., Huang, J., Liu, W., Chen, H., Liao, S., ... & Rui, W. (2018). Structure characterization of honey-processed Astragalus polysaccharides and its anti-inflammatory activity in vitro. *Molecules*, 23(1), 168.
- López, B., Latorre, M. J., Fernández, M. I., Garcia, M. A., Garcia, S., & Herreroa, C. (1996). Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. *Food chemistry*, 55(3), 281-287.
- Loucif-Ayad, W., Achou, M., Legout, H., Alburaki, M., & Garnery, L. (2015). Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, 46, 392-402.
- Loup, J. P. E. V. (2015). Les secrets de la methode des 4 quadrants" laboratoire de diagnostic de l'institut de microbiologie du CHUV. 2014. Consulté le, 20.
- Louvreaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods in melissopalynology. *Bee World*, 59, 139-157.
- Low, N. H., & South, W. (1995). Determination of honey authenticity by capillary gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 78(5), 1210-1218.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), 1265-1273.
- Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of medical research*, 36(5), 464-467.
- Machado De-Melo, A. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Sancho, M. T., & Pascual-Maté, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of apicultural research*, 57(1), 5-37.

- Machado, A. M., Miguel, M. G., Vilas-Boas, M., & Figueiredo, A. C. (2020). Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules*, 25(2), 374.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Brock, T. D., & Brock, T. D. (2018).
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Pérez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases*, 8(1), 39-45.
- Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V., & Pages, J. M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1223-1229.
- Maki DG, Tambyah PA. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis*. 2001 7(2):342-7.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310.
- Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(2), 154-160.
- Mangin, L. (2016). Antibiotiques et résistances: enquête sur les connaissances et les comportements du grand public. *Université De Lorraine*.
- Marcazzan, G. L., Mucignat-Caretta, C., Marina Marchese, C., & Piana, M. L. (2018). A review of methods for honey sensory analysis. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 75-87.
- Mateo, R., & Bosch-Reig, F. (1998). Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars, and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 393-400.
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2003). Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of food protection*, 66(12), 2371-2376.
- Maurizio, A. (1959). Papierchromatographische Untersuchungen an Blütenhonigen und Nektar. *Les Annales de l'Abeille*, 2(4), 291-341.

- Maurizio, A. (1962). From the raw material to the finished product: honey. *Bee World*, 43(3), 66-81.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3), 571-577.
- Mercan, N., Guvensen, A., Celik, A., & Katircioglu, H. (2007). Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Natural Product Research*, 21(3), 187-195.
- Messadi AA, Lamia T, Kamel B, Salima Q, Monia M, Said BR. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care burn unit: a 5-year study, 2000-2004. *Burns*.2008; 34(8):1098-102.
- Mesele, T. L. (2021). Review on physico-chemical properties of honey in Eastern Africa. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 33-45.
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of chromatography A*, 1187(1-2), 18-24.
- Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a mini review. *J Infect Public Health*. 2009; 2(3):101-11.
- Moar, N. T. (1985). Pollen analysis of New Zealand honey. *New Zealand journal of agricultural research*, 28(1), 39-70.
- Mobley, H. L. and J. W. Warren. 1996. *Urinary Tract Infections: Molecular pathogenesis and Clinical Management*. ASM press
- Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1), 5-28.

- Molan, P. C. (1996). Authenticity of honey. In *Food authentication* (pp. 259-303). Boston, MA: Springer US.
- Molinari, G., Guzman, C. A., Pesce, A., & Schito, G. C. (1993). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *31*(5), 681-688.
- Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2012). Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *9*(1), 36-42.
- Moore, P. D., Webb, J. A., & Collison, M. E. (1991). *Pollen analysis*. Blackwell scientific publications.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(5), 1096-1101.
- Moreira, R. F. A., & De Maria, C. A. B. (2001). Glicídios no mel. *Química Nova*, *24*, 516-525.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, *455*(1-2), 29-60.
- Motari, E. M. (2010). *Structural Studies of Oligosaccharides Attached to Proteins Expressed in Different Organisms and PEGylation of a non-Glycosylated Protein* (Doctoral dissertation, The Ohio State University).
- Muli, E., Munguti, A., & Raina, S. K. (2007). Quality of honey harvested and processed using traditional methods in rural areas of Kenya. *Acta Veterinaria Brno*, *76*(2), 315-320.
- N. A., Nazarchuk, O. A., Babina, Y. M., Chornopyschuk, R. M., & Kulyk, A. V. (2020). Antimicrobial activity of antiseptics in the prevention of postoperative infectious complications. *Biomedical and biosocial anthropology*, (40), 33-36.
- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N., & Nagashima, T. (2006). Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food chemistry*, *97*(2), 256-262.

- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., & Suzuki, N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food chemistry*, 75(2), 237-240.
- Nanda, A. S., & Nakao, T. (2003). Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. *Animal Science Journal*, 74(6), 443-455.
- Nauciel, C., & Vildé, J. L. (2005). *Bactériologie médicale*. Elsevier Masson.
- Neely, A. N., & Maley, M. P. (2000). Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *Journal of clinical microbiology*, 38(2), 724-726.
- Nicolson, S. W., & Thornburg, R. W. (2007). Nectar chemistry. In *Nectaries and nectar* (pp. 215-264). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Noto, M. J., Fox, P. M., & Archer, G. L. (2008). Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, *mecA*, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1221-1229.
- Oddo, L. P., Piazza, M. G., Sabatini, A. G., & Accorti, M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26(6), 453-465.
- Oddo, L. P., Piro, R., Bruneau, É., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., ... & Ruoff, K. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S38-S81.
- Oka, M., Shimizu, K., & Yazaki, K. (1987). Hyperon-nucleon and hyperon-hyperon interaction in a quark model. *Nuclear Physics A*, 464(4), 700-716.
- Ouchemoukh, S., Louaileche, H., & Schweitzer, P. (2007). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food control*, 18(1), 52-58.
- Ouchemoukh, S., Schweitzer, P., Bey, M. B., Djoudad-Kadji, H., & Louaileche, H. (2010). HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food chemistry*, 121(2), 561-568.
- Pagès, J. M., & Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 826-833.

- Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*.
- Paramás, A. M. G., Báñez, J. A. G., Marcos, C. C., García-Villanova, R. J., & Sánchez, J. S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food chemistry*, 95(1), 148-156.
- Pasias, I. N., Raptopoulou, K. G., Makrigennis, G., Ntakoulas, D. D., Lembessis, D., Dimakis, V., ... & Proestos, C. (2022). Finding the optimum treatment procedure to delay honey crystallization without reducing its quality. *Food Chemistry*, 381, 132301.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Patel, S., & Cichello, S. (2013). Manuka honey: an emerging natural food with medicinal use. *Natural products and bioprospecting*, 3, 121-128.
- Pérez, R. A., Iglesias, M. T., Pueyo, E., González, M., & de Lorenzo, C. (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(2), 360-365.
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition research reviews*, 26(2), 118-129.
- Persano Oddo, L., Piazza, M. G., & Pulcini, P. (1999). Invertase activity in honey [unifloral honey, freshness]. *Apidologie (France)*.
- Phan, G. (2008). *Etude structurale du système d'efflux membranaire MexXY-OprM impliqué dans la résistance aux antibiotiques chez Pseudomonas aeruginosa* (Doctoral dissertation, Université René Descartes-Paris V).
- Piana, M. L., Oddo, L. P., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., & Declerck, C. G. (2004). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S26-S37.
- Pillco, A., & de la Peña, E. (2014). Ames test (bacterial reverse mutation test): Why, when, and how to use. *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, 3-22.

