

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES  
FACULTE DES SCIENCES  
DE LA NATURE ET DE LA VIE  
SIDI BEL ABBES

**THÈSE**  
**DE DOCTORAT**

Présentée par :

M<sup>elle</sup> MEHDI Yamina

*Spécialité* : Sciences biologiques

*Option* : Biochimie et santé

*Intitulé*

**Caractérisation physicochimique, palynologique et effets  
antibactérien, antioxydant et immunomodulateur des miels  
de la région ouest d'Algérie.**

Soutenue en 2016

Devant le jury composé de :

<b>Président :</b>	Pr ABBOUNI Bouziane	Université de Sidi Bel-Abbés
<b>Examineurs :</b>	Pr SLIMANI Miloud	Université de Saïda
	Pr RIAZI Ali	Université de Mostaganem
	Pr AOUES Abdelkader	Université d'Oran
<b>Rapporteur</b>	Pr BENALI Mohammed	Université de Sidi Bel-Abbés

بسم الله الرحمن الرحيم

(وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ {68} ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًّا يَخْرُجُ  
مِن بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ  
يَتَفَكَّرُونَ} (69).

[سورة: النحل]

*Au nom de D'Allah, le tout Miséricordieux, le très  
Miséricordieux*

*" Prenez des demeures dans les montagnes, les arbres et les treillages que [les hommes] font. Puis mangez de toute espèce de fruits, et suivez les sentiers de votre Seigneur, rendus faciles pour vous." De leur ventre, sort une liqueur, aux couleurs variées, dans laquelle il y a une guérison pour les gens. Il y a vraiment là une preuve pour des gens qui réfléchissent"*

(Coran, 16 : 68-69)

*"Tout ce qui se montre est une vision de l'invisible"*

(Anaxagore)



## *Remerciements*

الحمد لله والشكر لله عدد خلقه ورضا نفسه وزنة عرشه ومداد كلماته

*Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.*

Au terme de ce doctorat, j'adresse toute mon estime à chaque personne qui a contribué de près ou de loin à sa réalisation. Ainsi j'adresse mes sincères remerciements:

**À Monsieur BENALI Mohammed,**

**Directeur du laboratoire de Biotoxicologie,**

**Professeur à l'Université de Sidi Bel-Abbés,**

**Faculté de sciences de la nature et de la vie,**

*Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse,*

*Pour vos précieux conseils, votre disponibilité et votre gentillesse,*

*Pour votre enseignement et le savoir que vous m'avez transmis au cours de mes études,*

*Veillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et le témoignage de mon profond respect.*

**À Monsieur ABBOUNI Bouziane,**

**Professeur à l'Université de Sidi Bel-Abbés,**

**Faculté de sciences de la nature et de la vie,**

*Pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury,*

*Pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail*

*Recevez mes sincères remerciements et soyez assuré de toute mon estime.*

**À Monsieur SLIMANI Miloud,**

**Professeur à l'Université de Saïda,**

**Faculté de sciences de la nature et de la vie,**

*Pour l'honneur que vous me faites de siéger dans ce jury,*

*Recevez mes sincères remerciements et soyez assuré de toute mon estime.*

**À Monsieur RIAZI Ali,**

**Professeur à l'université de Mostaganem,**

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être membre de ce jury,*

*Pour votre enseignement et le savoir que vous m'avez transmis au cours de mes études,*

*Recevez mes très sincères remerciements et soyez assuré de mon profond respect.*

**À Monsieur AOUES Abdelkader,**

**Professeur à l'université d'Oran,**

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être membre de ce jury,*

*Recevez mes très sincères remerciements et soyez assuré de mon profond respect.*

**À mes parents,**

*Pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix,*

*Pour l'écoute que je trouve toujours auprès de vous,*

*Ma réussite universitaire et professionnelle est aussi la votre,*

*Recevez cette thèse en guise de remerciements, avec toute mon affection.*

**À mes sœurs et frères,**

*Pour m'avoir toujours soutenue*

*Pour l'écoute que je trouve toujours auprès de vous,*

**À tous mes amis,**

*Les meilleurs moments avec vous resteront pour moi inoubliables tout comme ces cinq années d'inscription en Doctorat !!!*

**À l'ensemble des personnes, chercheurs et collègues** qui ont été partie prenante à ce travail de manière directe ou indirecte et qui m'ont profondément marquée au cours de ces dernières années

**Enfin,** pour tous ceux et toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.



## *DÉDICACES*

*Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie cette thèse:*

*À la mémoire de mon frère Ahmed que le Dieu lui garde dans son paradis.*

*Aux êtres les plus chers : Mes parents,*

*À mon père, Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.*

*À ma mère, Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie. Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS PARENTS que je le dois, que Dieu vous garde.*

*À mes chers frères : Mohamed, Bilal et Brahim pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse*

*À mes tendres et chères sœurs: Aïcha, Naïma et Soumia pour leur bonté, leur générosité de cœur et leur aide si précieuse qui a rendu possible la soutenance de cette thèse*

*À ma grande famille, mes amis et collègues et tous ceux et toutes celles que j'ai involontairement omis de citer et qui n'en demeurent pas moins chers Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.*

---

## Résumé

Le miel, un produit complexe, extrêmement riche, possède de nombreuses propriétés cosmétiques, nutritionnelles et thérapeutiques. Notre étude est réalisée sur neuf échantillons de miel récoltés de différentes régions de l'ouest algérien afin de caractériser leurs propriétés physicochimiques (densité, teneur en eau, matière sèche, acidité totale, cendre, conductivité électrique, sucres, HMF, polyphénols et flavonoïdes), de déterminer le niveau des éléments traces métalliques (ETM) (Fe, Cu, Mg, Zn, Ni et certains métaux toxiques Pb et Cd) et la recherche de résidus de chloramphénicol. Par ailleurs, une analyse pollinique permettant de déterminer l'origine botanique de ces miels est effectuée. Aussi une détermination des vertus thérapeutiques *in vitro* et *in vivo* de ces miels (activités antioxydante, immunomodulatrice et antibactérienne) est mise en évidence. Les résultats d'analyses physicochimiques, du dosage des ETM toxiques et des résidus de chloramphénicol ont montré la conformité des miels étudiés aux normes internationales du codex alimentarius à l'exception du miel N°08 qui présente des traces de chloramphénicol. L'analyse palynologique a permis d'identifier cinq miels monofloraux et quatre multifloraux avec une dominance de l'*Eucalyptus sp.*, *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba*, *Daucus carota*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, et *Papaver rhoeas* comme espèces omniprésentes dans la région de l'ouest Algérien. Tous les miels étudiés présentent une activité antioxydante considérable avec un I% élevé pour le miel N°03 (27,289%) qui est corrélé ( $R^2=0,99$ ) avec sa teneur élevée en polyphénols. L'effet immunomodulateur du miel a été prouvé *in vivo* avec le même échantillon qui montre une diminution significative ( $p < 0,01$ ) du taux des IgG Anti-OVA chez les souris Balb/c injectées de 100µl de miel 06h avant, 06h après et en même temps que l'immunisation par l'antigène OVA. L'étude *in vitro* de l'effet antibactérien de ces miels indique qu'ils possèdent un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries pathogènes Gram+ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*) qui sont plus sensibles que ceux Gram- (*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*). Cependant *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* montrent une résistance aux différents miels testés mais sont inhibées ou éliminées à des concentrations élevées (>40%). Ces résultats ouvrent une perspective intéressante dans le domaine clinique et suggère l'utilisation potentielle du miel comme un alicament en technologie agro-alimentaire.

**Mots-clés :** Miel, Propriétés Physicochimiques, Métaux Toxiques, Chloramphénicol, Analyse palynologique, vertus thérapeutiques.

---

**Abstract**

Honey is a complex product, extremely rich, has many cosmetic, nutritional and therapeutic properties. Our study is performed on nine honey samples collected from different regions of western Algeria to characterize the physicochemical properties (density, water content, dry matter, total acidity, ash, electrical conductivity, sugars, HMF, polyphenols and flavonoids) to determine the level of metallic trace elements (ETM): Fe, Cu, Mg, Zn, Ni and some toxic metals (Pb and Cd) and the search for chloramphenicol residues. In addition, a pollen analysis to determine the botanical origin of the honey is made. As a determination of therapeutic properties *in vitro* and *in vivo* of these honeys (antioxidant, immunomodulatory and antibacterial activity) is highlighted. The results of physicochemical analysis, determination of toxic ETM and residues of chloramphenicol showed compliance of studied honeys with international standards of alimentarius codex except sample N°08 which shows traces of chloramphenicol. The pollen analysis identified five single-flower and four multifloraux honeys with a dominance of *Eucalyptus sp.*, *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba*, *Daucus carota*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, and *Papaver rhoeas* species as ubiquitous species in the region of western Algeria. All studied honeys show considerable antioxidant activity with high I% for sample N°03 (27.289%), which is correlated ( $R^2=0.99$ ) with its high polyphenol content. The immunomodulatory effect of honey has been shown *in vivo* with the same sample which shows a significant decrease ( $p<0.01$ ) of Anti-OVA IgG levels in Balb/c mice injected with 100  $\mu$ l of honey 06h before, 06h after and at the same time that immunization with OVA antigen. The *in vitro* study of the antibacterial effect of these honeys indicates that they have an inhibitory effect on the growth of pathogenic bacteria Gram+ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*), which are more sensitive as Gram- (*Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*). However, *Pseudomonas Aerugenosa*. and *Enterobacter cloacae*. Show a resistance to various kinds of honey tested but they are inhibited or eliminated at high concentrations (> 40%). These results open an interesting perspective in the clinical area and suggest the potential use of honey as a health food in food technology.

**Keywords:** Honey, Physicochemical Properties, Toxic Metals, Chloramphenicol, palynological analysis, therapeutic virtues

---

## ملخص

العسل هو منتج معقد، غني للغاية، لديه العديد من الخصائص التجميلية والغذائية والعلاجية. يتم تنفيذ دراستنا على تسع عينات عسل والتي تم جمعها من مناطق مختلفة من غرب الجزائر لتحديد خصائصها الفيزيوكيميائية (الكثافة، المحتوى المائي، المادة الجافة، الحموضة الكلية، الرماد، التوصيل الكهربائي، السكريات، HMF، البوليفينولات والفلافونويدات) تحديد مستوى العناصر المعدنية الدقيقة (ETM): الحديد، النحاس، الماغنسيوم، الزنك، النيكل وبعض المعادن السامة (الرصاص والكاديوم) والبحث عن بقايا الكلورامفينيكول. بالإضافة إلى ذلك يتم إجراء تحليل حبوب اللقاح مما يسمح بتحديد المنشأ النباتي لهذه العينات من العسل. كذلك تم تسليط الضوء على دراسة بعض الخصائص العلاجية عند الاحياء و في المختبر لهذه العينات من العسل (الخاصية المضادة للأكسدة، التأثير المناعي والمضادة للجراثيم). أظهرت نتائج التحليل الفيزيوكيميائي، تحديد ETM، المعادن السامة ومخلفات الكلورامفينيكول لعينات العسل، الامتثال للمعايير الدولية لهيئة الدستور الغذائي باستثناء العسل رقم 08 الذي يحتوي آثار للكلورامفينيكول. حدد تحليل حبوب اللقاح خمسة أنواع عسل لزهرة واحدة وأربعة أنواع متعددة الأزهار مع هيمنة كل من الأوكالبتوس، الشمرة الشائعة، الفولية الإكليلية، الزيتون، العناب، الجزر الشائع، الطرخشقون المخزني، السلجم، البابونج و الخشخاش المنثور كأصناف سائدة في منطقة غرب الجزائر. دراسة النشاط المضاد للأكسدة لكل أنواع العسل يبين ارتفاع كبير للنشاط مع ارتفاع في نسبة التثبيط للعسل رقم 03 (27.289%) التي ترتبط ( $R^2 = 0.99$ ) مع محتواه البوليفينولي العالي. وقد تبين التأثير المناعي للعسل في الجسم الحي مع نفس العينة رقم 03 التي أظهرت انخفاض معنوي ( $p < 0.01$ ) في مستويات الأجسام المضادة لبروتين البيض OVA عند الفئران من نوع Balb/c التي تم حقنها ب 100 ميكرو لتر من العسل، 6 سا قبل، 6 سا بعد وفي نفس وقت الحقن بمستضد ألبومين البيض. دراسة التأثير المضاد للجراثيم في المختبر لهذا العسل بينت أن لديهم تأثير كاج بشكل خاص على نمو البكتيريا المسببة للأمراض من نوع Gram+ : العسوية الشمعية، المكورات العنقودية هومينيس، التي تعتبر جد حساسة كمثيلتها Gram- : الإشريكية القولونية والمتقلبة الرائحة. بينما الزائفة الزنجارية والأمعائية المذرقية تظهر مقاومة لمختلف أنواع العسل المختبرة ولكنها تثبط أويقضى عليها في تراكيز عالية (>40%). هذه النتائج تفتح وجهة نظر مثيرة للاهتمام في المجال الطبي ويقترح إمكانية استخدام العسل كغذاء صحي في التكنولوجيا الغذائية.