- Piquepaille, C. (1987). Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales.
- Popek, S. (2002). A procedure to identify a honey type. *Food Chemistry*, 79(3), 401-406.
- Pozo, M. I., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2015). Impact of microorganisms on nectar chemistry, pollinator attraction and plant fitness. *Nectar: production, chemical composition and benefits to animals and plants*, 41.
- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018). Microbiologie. De Boeck Supérieur.
- Prica, N., Baloš, M. Ž., Jakšić, S., Mihaljev, Ž., Kartalović, B., Babić, J., & Savić, S. (2014). Moisture and acidity as indicators of the quality of honey originating from Vojvodina region. *Archives of veterinary medicine*, 7(2), 99-109.
- Purrello, S. M., Daum, R. S., Edwards, G. F. S., Lina, G., Lindsay, J., Peters, G., & Stefani, S. (2014). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(2), 61-69.
- Quézel, P., Santa, S., Schotter, O., & Emberger, L. (2000). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. (*No Title*).
- Rahmani, A., & Meradi, L. (2023). *Caractérisation de la résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées de plusieurs biotopes* (Doctoral dissertation, Université De Larbi Ben M'hidi Oum EL Bouaghi).
- Ranneh, Y., Akim, A. M., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z. A., ... & Bakar, M. F. A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-17.
- Rahal, J. J.; Extended- spectrum B - lactamases: how big is the problem ?*Clin.Microbiol.Infect.* 2000 ; 6 (Suppl,2)2-6.
- Ranjan KP, Ranjan N, Bansal SK, Arora DR. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India. *J Lab Physicians*. 2010; 2(2):74-7.

- Ranneh, Y., Ali, F., Zarei, M., Akim, A. M., Abd Hamid, H., & Khazaai, H. (2018). Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. *Lwt*, 89, 1-9.
- Rao, P. S., & Beri, R. M. (1951, June). Analysis of sugars using paper chromatography (Horizontal migration). In *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section A* (Vol. 33, pp. 368-372). Springer India.
- Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 657-664.
- Rasheed, M. U., & Ahmed, Z. (2010). Phenotypic methods of greater accuracy to detect the mecA gene product for the recognition of MRSA in resource constraint settings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(9), 741-744.
- Ratiu, I. A., Al-Suod, H., Bukowska, M., Ligor, M., & Buszewski, B. (2019). Correlation study of honey regarding their physicochemical properties and sugars and cyclitols content. *Molecules*, 25(1), 34
- Rattanathanalerk, M., Chiewchan, N., & Srichumpoung, W. (2005). Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice. *Journal of Food engineering*, 66(2), 259-265.
- Rebiai, A., Lanez, T., & Chouikh, A. (2015). Physicochemical and biochemical properties of honey bee products in south Algeria. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 16(2), 133.
- Rebiai, A., & Lanez, T. (2014). Comparative study of honey collected from different flora of Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 6(1), 48-55.
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
- Robert, J.A. , Dominique, G. J., and Martin, L. N. ;Immunology of pyelonephritis in the primate model: Live versus heat-killed bacteria *Kidne Int.* 1981; 19:297-300.
- Rohrer, J. (2012). Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (hpae-pad). *Thermo Fisher Scientific, Technical Note*, 20(1), 1-12.

Ressner RAMC, Griffith ME, Rasnake MS, Hospental DR, Wolf SE. Outcomes of bacteremia in burn patients involved in combat operations overseas. *J Am Coll Surg*. 206(3)2008:439-44.

Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., Mata-Bilbao, M. L., Izquierdo-Pulido, M., Waterhouse, A. L., & Lamuela-Raventós, R. M. (2008). Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(6), 493-498.

Rosebury, T. (1962). Microorganisms indigenous to man. *Microorganisms Indigenous to Man*.

Ruttner, F., Tassencourt, L., & Louveaux, J. (1978). Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* LI Material and methods. *Apidologie*, 9(4), 363-381.

Sahki Soumia, M. N. (2021). Isolement de staphylocoques pathogènes à partir du lait de mammite et sa sensibilité vis-à-vis d'une huile essentielle.

Sancho, M. T., Mato, I., Huidobro, J. F., Fernández-Muiño, M. A., & Pascual-Maté, A. (2013). Nonaromatic organic acids of honeys. *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, 447-458.

Savageau, M. A. (1983). *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *The american naturalist*, 122(6), 732-744.

Bousquet-Mélou, A., Chauvin, C., & Toutain, P. L. (2011). Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Productions Animales* 2 (24), 199-204.(2011).

Sahin H, Kolayli S, Beykaya M. Investigation of Variations of Invertase and Glucose Oxidase Degrees against Heating and Timing Options in Raw Honeys. *J Chem*. 2020;2020.

Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B., & González-Manzano, S. (2019). Plant phenolics as functional food ingredients. *Advances in food and nutrition research*, 90, 183-257.

Sarr, H. (2018). Caractérisation phénotypique des bêtalactamases de souches d'entérobactéries multirésistantes isolées de divers produits.

Savini, V., Catavittello, C., Bianco, A., Balbinot, A., & D'Antonio, D. (2009). Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 4(2), 123-129.

- Sawyer, R., & Pickard, R. S. (1988). *Honey identification*. Cardiff Academic.
- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food chemistry*, 118(2), 391-397.
- Saxena, S., Tripathi, J., Chatterjee, S., & Gautam, S. (2017). Natural predominance of abscisic acid in Pongamia pinnata ("Karanj") honey contributed to its strong antimutagenicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(23), 4624-4633.
- Schechner V, Gottersman T, Schwartz O, Korem M, Maor Y, Rahav G, et al. Pseudomonas aeruginosa bacteremia upon admission: risk factors for mortality and influence of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 71(1):38-45.
- Schramm, D. D., Karim, M., Schrader, H. R., Holt, R. R., Cardetti, M., & Keen, C. L. (2003). Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1732-1735.
- Serrano, S., Villarejo, M., Espejo, R., & Jodral, M. (2004). Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. *Food chemistry*, 87(4), 619-625.
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., & Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 1-5.
- Simenel, R., Adam, A., Crousilles, A., Amzil, L., & Aumeeruddy-Thomas, Y. (2015). La domestication de l'abeille par le territoire. Un exemple d'apiculture holiste dans le sud marocain. *Techniques & Culture. Revue semestrielle d'anthropologie des techniques*, (63), 258-279.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Sipahi, H., Aydoğan, G., Helvacioğlu, S., Charehsaz, M., Guzelmeric, E., & Aydin, A. (2017). Antioxidant, antiinflammatory and antimutagenic activities of various kinds of Turkish honey. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1), 7.

Smith, O. C. N. C. (1965). Vol. VI [94], 651.

Solayman, M., Islam, M. A., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M. I., Alam, N., & Gan, S. H. (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 219-233.

Solayman, M., Shapla, U. M., & Khalil, I. (2023). Furfural and Hydroxymethylfurfural. *Honey: Composition and Health Benefits*, 152-166.

Somme, L., Vanderplanck, M., Michez, D., Lombaerde, I., Moerman, R., Wathelet, B., ... & Jacquemart, A. L. (2015). Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie*, 46, 92-106.

de Sousa, J. M. B., de Souza, E. L., Marques, G., de Toledo Benassi, M., Gullón, B., Pintado, M. M., & Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 645-651.

Speer, S. L., Schreyack, G. E., & Bowlin, G. L. (2015). Manuka honey: A tissue engineering essential ingredient. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 6(2), 1.

ISO 8586-2. (1994). Sensory analysis—General guidance for the selection, training and monitoring of assessors—Part 2: Experts. *International Organization for Standards*.

Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (1974). Biology biochemistry management. *Berlin: Heidelberg*.