**الكلمات المفتاحية:** العسل، خصائص فيزيوكيميائية، المعادن السامة، كلورامفينيكول، تحليل حبوب اللقاح، الخصائص العلاجية.

## Liste des abréviations

A.O.A.C: Association of official analytical chemists  
Ag-Ac: Antigène-Anticorps  
Akt : protein kinase B  
BALT: bronchus-associated lymphoid tissue  
BHI : Brain Heart Infusion  
Bq : Becquerel (Unité de l'activité d'un radionucléide)  
CE : Conductivité Electrique  
CMB : Concentration Minimale Bactéricide  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
COX-2 : Cyclooxygénase-2  
CRAPC : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physicochimiques  
D.O: Densité optique  
DHA : Dihydroxyacétone  
DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
EMIT: Enzyme Multiplied Immunoassay Technique  
EQ : Equivalent Catéchine  
ETM : Eléments Traces Métalliques  
Fab: fragment antigen binding  
Fc : cristallisable fragment  
FL: Fluorochrome  
GAE : Equivalent Acide Gallique  
GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue  
GP: Grain de pollen  
HMF : Hydroxyméthylfurfural  
HPLC Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)  
HSV Herpès Simplex Virus  
I% : pourcentage d'inhibition  
IC50: la concentration minimale de miel (antioxydant) qui inhibe 50% du radical libre.  
mAg : Antigène de membrane  
ICAM: molécules d'adhérence intercellulaire

IL-6 : Intreleukine-6

iNOS : inducible Nitric oxyde synthase

INRA : Institut Nationale de la Recherche Agronomique

IRS-1 : Insulin Receptor Substrate

IS: Immunsérum

LMR : Limite Maximale de Résidus

MALDI-TOF-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight  
Mass Spectroscopy

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MGO : Méthylglyoxal

MMP-9 : Metalloproteinase matricielle 9

MO : Microscope Optique

MRJP-1: major royal jelly protein-1

MSDA : Manuel suisse des denrées alimentaires

NF-kB: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural killer

NO : monoxyde d'azote

NO: Monoxyde d'azote

OGM: Organisme Génétiquement Modifié

OPD: Orthophénylène diamine

PGE2 : Prostaglandine E2

rpm : rotation par minute

SAA : Spectrophotométrie à Absorption Atomique à flamme

TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale

## Liste des figures

Figure 01 : Origine du miel .....	04
Figure 02 : Etapes de formation du miel .....	06
Figure 03 : Composition chimique du miel .....	07
Figure 04 : Formation d'hydroxyméthylfurfural .....	13
Figure 05 : Processus de pollinisation .....	16
Figure 06 : Structure schématique d'un pollen.....	18
Figure 07: Terminologie de la palynologie .....	21
Figure 08: Différents aspects morphologiques des grains de pollen .....	22
Figure 09: Principales types de pollen identifiés dans 66 échantillons de miel Algérien.....	23
Figure 10: Plantes toxiques pour les abeilles.....	26
Figure 11: Observation microscopique du pollen d'un miel monofloral d' <i>Eucalyptus</i> (400X). ....	29
Figure 12: Observation microscopique du pollen d'un miel multifloral de forêt (400X).....	30
Figure 13: Observation de pollen de <i>Taraxacum officinale</i> ( <i>Pissenlit</i> ) (1000X) par MO .....	33
Figure 14: Observation de pollen de <i>Taraxacum officinale</i> ( <i>Pissenlit</i> ) par MEB (5000X) .....	34
Figure 15: Sources de contamination de la ruche .....	35
Figure 16: Différents groupes de pesticides .....	40
Figure 17: Structure chimique de l'Amitraze .....	41
Figure 18: Une abeille boit l'eau de guttation .....	43
Figure 19 : Réaction de formation du gluconolactone (B) et de l'acide gluconique (C) à partir du glucose (A) .....	53
Figure 20: production de peroxyde d'hydrogène par réaction enzymatiques.....	53
Figure 21: Présentation des échantillons du miel étudié.....	64
Figure 22: Localisation des échantillons de miel.....	65
Figure 23: Structure de chloramphénicol .....	74
Figure 24: Souche des souris BALB/c.....	79
Figure 25 : Répartition des groupes expérimentaux selon le type d'immunisation en fonction du temps.....	80
Figure 26: Structure quaternaire de l'ovalbumine .....	81
Figure 27: Immunisation intra-péritonéale des souris BALB/C.....	82
Figure 28: Prélèvement du sang à partir de l'aorte abdominale des souris BALB/c. ....	83
Figure 29: Principe du test ELISA indirecte non compétitive.....	84
Figure 30: Principe de l'identification bactérienne par le MALDI-TOF-MS.....	88
Figure 31: Principe de la méthode de diffusion en gélose.....	89

Figure 32 : Distribution expérimentale de la microplaque pour chaque miel testé pour la détermination de la CMI.....	91
Figure 33: Plaque de microtitration après incubation à 37°C/24h.....	92
Figure 34: Détermination de la CMI sur boîte de pétri à partir de plaque de microtitration .....	93
Figure 35: Détermination de la CMB de miel N°06 devant la souche <i>Enterobacter cloacae</i> sur boîte de pétri à partir de plaque de microtitration.....	93
Figure 36: La conductivité électrique (en ms/cm) des échantillons .....	95
Figure 37: La densité des échantillons.....	96
Figure 38: Le pH des échantillons .....	97
Figure 39: La teneur en eau (%) des échantillons.....	98
Figure 40: L'acidité des échantillons.....	99
Figure 41: La teneur en HMF des échantillons .....	100
Figure 42: La teneur en cendre (en %) des échantillons.....	101
Figure 43: La teneur en matière sèche (en %) des échantillons.....	102
Figure 44: Le contenu en sucres des miels analysés par HPLC.....	103
Figure 45: Teneur en polyphénols totaux des miels .....	104
Figure 46 : Teneur en flavonoïdes totaux des miels .....	106
Figure 47 : Courbes représentant l'activité antioxydante des miels (Test DPPH).....	108
Figure 48 : Valeurs de l'IC <sub>50</sub> pour les différents miels étudiés (Test DPPH).....	109
Figure 49 : Classement croissant des miels selon leur IC <sub>50</sub> Valeurs de l'IC <sub>50</sub> (Test DPPH).....	109
Figure 50: Pourcentage d'inhibition des échantillons de miel (Test DPPH).....	110
Figure 51 : Corrélation entre les valeurs d'IC <sub>50</sub> (DPPH) des miels et les Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes.....	111
Figure 52: Résultats de dosage des éléments traces métalliques (ETM) par la SAA (mg/kg). ....	112
Figure 53: Concentration de résidus de chloramphénicol (ng/mL) dans les neufs échantillons de miel analysés par LC/MS/MS.....	115
Figure 54: Chromatogramme de dosage de résidus de chloramphénicol dans l'échantillon N°08 par LC/MS/MS .....	115
Figure 55: Spectres polliniques de différents miels analysés. ....	122
Figure 56: Vue microscopique de l'échantillon N°01 par Microscope optique 400X.....	126
Figure 57: Vue microscopique de l'échantillon N°01 par Microscope électronique à balayage 4000X .....	126
Figure 58: Vue microscopique de l'échantillon N°02 par Microscope optique 400X.....	127
Figure 59: Vue microscopique de l'échantillon N°02 par Microscope électronique à balayage 800X .....	127
Figure 60: Vue microscopique de l'échantillon N°03 par Microscope optique 400X.....	128



Figure 61: Vue microscopique de l'échantillon N°03 par Microscope électronique à balayage 800X .....	128
Figure 62: Vue microscopique de l'échantillon N°04 par Microscope optique 400X.....	129
Figure 63: Vue microscopique de l'échantillon N°04 par Microscope électronique à balayage 500X .....	129
Figure 64: Vue microscopique de l'échantillon N°05 par Microscope optique 400X.....	130
Figure 65: Vue microscopique de l'échantillon N°05 par Microscope électronique à balayage 3000X .....	130
Figure 66: Vue microscopique de l'échantillon N°06 par Microscope optique 400X.....	131
Figure 67: Vue microscopique de l'échantillon N°06 par Microscope électronique à balayage 1000X .....	131
Figure 68: Vue microscopique de l'échantillon N°07 par Microscope optique 400X.....	132
Figure 69: Vue microscopique de l'échantillon N°07 par Microscope électronique à balayage 1500X .....	132
Figure 70: Vue microscopique de l'échantillon N°08 par Microscope optique 400X.....	133
Figure 71: Vue microscopique de l'échantillon N°08 par Microscope électronique à balayage 800X .....	133
Figure 72: Vue microscopique de l'échantillon N°09 par Microscope optique 400X.....	134
Figure 73: Vue microscopique de l'échantillon N°09 par Microscope électronique à balayage 1600X .....	134
Figure 74: Influence du miel sur le taux d'IgG de souris anti-OVA en fonction du temps d'injection.....	135
Figure 75 : AntibioGramme visant à tester la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les différents antibiotiques .....	139
Figure 76 : Présentation des résultats de l'activité antibactérienne du miel à l'égard des six souches bactériennes.....	140
Figure 77: Effet antibactérien de miel N°01 à différentes concentrations sur <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en utilisant une plaque de microtitration .....	143
Figure 78: Activité antibactérienne de différents miels sur <i>Escherichia coli</i> .....	144
Figure 79: Activité antibactérienne de différents miels sur <i>Bacillus Cereus</i> .....	144
Figure 80: Activité antibactérienne de différents miels sur <i>Enterobacter Cloacae</i> .....	145
Figure 81: Activité antibactérienne de différents miels sur <i>Staphylococcus hominis</i> .....	145
Figure 82: Activité antibactérienne de différents miels sur <i>Proteus mirabilis</i> . .....	146
Figure 83: Activité antibactérienne de différents miels sur <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> . .....	146
Figure 84: Variation de % d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> en fonction de concentration de différents miels. ....	147
Figure 85: Variation de % d'inhibition de <i>Bacillus Cereus</i> en fonction de concentration de différents miels. ....	147

Figure 86: Variation de % d'inhibition d' <i>Enterobacter Cloacae</i> en fonction de concentration de différents miels. ....	148
Figure 87: Variation de % d'inhibition de <i>Staphylococcus Hominis en</i> fonction de concentration de différents miels. ....	148
Figure 88: Variation de % d'inhibition de <i>Proteus mirabilis</i> en fonction de concentration de différents miels. ....	149
Figure 89: Variation de % d'inhibition de <i>Pseudomonas Aerugenosa.</i> en fonction de concentration de différents miels. ....	149
Figure 90: Déterminations de valeurs de CMB .....	152