Stavropoulou, E., Voidarou, C., Rozos, G., Vaou, N., Bardanis, M., Konstantinidis, T., ... & Tsakris, A. (2022). Antimicrobial evaluation of various honey types against carbapenemase-producing Gram-negative clinical isolates. *Antibiotics*, 11(3), 422.

Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment.

Trugo, L. C., & Finglas, P. M. (2003). Encyclopedia of food sciences and nutrition. *L. C. Trugo and PM Finglas, Eds*, 1498-1506.

Stegg, E., & Montag, A. (1988). Quantitative determination of aromatic carbonic acids in honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 187, 115-120.

- Stinson, E. E., Subers, M. H., Petty, J., & White Jr, J. W. (1960). The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 89(1), 6-12.
- Taormina, P. J., Niemira, B. A., & Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International journal of food microbiology*, 69(3), 217-225.
- Taormina, P. J., Niemira, B. A., & Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International journal of food microbiology*, 69(3), 217-225.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.
- Terrab, A., Díez, M. J., & Heredia, F. J. (2002). Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food chemistry*, 79(3), 373-379.
- Tesfaye, B., Begna, D., & Eshetu, M. (2016). Evaluation of physico-chemical properties of honey produced in Bale natural forest, Southeastern Ethiopia. *Int J Agricultural Sci Food Technology*, 2(1), 021-027.
- Tesfaye, O., Muleta, D., & Desalegn, A. (2022). In vitro antimicrobial properties of *Apis mellifera* L. and *Meliponula beccarii* L. honeys from Kellem and West Wollega Zones, Western Ethiopia. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 65-75.
- Soukaina, T. (2019). *Epidémiologie des entérobactéries multirésistantes productrices de carbapénèmase à l'HIT* (Doctoral dissertation, These).
- Tiwari, H. K., & Sen, M. R. (2006). Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infectious diseases*, 6, 1-6.
- Tomás-Barberán, F. A., Blázquez, M. A., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., & Tomás-Lorente, F. (1992). A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochemical Analysis*, 3(4), 178-181.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E. S., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95(4), 653-657.

- USDA. (1985). United States standards for grades of extracted honey. *Agricultural Marketing Service Fruit and Vegetable Division Processed Products Branch*.
- Vaillancourt Jr, R. (2015). Comparaison de génomes de souches d'*Escherichia coli* et *Escherichia fergusonii* isolées d'animaux de fermes et évaluation de leur potentiel de virulence.
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology*, 38, 369-380.
- Von Buttel-Reepen, H. B. (1906). *Apistica. Beitrage Zur Systematik, Biologie, Sowie Zur Geschichtlichen Und Geographischen Verbreitung Der Honigbiene (Apis Mellisica L.) Ihrer Varietaeten Und Der Uebrigen Apis-Arten, Von HV Buttel-Reepen*.
- Vela, L., de Lorenzo, C., & Perez, R. A. (2007). Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 1069-1075.
- Vit, P. (2012). *Melipona favosa* pot-honey from Venezuela. In *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 363-373). New York, NY: Springer New York.
- Von Der Ohe, W., Oddo, L. P., Piana, M. L., Morlot, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S18-S25.
- Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., & Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16.
- Wagenvoort, J. H. T., Sluijsmans, W., & Penders, R. J. R. (2000). Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. *Journal of Hospital Infection*, 45(3), 231-234.
- Wahdan, H. A. L. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, 26, 26-31.
- Wang, X. H., Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2004). Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*, 69(2), fct96-fct101.
- Wang, X. H., Andrae, L., & Engeseth, N. J. (2002). Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(23), 6923-6928.

- Weston, R. J., & Brocklebank, L. K. (1999). The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, 64(1), 33-37.
- White, J. W., & Doner, L. W. (1980). Honey composition and properties. *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook*, 335, 82-91.
- White Jr, J. W., Subers, M. H., & Schepartz, A. I. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*, 73(1), 57-70.
- White, J. W. (1994). The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. *Bee world*, 75(3), 104-117.
- White, J. W. (1962). *Composition of American honeys* (No. 1261). US Department of Agriculture.
- White Jr, J. W. (1969). Moisture in honey: review of chemical and physical methods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 52(4), 729-737.
- White Jr, J. W. (1979). Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural, and proline in honey in honey: collaborative study. *Journal*.
- White Jr, J. W., & Maher, J. (1953). Transglucosidation by honey invertase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 42(2), 360-367.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular medical microbiology* (pp. 753-767). Academic Press.
- Zappala, M., Fallico, B., Arena, E., & Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food control*, 16(3), 273-277.
- Zerrouk, S. H., Fallico, B. G., Arena, E. N., Ballistreri, G. F., & Boughediri, L. A. (2011). Quality evaluation of some honey from the central region of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 243-248.
- Zerrouk, S., Seijo, M. C., Escuredo, O., & Rodríguez-Flores, M. S. (2018). Characterization of *Ziziphus lotus* (jujube) honey produced in Algeria. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 166-174.

Zimmer, B., Mirrett, S., Reller, L. B., Weinstein, M., & Hindler, J. (2006). Automated methods for antibiotic susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 4.

Zinner, S. H. (2007). Antibiotic use: present and future. *MICROBIOLOGICA-BOLOGNA*, 30(3), 321.

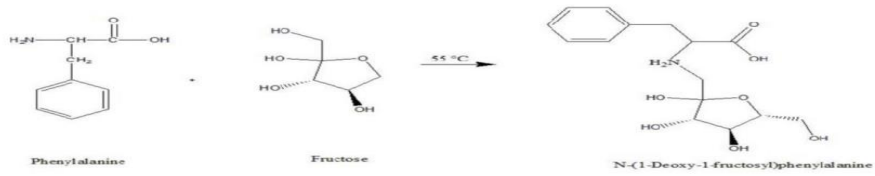
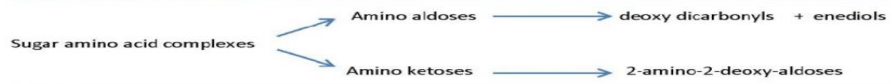
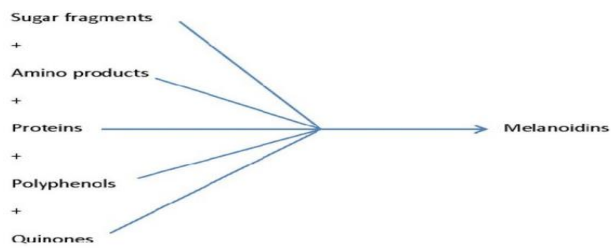
Živkov-Baloš, M., Popov, N., Vidaković, S., Ljubojević-Pelić, D., Pelić, M., Mihaljev, Ž., & Jakšić, S. (2018). Electrical conductivity and acidity of honey.

Zulkhairi Amin, F. A., Sabri, S., Mohammad, S. M., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., ... & Zawawi, N. (2018). Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2018.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Réaction de Maillard dans le miel

La réaction de Maillard est associée aux réactions des sucres et des acides aminés dans l'eau. Elle est responsable du brunissement des aliments pendant les processus de chauffage. La réaction de Maillard est définie comme une interaction entre les groupes carbonyles des sucres et les groupes d'acides aminés, de protéines ou d'autres composés azotés, conduisant à la production de composés bruns appelés mélanoidines (Zeng *et al.*, 2016). La réaction de Maillard comporte trois stades : le stade précoce, le stade avancé et le stade final. La première étape de la réaction de Maillard implique une combinaison de sucres et de groupes amino, ce qui conduit à la formation de produits d'Amadori (complexes de sucres et d'acides aminés) tels que la N-(1-Déoxy-1-fructosyl) phénylalanine, qui a récemment été trouvée dans des échantillons de miel d'acacia chauffé (Yan *et al.*, 2022). Au stade avancé ou intermédiaire, les produits d'Amadori sont décomposés en différents composés dont les amino aldoses et les cétooses. Les amino aldoses sont ensuite dégradés pour former des déoxy dicar- bonyles et des enediols, tandis que les amino cétooses sont convertis en 2-amino-2-déoxy-aldoses par réarrangement de Heyns. Les réactions de l'étape intermédiaire sont catalysées par les acides (Amaya-Farfan *et al.*, 2021). L'étape finale de la réaction de Maillard est associée à la formation de polymères de mélanoidine, qui sont formés à partir de fragments de sucre, de produits aminés, de polyphénols, de quinones et de protéines. En général, les mélanoidines sont associées au brunissement des aliments (Nagai *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017 ; Brudzynski *et al.*, 2013)

**Early stage****Advanced (intermediate) stage****Final stage**

Stages of the Maillard reaction in honey (Nagai *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017 ;Brudzynski *et al.*,2013)

**Annexe 2 : Tableau de lecture du système d'identification API 20 E (Bio-Mérieux).**

Tests	Substrats	Réactions enzymatiques	Résultats	
			négatifs	Positifs
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	B-galactosidase	Incolore	Jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Rouge/Orangé
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/Orangé
<b>CIT</b>	Citrate de Sodium	Utilisation de citrate	Vert pale/ Grisâtre	Bleu-vert/ Vert
<b>H2S</b>	Thiosulfate de Sodium	Production D'H2S	Incolore/Grisâtre	Dépôt noir/ Fin liseré
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/Orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/ immédiat	
			Jaune	Marron foncé
<b>IND</b>	Tryptophane	Production D'indole	JAMES (immédiat) ou IND (2mn)	
			JAMES Incolore Vert pale/ jaune IND jaune	James Rose IND Anneau Rouge
<b>VP</b>	Pyruvate de Sodium	Production D'acétoine	VP1+VP2( 10 mn)	
			Incolore	Rosé/Rouge
<b>GEL</b>	Gélatinase de Khon	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion de pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune

<b>Man</b>	mannitol	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>MEL</b>	Melibiose	Ferment/Oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Ferment/oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>ARA</b>	Arabinose	Ferment / oxyde	Bleu/Bleu vert	Jaune
<b>OX</b>		Cytochrome Oxydase	OX (1-2 mn)	
			Incolore	Violet
<b>No<sub>3</sub> – No<sub>2</sub></b>	Tube Glu	Production de (No <sub>2</sub> ) Production de (No <sub>3</sub> )	NIT 1 + NIT 2 (2 – 3 mn)	
			Jaune	Rouge
			ZN	
			Rouge	Jaune



**Annexe 3 : Tableau de lecture du système d'identification API 20 NE  
(Bio-Mérieux).**

TESTS	SUBSTRAT	REACTION /ENZYME	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	Potassuim nitrate	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1 + NIT2 (2 à 5 min)	
			incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	Zn (5min)	
			rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	Formation d'indole	JAMES (immédiate)	
			Incolore/vert-pale/ jaune	rose
GLU	D-glucose	Fermentation du glucose	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Oranger/rose/rouge
URE	urée	uréase	Jaune	Oranger/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (esculine)	Jaune	Grise/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse protéase gelatine	Pas de diffusion de pigment	diffusion de pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside	B-galactosidase(para-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosidases)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Assmilation(glucose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	Assmilation(arabinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Assmilation(mannose)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Assmilation(mannitol)	Transparence	Trouble
MAG	N-acétylglucosamine	Assimilation (N-acétylglucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation (maltose)	Transparence	Trouble
GNT	Potassuim gluconate	Assimilation (potassuim gluconate)	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	Assimilation (acide caprique)	Transparence	Trouble

<b>ADI</b>	Acide adipique	Assimilaion(acide adipique)	Transparence	Trouble
<b>MILT</b>	Acide malique	Assimilaion(acide malque)	Transparence	Trouble
<b>CIT</b>	Trisodum citrate	Assimilation (trisodum citrate)	Transparence	Trouble
<b>PAC</b>	Acide phénylacétique	Assimilation (Acide phénylacétique)	Transparence	Trouble
<b>OX</b>		Cytochrome oxydase	OX (1-2 mn)	
			Incolore	Violet

#### Annexe 4 : Tableau de lecture du système d'identification API STAPH (Bio-Mérieux).

Tests	Substrat	Caractères	Résultat	
<b>0</b>	Aucun	Témoin négatif	négatif	Positif
<b>GLU</b>	D-glucose	Témoin positif	Rouge	-
<b>FRU</b>	D-fructose	Acidification à partir du carbohydrate	rouge	Jaune
<b>MNE</b>	D-mannose			
<b>MAL</b>	Maltose			
<b>LAC</b>	Lactose			
<b>TRE</b>	D-tréhalose			
<b>MAN</b>	D-mannitol			
<b>XLT</b>	Xylitol			
<b>MEL</b>	D-melibiose			
<b>NIT</b>	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en Nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 mn	
			Incolore/rose	Rouge
<b>PAL</b>	β-naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Jaune	Violet
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			Incolore/rose	Violet/rose
<b>RAF</b>	Raffinose	Acidification à partir du carbohydrate	Rouge	Jaune
<b>XYL</b>	Xylose			
<b>SAC</b>	Saccharose			

<b>MDG</b>	$\alpha$ -méthyl-D-glucosamine			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b>ADH</b>	Arginine	Argininedihydrolase	Jaune	Orange/rouge
<b>URE</b>	Urée	Uréase	jaune	Rouge/violet

## Annexe 5 : Les antibiotiques commercialisés utilisés

Famille	Antibiotique	Sigle	Charge du disque ( $\mu\text{g}$ )	Diamètre d'inhibition	
				S	R
<b><math>\beta</math>- lactame</b>	Ampicilline	AM	30	$\geq 19$	<
	Amoxicilline	AMX	25	$\geq 21$	14
	Amoxicilline - Acide clavulanique	AMC	20/ 10	$\geq 21$	<
					14
					<
					14
	Ticarcilline	TIC	75	$\geq 24$	<
	Ticarcilline - Acide clavulanique	TIM	75/10	$\geq 24$	22
	Pipéracilline	PIP	75	$\geq 22$	<
					22
					<
					18
	Céfalotine	CF	30	$\geq 18$	<
	Céfoxitine	FOX	30 $\mu\text{g}$	$\geq 22$	12
	Céfalexine	CN	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	<
Céfazoline	CZ	30 $\mu\text{g}$	$\geq 18$	15	
Céfotaxime	CTX	30 $\mu\text{g}$	$\geq 26$	<	
Céftazidime	CAZ	30 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	12	
				<	
				12	
				<	
				23	
				<	
				19	

<b>Carbapénème</b>	Imipénème	IMI	10	$\geq 24$	$< 17$
	Aztréonam	ATM	30	$\geq 23$	$< 21$
<b>Aminoside</b>	Kanamycine	K	10 $\mu\text{g}$	$\geq 17$	$< 15$
	Tobramycine	TM	10 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	$< 14$
	Amikacine	AN	10 $\mu\text{g}$	$\geq 17$	$< 15$
	Gentamicine	GM	10 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	$< 14$
<b>Phénicol</b>	Chloramphénicol	C	30 $\mu\text{g}$	$\geq 23$	$< 19$
<b>Sulfamide</b>	Sulfamide	S	200 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	$< 12$
	Triméthoprime	TMP	5 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	$< 12$
	Sulfaméthoxzole - Triméthoprime	SXT	125/23,7 5	$\geq 16$	$< 10$
<b>Quinolone</b>	Acide nalidixique	NA	30 $\mu\text{g}$	$\geq 20$	$< 15$
	Acide pipémidique	PI	20 $\mu\text{g}$	$\geq 19$	$< 14$
<b>Fluroquinolone</b>	Pefloxacine	PEF	5 $\mu\text{g}$	$\geq 22$	$< 16$
	Ofloxacine	OFX	5 $\mu\text{g}$	$\geq 22$	$< 16$
<b>Macrolide</b>	Erythromycine	E	15UI	$\geq 22$	$< 17$
<b>Lincosamide</b>	Lincomycine	L	15 $\mu\text{g}$	$\geq 21$	$< 17$