## Liste des tableaux

Tableau 01 : Les proportions des différents sucres constituant des miels.....	08
Tableau 02 : Plantes toxiques pour les abeilles .....	24
Tableau 03 : Plantes produisant des miels toxiques et symptômes de l'intoxication .....	25
Tableau 04 : Facteurs de contamination du miel .....	36
Tableau 05: Seuils de tolérance de résidus d'antibiotiques dans le miel en Suisse .....	49
Tableau 06: limites maximales de Résidus (MLR) théoriques dans les miels, calculables selon les règles de l'organisation mondiale de la santé .....	44
Tableau 07: Informations sur les échantillons de miel récoltés .....	64
Tableau 08: Classification des différents échantillons étudiés selon leurs richesses en pollens ..	117
Tableau 09: Résultats d'analyse pollinique qualitative des miels .....	119
Tableau 10 : Résultats de l'antibiogramme (Diamètre de la zone d'inhibition en mm, R : Bactérie résistante).....	138
Tableau 11: Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes (en mm) par les différents miels. ....	142
Tableau 12 : Concentrations minimale inhibitrice (CMI) concentration minimale bactéricides (CMB) du miel (%) pour chaque souche bactérienne.....	151

Remerciements  
 Dédicaces  
 Résumé  
 Liste des Abréviations  
 Liste des figures  
 Liste des tableaux

## Sommaire

Introduction .....	01
<i>Partie Bibliographique</i>	
Chapitre I. Généralités sur le miel .....	03
I-1. Définition .....	03
I-2. Origine du miel .....	03
I-2.1. Nectar .....	03
I-2.2. Miellat .....	03
I-3. Types de miel .....	04
I-3.1. Miels monofloraux .....	04
I-3.2. Miels multifloraux .....	04
I-4. Formation du miel .....	05
I-5. Composition et propriétés du miel .....	06
I-5.1. Composition et propriétés chimiques essentielles .....	06
I-5.1.1. Composants majeurs .....	07
I-5.1.1.1. L'eau .....	07
I-5.1.1.2. Les sucres .....	07
I-5.1.2. Composants mineurs .....	08
I-5.1.2.1. Les acides .....	08
I-5.1.2.2. Les sels minéraux .....	08
I-5.1.2.3. Les protéines .....	08
I-5.1.2.4. Les enzymes .....	09
I-5.1.2.5. Les vitamines .....	09
I-5.1.2.6. Les substances aromatiques .....	09
I-5.1.2.7. Les pigments .....	09
I-5.2. Propriétés physiques .....	09
I-5.2.1. Indice de réfraction .....	09
I-5.2.2. Densité .....	10
I-5.2.3. Viscosités .....	10
I-5.2.4. Conductivité électrique .....	10
I-5.2.5. Pouvoir rotatoire .....	10

---

I-5.2.6. Hygroscopicité.....	10
I-5.3. Propriétés chimiques.....	10
I-5.3.1. Acidité .....	10
I-5.3.2. pH .....	10
I-5.3.3. Hydroxyméthylfurfural (HMF).....	11
I-5.4. Propriétés organoleptiques.....	11
I-5.4.1. Couleur .....	11
I-5.4.2. Odeur .....	11
I-5.4.3. Goût .....	11
I-5.4.4. Cristallisation.....	11
I-6. Altération du miel.....	12
I-6.1. Effet du vieillissement .....	12
I-6.2. Effet du traitement thermique.....	12
I-6.3. Effet de la fermentation .....	13
I-7. Fraude de miel .....	13
I-7.1. Fraudes de nature physico-chimique .....	14
I-7.2. Fraudes de nature botanique et géographique.....	14
Chapitre II : Caractérisation pollinique du miel: <i>Mélisso-palynologie</i> .....	15
II-1. Relations entre les abeilles et les plantes à fleurs.....	15
II-2. Pollinisation.....	15
II-3. Rôles économiques et écologiques des abeilles .....	17
II-4. Pollen.....	17
II-4.1. Forme et la symétrie .....	19
II-4.2. Apertures ou zones germinales.....	20
II-4.3. Exine.....	20
II-5. La flore mellifère.....	22
II-6. Plantes toxiques pour les abeilles.....	24
II-6.1. Miels toxiques .....	24
II-7. Palynologie.....	27
II-7.1. Analyse pollinique de miel « Mélisso-palynologie » .....	27
II-7.1.1. Analyse pollinique quantitative.....	28
II-7.1.2. Analyse pollinique qualitative.....	28
II-7.1.3-Principaux types de miels .....	29
II-7.2. Méthodes utilisées en mélikso-palynologie.....	30
II-7.2.1. Méthode de Louveaux 1970 .....	30

---

---

II-7.2.2. Méthode par acétylyse.....	31
II-7.3.Observation microscopique de pollen .....	31
II-7.3.1. Microscope Optique .....	32
II-7.3.2. Microscope Electronique.....	33
II-7.4. Préparation des lames de références.....	33
Chapitre III : Contaminants dans le miel.....	35
III-2. Sources de contamination de miel .....	35
III-3. Résidus de métaux lourds .....	36
III-4. Résidus des antibiotiques.....	37
II-5. Résidus de Pesticides .....	39
III-6. Les organismes génétiquement modifiés (OGM) .....	44
III-7. Microorganismes.....	45
III-8. La radioactivité .....	47
III-9. Règlementation .....	48
III-9.1. Interdictions quant à la qualité d'un miel.....	48
III-9.2. Etiquetage et conditionnement.....	48
III-10. Les bonnes pratiques apicoles.....	49
Chapitre IV : Effets thérapeutiques de miel .....	51
IV-1.Propriétés biologiques .....	51
IV-1.1. Valeur alimentaire et diététique.....	51
IV-1.2. Valeur thérapeutique.....	51
IV-1.2.1. Effet antibactérien.....	51
IV-1.2.1.1. L'osmolarité.....	52
IV-1.2.1.2. Le pH acide.....	53
IV-1.2.1.3. Le système peroxyde d'hydrogène (inhibine).....	53
IV-1.2.1.4. Des facteurs phytochimiques .....	54
IV-1.2.1.5. La défensine-1.....	55
IV-1.2.1.6. Le méthylglyoxal (MGO) .....	55
IV-1.2.1.7. Les composés phénoliques et les flavonoïdes.....	56
IV-1.2.2. Effet antifongique .....	56
IV-1.2.3. Effet antiviral .....	56
IV-1.2.4. Effet antioxydant.....	57
IV-1.2.5. Effet anti-inflammatoire .....	58
IV-1.2.6.Effet Anticancéreux .....	58
IV-1.2.7. Effets sur l'immunité .....	59