<b>Streptogramine</b>	Pristinamycine	P	15µg	≥ 22	< 19
<b>Divers</b>	Acide fusidique	AF	10µg	≥ 22	<
	Fosfomycine	FOS	50µg	≥ 22	17
	Rifampicine	R	30µg	≥ 22	<
	Vancomycine	VA	30µg	≥ 17	17
					<
					17
					-

## Annexe 6 : Milieux de culture utilisés pour les tests de génotoxicité

### 1. Vogel–Bonner (VB X50)

#### a. Composition

Sulfate de Magnesium (MgSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O).....	10 g
Acide Citrique monohydraté.....	100 g
Phosphate de Potassium dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	500g
Phosphate de Sodium ammonium (Na <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O).....	175 g
Eau distillée chaude (60°C).....	650ml

#### b. Préparation

Après dissolution complète de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7-7,2. Stériliser à 121°C pendant 30mn. Laisser refroidir et conserver à l'abri de la lumière à température ambiante.

### 2. Solution histidine/biotin (0.5 mM)

#### a. Composition

Eau distillée.....	1000 ml
D-biotine.....	124 mg
L-Histidine-HCl.....	96 mg

### **b. Préparation**

Après dissolution complète de tous les ingrédients dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7,2. Stériliser par filtration en utilisant un microfiltre (0.45µm). Conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

## **3. Solution de glucose (10%)**

### **a. Composition**

Eau distillée.....	700 ml
Glucose.....	100mg

### **b. Préparation**

Après dissolution complète du glucose dans l'eau distillée. Stériliser à 121 °C pendant 20 min. Conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

## **4. Gélose minimale agar**

### **a. composition**

Eau distillée .....	900 ml
Agar.....	15 g
VB X50.....	0 ml
Solution de Glucose (10% v/v).....	50 ml

### **b. Préparation**

Ajouter l'agar à l'eau distillée. Stériliser à 121°C pendant 30 min, laisser refroidir jusqu'à 65°C. Ajouter 20 ml de la solution stérile de VB X50. Mélanger et rajouter 50 ml de la solution de glucose (10 % v/v); mélanger et laisser refroidir, ensuite conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

## 5. Top agar avec de l'histidine/biotine

### a. composition

Eau distillée.....	900 ml
Agar.....	6 g
NaCl.....	6g
Solution Histidine/biotine.....	100 ml

### b. Préparation

Ajouter l'agar et le chlorure de sodium à l'eau distillée. Stériliser à 121°C pendant 30 min, laisser refroidir jusqu'à 65°C. Ajouter 100 ml de la solution d'histidine/biotine. Mélanger et conserver à l'abri de la lumière à température ambiante.

## 6. Solution biotine

### a. Composition

Eau distillée.....	100 ml
Biotine.....	10mg

### b. Préparation

Après dissolution complète de la biotine dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7-7,2. Stériliser par filtration en utilisant un microfiltre (0.45µm). Conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

## 7. Solution histidine

### a. Composition

Eau distillée.....	100 ml
L-Histidine-HCl.....	500 mg

**b. Préparation**

Après dissolution complète de l'histidine dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7-7,2. Stériliser par filtration en utilisant un microfiltre (0.45µm). Conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

**8. Solution cristal violet****a. Composition**

Eau distillée.....	100 ml
Cristal violet.....	100 mg

**b. Préparation**

Après dissolution complète du cristal violet dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7-7,2. Conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

**9. Tampon Soduim-Phosphate****a. Composition**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	13.8g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	14.2g/L

**b. Préparation**

Prendre 120 ml de la solution NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et mélanger avec 880 ml de la solution Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Stériliser à 121°C pendant 30 min, laisser refroidir et conserver à l'abri de la lumière à température ambiante.

**10. Co-factors pour milieu S9 mix****a. Composition**

---

---

Eau distillée.....	900 ml
D-Glucose-6-Phosphate.....	1.6 g
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP).....	3.5 g
Magnesium chloride (MgCl).....	1.8 g
Potassium chloride (KCl).....	2.7 g
Sodium phosphate, dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O).....	12.8 g
Sodium phosphate, monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O).....	2.8g

**b. Préparation**

Après dissolution complète des ingrédients dans l'eau distillée. Stériliser les cofacteurs par filtration (0.45 µm). Conserver à -20 °C.

**Annexe 7 : Appareillage utilisés**

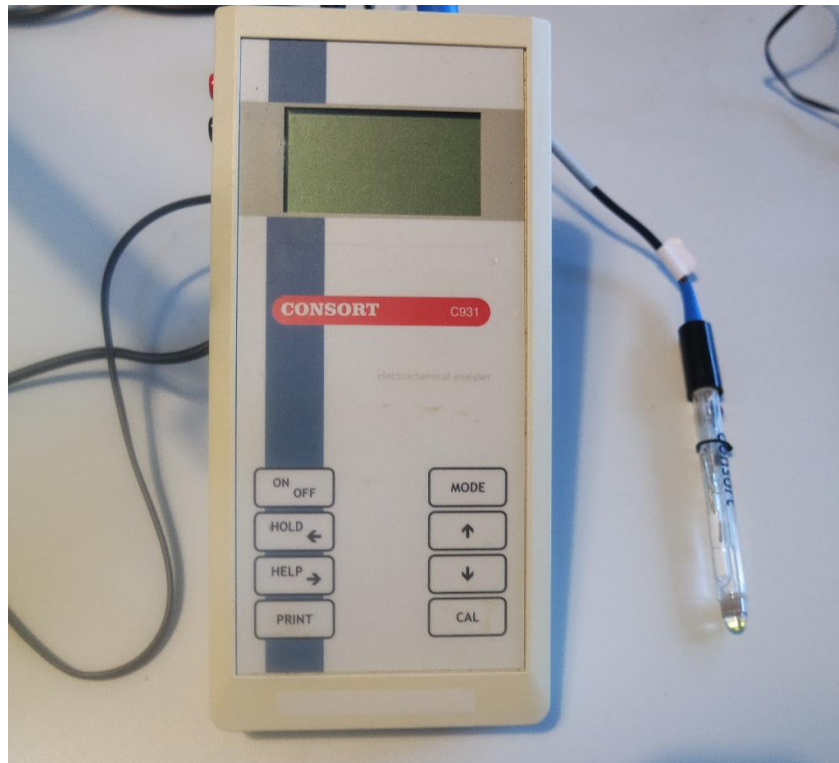


**Figure 65:** Réfractomètre Abbé-typ (RF 490, Euromex holland)

<https://scientific-instruments.eu/product/abbe-laboratory-refractometer/>



**Figure 66** : Le pH-mètre (CRISON 2000)



**Figure 57:** Conductimètre (consort C931)

**Annexe 8** :Critères pour la description du miel, la caractérisation du profil sensoriel et l'évaluation des miels monofloraux (Marcazzan *et al.*, 2018).

Critère	Définition	Référence
<b>Intensité globale</b>	<b>olfactive</b> Force des stimuli perçus par les récepteurs olfactifs via la voie nasale ou rétro-nasale	-
<b>Floral</b>	Odeur rappelant les fleurs	Fleur d'oranger (eau distillée), $\beta$ -ionone (sous-famille "fine") rose, ylang ylang, phénylacétaldéhyde (sous-famille "capiteuse")
<b>Fruité</b>	Odeur rappelant les fruits	Arôme de fruits (fraise, poire, pomme, framboise) (sous-famille "fruits frais") acétate d'isoamyle, $\gamma$ -décylactone, $\delta$ -décylactone (sous-famille "fruits tropicaux") sucre de raisin (moût concentré rectifié) (sous-famille "sirop") jus d'abricot, tomates pelées(sous-famille "fruits transformés") vin blanc (sous-famille "fruits fermentés")

<b>Chaud</b>	Odeur rappelant un aliment	au goût sucré Vanilline, benjoin, cire d'abeille (sous-famille "fine") lait concentré sucré, diacétyl (sous-famille "lactique") sucre de canne, furanone (sous-famille "confite") noisettes grillées, amandes grillées, cacahuètes grillées (sous-famille "grillé") sirop de malt d'orge, sirop de riz (sous-famille "malté") orge grillé, pain grillé (partie carbonisée) (sous-famille "brûlé")
<b>Aromatique</b>	Odeur rappelant quelque chose de frais, balsamique, cosmétique, pas nécessairement liée aux produits alimentaires	Clou de girofle, muscade (sous-famille "épicé") pin mugu, encens (sous-famille "résineux") musc de chêne (sous-famille "boisé") menthe poivrée, anis, eucalyptus (sous-famille "balsamique") citron, orange douce (sous-famille "agrume") coumarine (sous-famille "amande amère")
<b>Chimique</b>	Odeur généralement sans rapport avec les produits alimentaires, caractérisée	Phénol, goudron végétal (sous-famille "phénolique") savon de castille (non parfumé)

	par un certain degré d'agressivité	(sous-famille "savon") fumée de jute, extrait de mégot de cigarette (sous-famille "fumé") vinaigre de vin blanc (sous-famille "vinaigre") ammoniacque (sous-famille "ammoniacque")
<b>Végétal</b>	Odeur rappelant celle des plantes non aromatiques	Haricots frais crus, herbe coupée, feuilles de lierre fraîches (sous-famille "verte") Champignons de Paris crus, épinards légèrement bouillis (sous-famille "humide") Thé vert, foin (sous-famille "sèche")
<b>Animal</b>	Odeur rappelant le monde animal ou la décomposition	Oeuf dur, sulfure de diméthyle, méthionine (sous-famille "sulfurisé") cèpes séchés, bouillon cube (sous-famille "protéique") acide isovalérianique, acide butyrique, acide hexanoïque (sous-famille "valérianique") cassis (sous-famille "cassis")
<b>Douceur</b>	Goût de base produit par des solutions aqueuses	diluées de substances naturelles ou artificielles telles que le saccharose ou

		l'aspartame Saccharose dans l'eau 12 g/l
<b>Aigreurs</b>	Goût basique produit par des solutions aqueuses diluées de la plupart des substances acides (par exemple l'acide citrique et l'acide tartrique)	Acide citrique dans l'eau 0,6 g/l
<b>Salinité</b>	Goût basique produit par des solutions aqueuses diluées de diverses substances telles que le chlorure de sodium	Chlorure de sodium dans l'eau 2 g/l
<b>Amertume</b>	Goût basique produit par des solutions aqueuses diluées de diverses substances telles que la quinine ou la caféine	Caféine dans l'eau 0,27 g/l

L'odeur perçue par les voies rétro-nasales (arôme) est décrite comme indiquée dans les "descripteurs olfactifs" (Marcazzan *et al.*, 2018).

**Annexe 9:** Liste des disaccharides décrits dans le miel (Moreira et De Maria, 2001).

<b>Nom trivial</b>	<b>Nom systématique</b>
<b>Disaccharide</b>	
cellobiose	O-b -D-glycopyranosyl-(1 -> 4)-D-glycopyranose
gentiobiose	O-b -D-glycopyranosyl-(1 -> 6)-D-glycopyranose
isomaltose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 6)-D-glycopyranose
isomaltulose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 6)-D-frutofuranose
kojibiose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 2)-D-glycopyranose
laminaribiose	O-b -D-glycopyranosyl-(1 -> 3)-D-glycopyranose

leucrose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 5)-D-frutopyranosyl-(1 -> 5)-D-frutopyranose
maltose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 4)-D-glycopyranose
maltulose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 4)-D-fructose
melibiose	O-a -D-galactopyranosyl-(1 -> 6)-D-glycopyranose
neotrealose	O-a -D-glycopyranosyl-b -D-glycopyranoside
nigerose	nigerose O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 3)-D-glycopyranosyl-(1 -> 3)-D-glycopyranose
palatinose	palatinose O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 6)-D-fructose
saccharose	O-a -D-glycopyranosyl-b -D-frutofuranosidio
turanose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 3)-D-fructose

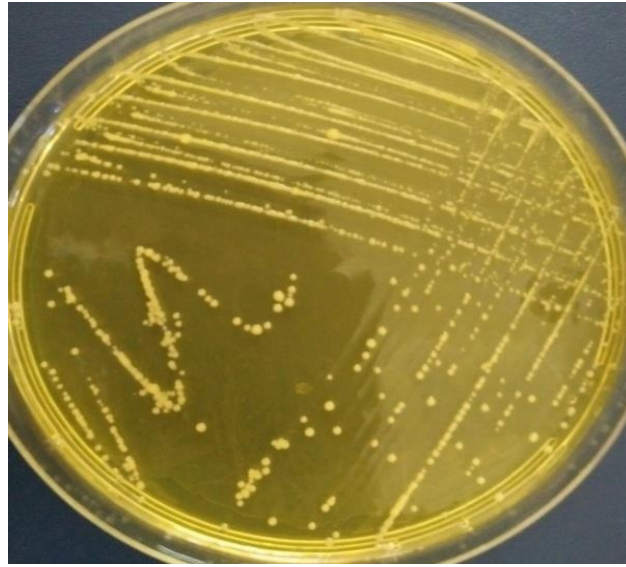
**Annexe 10** : Liste des trisaccharides décrits dans le miel.

### Trisaccharides

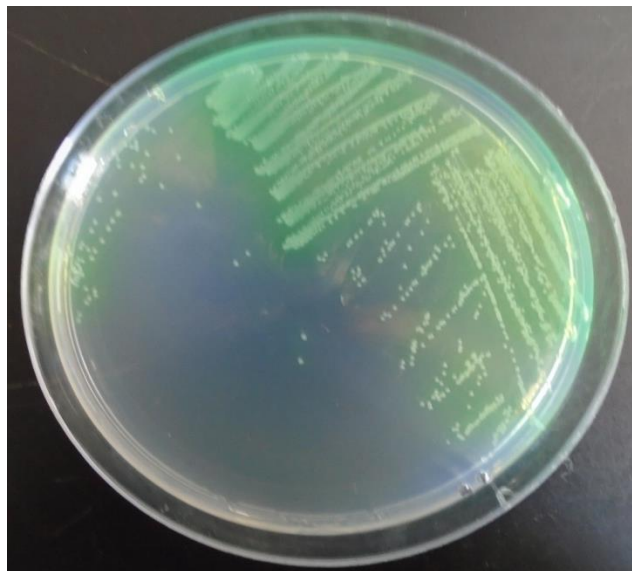
centose	O-a-D-glycopyranosyl-(1->4)-O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 2)-D-glycopyranose
1-cestose	O-a-D-glycopyranosyl-(1 -> 2)-b -D-frutofuranosyl-(1 -> 2)-b -D-frutofuranosidio
erlose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 -> 4)-a -D-glycopyranosyl-b -D-frutofuranosidium