---

---

IV-1.2.7.1. Effet immunostimulant .....	59
IV-1.2.7.2. Effet immunosuppresseur .....	60
IV-1.2.8. Effet prébiotique .....	60
IV-1.2.9. Effet antidiabétique .....	60
IV-1.2.10. Effet cicatrisant .....	61
IV-2. Allergies, intolérances .....	61

*Partie Expérimentale*

Matériel et méthodes .....	63
1. Matériel biologique .....	63
2. Les objectifs .....	63
3. Echantillonnage .....	64
4. Analyses au laboratoire .....	65
4-1. Etude physicochimiques du miel .....	65
4-1.1. La conductibilité électrique .....	65
4-1.2. La densité .....	66
4-1.3. Le pH .....	66
4-1.4. Teneur en eau .....	67
4-1.5. L'acidité .....	67
4-1.6. La teneur en HMF .....	68
4-1.7. Teneur en cendres .....	68
4-1.8. Teneur en matière sèche .....	69
4-1.9. Teneur en sucres .....	69
4-1.10. Teneur en polyphénols totaux .....	70
4-1.11. Teneur en Flavonoïdes .....	70
4-2. Etude <i>in vitro</i> de l'effet antioxydant de miel (Test de DPPH) .....	71
4-2.1. Principe .....	71
4-2.2. Détermination de l'IC <sub>50</sub> .....	71
4-3. Recherche des contaminants .....	72
4-3.1. Analyse des éléments traces métalliques .....	72
4-3.1.1. Minéralisation et mise en solution .....	72
4-3.1.2. Préparation des étalons .....	73
4-3.1.3. Dosage par spectrophotomètre atomique à flamme (SAA) .....	73
4-3.2. Recherche des antibiotiques « chloramphénicol » .....	74
4-3.2. 1. Préparation des standards .....	74
4-3.2. 2. Préparation des échantillons de miel .....	74

---

---

4-3.2. 3.Dosage par LC/MS/MS.....	75
4-4. Etude palynologique de miel (Mélisso-palynologie) .....	75
4-4.1. Méthode classique.....	75
4-4.2. Méthode d'acétolyse .....	75
4-4.3. Observation microscopique et lecture des préparations.....	76
4-4.3.1. Observation par microscope optique (M.O.).....	76
4-4.3.2. Observation par microscope électronique à Balayage (M.E.B.).....	77
4-4.4. Analyse pollinique quantitative .....	78
4-4.5. Analyse pollinique qualitative .....	78
4-5. Etude <i>in vivo</i> de l'effet immunomodulateur de miel.....	78
4-5.1. Immunisation des animaux .....	79
4-5.1.1. Choix de l'animal .....	79
4-5.1.2. Préparation des groupes .....	79
4-5.1.3. Choix du miel.....	80
4-5.1.4. Choix de l'antigène.....	80
4-5.1.5. Adjuvants .....	81
4-5.1.6. Voie d'injection .....	81
4-5.1.7. Protocole d'immunisation .....	82
4-5.1.7.1. Première immunisation .....	82
4-5.1.7.1.1. Préparation de la solution antigénique .....	82
4-5.1.7.1.2. Préparation de solution de miel.....	82
4-5.1.7.2. Immunisation de rappel.....	82
4-5.1.7.3. Prélèvement sanguin .....	83
4-5.2. Evaluation de la réponse immunitaire humorale par le dosage des IgG totaux à l'aide d'une technique immunoenzymatique « ELISA indirecte non compétitive) .....	83
4-6.2.1. Choix du test .....	83
4-5.2.2. Principe du test.....	84
4-5.2.3. Matériels et réactifs.....	84
4-5.2.3.1. Matériels.....	84
4-5.2.3.2. Réactifs.....	84
4-5.2.4. Détermination des dilutions optimales de titrage des différents réactifs par ELISA .....	85
4-5.2.5. Test ELISA .....	85
4-5.2.5.1. Sensibilisation de la plaque (Coating).....	85
4-5.2.5.2. Saturation des sites adsorbant résiduels (Surcoating) .....	86
4-5.2.5.3. Incubation avec l'immunsérum des souris.....	86