4-a-gentiobiosylglycoside	O-b-D-glycopyranosyl-(1 → 6)-O-a -D-glycopyranosyl-(1->4)-D-glycopyranose
3-a-isomaltosylglycoside	O-a-D-glycopyranosyl-(1->6)-O-a-D-glycopyranosyl-(1 → 3)-D-glycopyranose
isomaltotriose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 → 6)-O-a-D-glycopyranosyl-(1->6)-D-glycopyranose
isopanose	O-a -D-glycopyranosyl-(1->4)-O-a-D-glycopyranosyl-(1 → 6)-D-glycopyranose
laminaritriose	O-b -D-glycopyranosyl-(1->3)-O-b-D-glycopyranosyl-(1 → 3)-D-glycopyranose
maltotriose	O-a -D-glycopyranosyl-(1->4)-O-a-D-glycopyranosyl-(1 → 4)-D-glycopyranose
mélézitose	O-a-D-glycopyranosyl-(1->3)-O-b-D-frutofuranosyl-(2->1)-a-D-glycopyranoside
panose	O-a -D-glycopyranosyl-(1->6)-O-a-D-glycopyranosyl-(1 → 4)-D-glycopyranose
raffinose	O-a-D-galactopyranosyl-(1->6)-O-a-D-glycopyranosyl-b -D-frutofuranosidium
teanderose	O-a -D-glycopyranosyl-(1 → 6)-a -D-glycopyranosyl-b -D-frutofuranidium

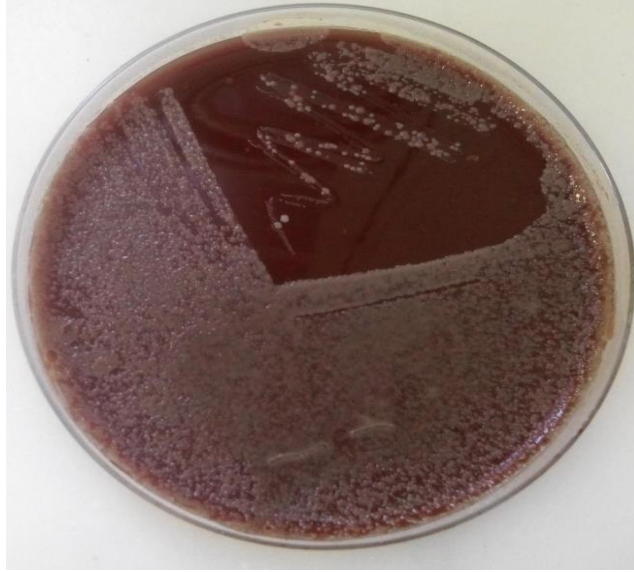
**Annexe 11** : Résultats de l'ensemencement et de l'identification par API système des souches



**Figure 21** : Souche de *S.aureus* sur milieu sélectif Chapman



**Figure 22** : Souche de *P.aeruginosa* sur milieu sélectif Cétrimide



**Figure 23 :** Souche d'*E.coli* sur milieu sélectif MacConkey



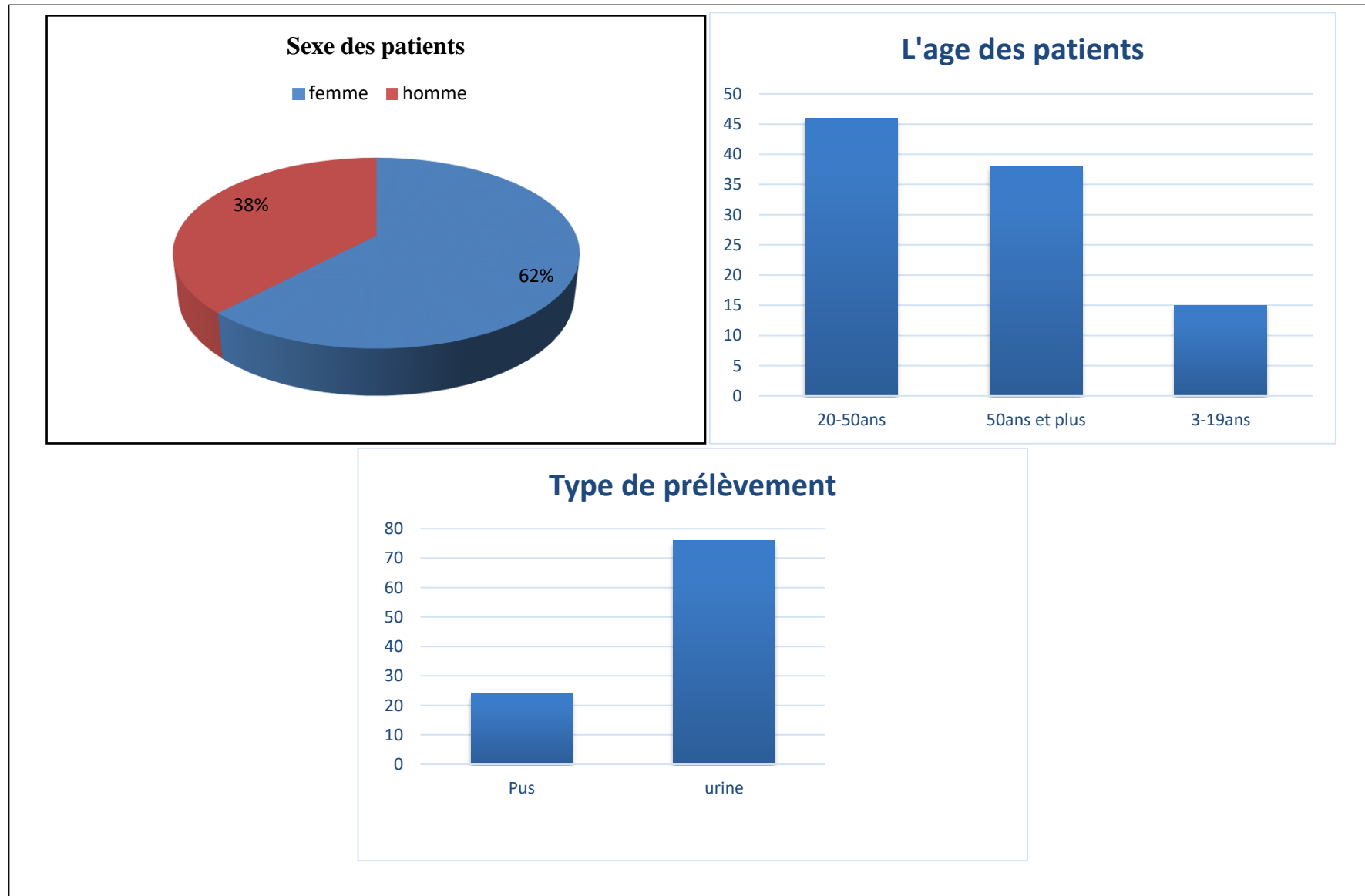
**Figure 24 :** Illustration du profil biochimique d'une souche *S.aureus* identifiée par système API STAPH.