---



---

4-5.2.5.4. Incubation avec la solution du conjugué.....	86
4-5.2.5.5. Révélation .....	86
4-5.2.5.6. Lecture .....	86
4-6. Etude <i>in vitro</i> de l'effet antibactérien de miel.....	87
4-6.1. Choix des souches bactériennes.....	87
4-6.2. Test de sensibilisation aux antibiotiques.....	88
4-6.3. Techniques de screening des miels .....	88
4-6.3.1.Principe de la méthode de diffusion en puits .....	89
4-6.3.2.Réactivation des souches bactériennes.....	89
4-6.3.3.Préparation des suspensions bactériennes.....	90
4-6.3.4.Ensemencement sur des boîtes de pétri.....	90
4-6.3.5.Incubation et lecture de résultats.....	90
4-6.4. Détermination de la CMI et la CMB.....	91
4-7. Etude statistique .....	94
Résultats et Discussion.....	95
1. Etude physicochimiques du miel.....	95
1.1. La conductivité électrique .....	95
1.2. La densité .....	96
1.3. Le pH.....	96
1.4. La teneur en eau .....	97
1.5. L'acidité .....	99
1.6. HMF (hydroxyméthylfurfural).....	100
1.7. La teneur en cendres.....	101
1.8. La matière sèche.....	102
1.9. La teneur en sucres.....	102
1.10. La teneur en polyphénols totaux .....	104
1.11. La teneurs en flavonoïdes totaux.....	105
2. Etude <i>in vitro</i> de l'effet antioxydant de miel ( <i>Test de DPPH</i> ).....	107
3. Recherche des contaminants dans le miel .....	112
3.1. Résultats d'analyses des éléments traces métalliques (ETM) .....	112
3.2. Recherche de résidus d'antibiotiques « chloramphénicol » .....	115
4. Etude palynologique de miel « <i>Mélisso-palynologie</i> » .....	117
4.1. Analyse pollinique quantitative.....	117
4.2. Analyse pollinique qualitative.....	118
5. Étude <i>in vivo</i> de l'effet immunmodulateur du miel.....	135

---

5.1. Application du test ELISA pour l'étude de l'effet immunmodulateur du miel chez les souris Balb/c .....	135
5.2. Discussion .....	136
6. Étude de l'effet antibactérien de miel.....	138
6.1. Résultats d'antibiogramme .....	138
6.2. Méthode de diffusion sur gélose.....	140
6.3. Micro-méthode en milieu liquide .....	143
6.4. Détermination de la CMI et CMB .....	150
6.5. Discussion .....	154
<i>Conclusion</i> .....	157
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

---

# Introduction



## **Introduction**

Le miel, quoique connus depuis les temps les plus reculés, quoique jouissant d'une estime très-grande parmi les anciens qui lui attribuaient des propriétés si merveilleuses, est un des produits sur lesquels la médecine moderne ait répandu le moins de lumières. C'est la substance sucrée naturellement produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des fleurs ou des sécrétions provenant des parties vivantes des plantes ou des sécrétions laissées sur elles par des insectes suceurs qu'elles butinent, transforment et combinent avec des matières spécifiques provenant de leur propre corps et emmagasinent dans les rayons de la ruche (Codex Alimentarius, 2001). L'homme n'est là que pour récolter le fruit de la rencontre entre les abeilles et les végétaux. Dans sa composition on trouve des principes actifs que l'on pourrait isoler des plantes, mais il est impossible de recréer en laboratoire l'alchimie mellifère (Hoyet C., 2005).

Le miel est utilisé depuis toujours par l'homme ; les anciens en faisaient un usage très fréquent pour leur nourriture ; en effet, comme ils ne connaissaient pas encore le sucre, ils employaient le miel presque partout où nous employons aujourd'hui ce précieux condiment. Dans les pays développés il serait une alternative envisageable pour des traitements coûteux (escarres, plaies post opératoires, ...) ou devenus inefficaces (résistance bactériennes aux antibiotiques). Pour les pays en voie de développement, le miel pourrait être une solution thérapeutique intéressante d'autant qu'il peut être produit de façon indépendante. Force est de constater que malgré toutes ses qualités ce produit n'est que très peu intégré dans les protocoles de soins actuels (Hoyet C., 2005).

Ce produit naturel semble revenir sur le devant de la scène en raison de l'image du produit sain, diététique qu'il véhicule. Il est donc considéré comme « un alicament », ce qui nous pousse à nous interroger sur sa composition, sa diversité, ses origines et ses modalités de production, ses vertus thérapeutiques et les sources d'altération comme la présence des résidus d'antibiotique et des métaux lourds. En effet, la qualité du miel est un facteur important qui régie son prix, ses applications et ses perspectives d'exportation. Elle est déterminée essentiellement par l'analyse de sa composition chimique qui influe sur ses propriétés technologique, physicochimiques et fonctionnelles.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'étude de la qualité de quelques miels locaux de l'ouest algérien et leur caractérisation en se basant sur l'analyse pollinique « *la mélikso-palynologie* » afin de déterminer l'origine botanique et géographique de ces miels et les analyses physico-chimiques (la teneur en eau, la matière sèche, la densité l'acidité, le pH, la conductibilité électrique, la teneur en cendre, la teneur en polyphénols et en flavonoïdes) et enfin l'évaluation de quelques effets biologiques du miel à savoir ses effets : immunomodulateur, antioxydant et antibactérien.

La première partie de ce manuscrit est consacré à une revue bibliographique afin d'avoir une vue d'ensemble sur les caractéristiques physicochimiques et palynologiques de miel et ses effets thérapeutiques. D'abord, il nous a paru essentiel de présenter quelques notions sur le miel dans le premier chapitre, dans le deuxième chapitre, la mellissopalynologie suivie dans le troisième chapitre par la mise en point de différents contaminants qui peuvent altérer l'image de ce produits précieux, et enfin dans le quatrième et le dernier chapitre, les effets thérapeutiques du miel avant d'entamer la deuxième partie du manuscrit ; l'étude expérimentale et de conclure à la fin.

# Partie Bibliographique



# Chapitre



# Généralités sur le Miel

## ***I. Généralités sur le miel***

### **I-1. Définition**

Le miel est la denrée produite par les abeilles mellifiques à partir du nectar des fleurs ou de certaines sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou se trouvant sur elles, qu'elles butinent, transforment, combinent avec des matières spécifiques propres, emmagasinent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. Cette denrée peut être fluide, épaisse ou cristallisée (Donadieu, 2003).

### **I-2. Origine du miel**

Selon Jean-prost, 2005, le miel vient des plantes par l'intermédiaire des abeilles.

La sève élaborée est la matière première du miel. Elle est extraite des vaisseaux du liber qui la contiennent de deux manières :

- Par les nectaires élaborant le nectar ;
- Par des insectes piqueurs et suceurs, pucerons principalement, rejetant du

miellat (*figure 01*).