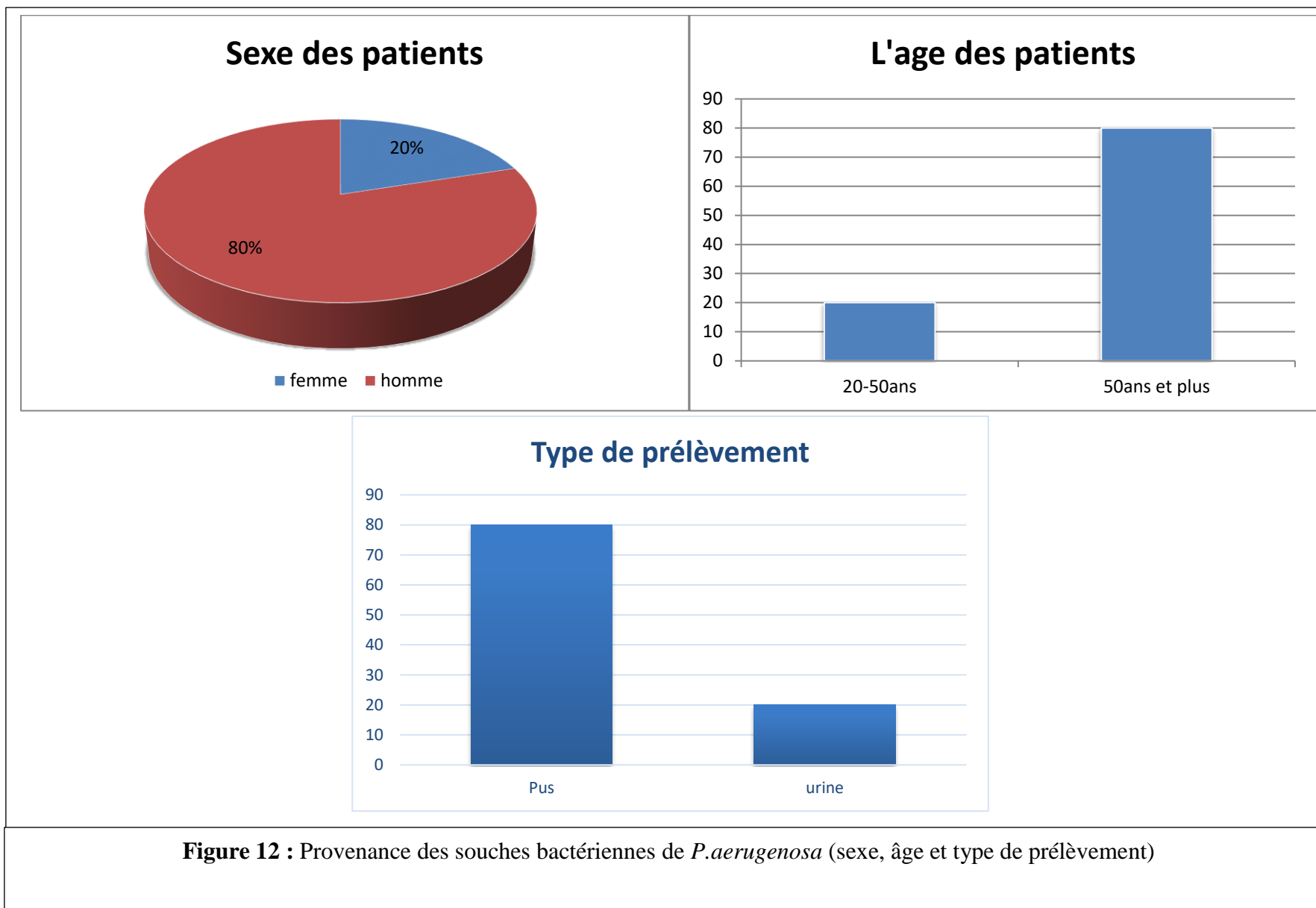


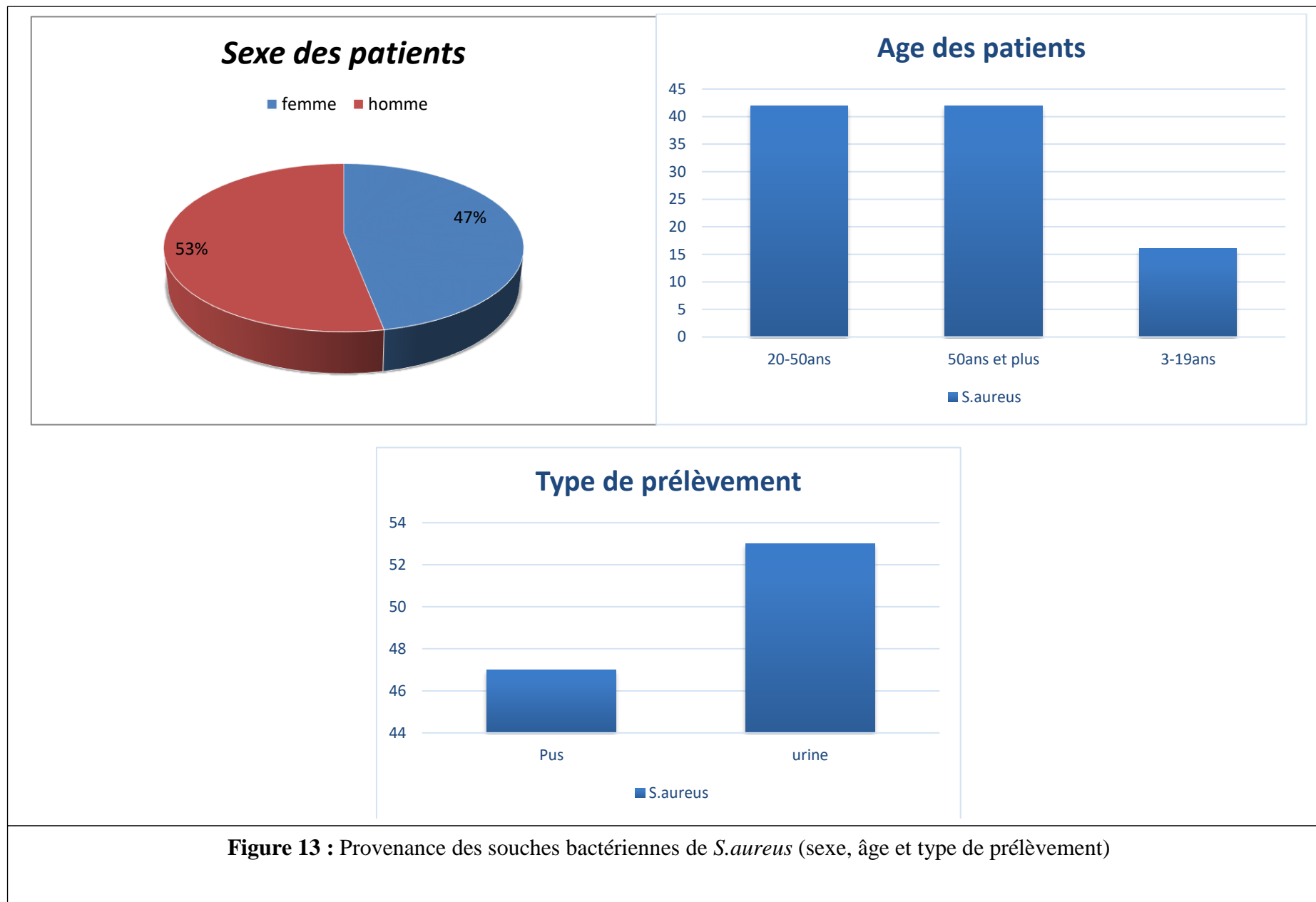
**Figure 25 :** Illustration du profil biochimique d'une souche d'*E.coli* identifiée par système API20E.



**Figure 26** : Illustration du profil biochimique d'une souche *P.aeruginosa* identifiée par système API 20NE.

**Annexe 12 :** Provenance des souches bactériennes d'*E.coli*, *S. aureus* , *P.aeruginosa* (sexe, âge et type de prélèvement)**Figure 11 :** Provenance des souches bactériennes d'*E.coli* (sexe, âge et type de prélèvement)





### I.2.2. Echantillons de miels