#### **I-2.1. Nectar**

Le nectar se forme à partir de la sève de la plante, mais sa composition diffère de celle de la sève. Il se produit au niveau des cellules des nectaires des transformations biochimiques complexes (dus au métabolisme de la plante), qui font du nectar une solution contenant un grand nombre de composés, ces transformations sont à l'origine des différents goûts retrouvés dans les miels (Minh-Ha-Pham, 1999).

Les principaux constituants du nectar sont l'eau et les sucres (saccharose, glucose et fructose). Selon Gonnet, 1982, la concentration du nectar en sucres joue un rôle important dans le butinage, les plantes dont le nectar est très riche en eau (faible concentration en sucres) étant réputées peu attractives pour les abeilles.

Les abeilles ne visitent pas les fleurs dont la concentration en sucres est inférieure à 10%.

#### **I-2.2. Miellat**

Il s'agit d'une excrétion sucrée rejetée par certains parasites des plantes, que les abeilles récoltent et élaborent comme elles le font pour le nectar.



Ce produit se distingue néanmoins du miel par sa consistance plus poisseuse et par sa forte teneur en protéines. Ceci provient du fait que les abeilles butinent également les petits aphidiens excréteurs de miellats et les transforment en même temps que ce dernier (Ravazzi, 2007).

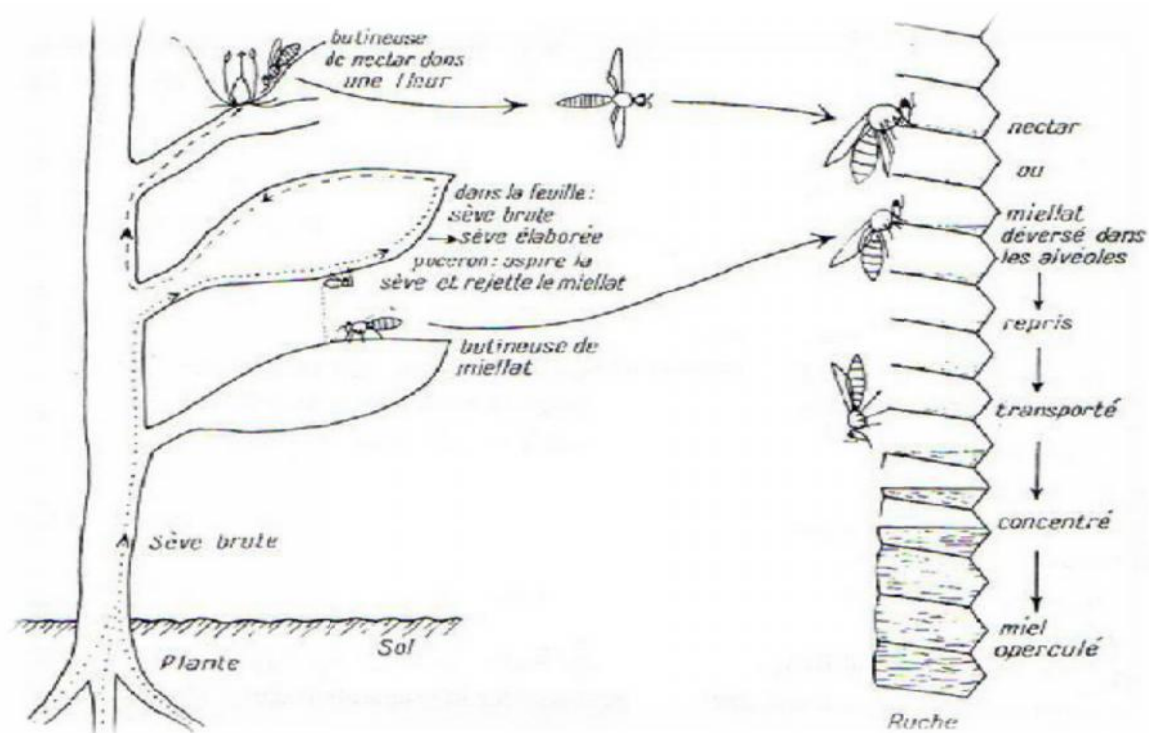


Figure 01 : Origine du miel (Prost, 1987).

### I-3. Types de miel

#### I-3.1. Miels monofloraux

Ces miels sont issus du butinage prédominant d'une espèce florale particulière (Clement, 2003). Pratiquement, il n'existe pas de miel provenant d'une seule espèce de fleur. Lorsque la proportion des grains de pollen d'une seule plante représente plus de 50% de l'ensemble du pollen, on donne au miel le nom de cette plante (Philippe, 1999).

Selon Bogdanov *et al.*, 2005, les miels monofloraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques.

#### I-3.2. Miels multifloraux

La présence d'un «pollen dominant» dans un miel permet, dans la plupart des cas, de le considérer comme miel «unifloral». S'il n'y a pas de pollen dominant, le miel est considéré

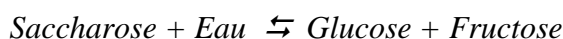
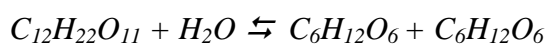
comme miel «toutes fleurs»; ce type de miel provenant du nectar de plusieurs espèces de fleurs sans dominance nette d'une plante particulière.

#### I-4. Formation du miel

Le miel est le produit que les abeilles domestiques élaborent à partir du nectar des fleurs, en le combinant avec des substances spécifiques et en l'entreposant dans les alvéoles des rayons où il parviendra à maturité (Ravazzi, 2007).

Le processus de transformation du nectar en miel débute tout de suite après que l'abeille butineuse l'a récolté et emmagasiné dans son jabot en y ajoutant de la salive contenant une enzyme (gluco-invertase) qui transforme le saccharose en deux molécules de sucres simples : le glucose et le fructose (Donadieu, 2003).

La transformation s'exprime par l'équation suivante:



Une fois de retour dans la ruche, elle le passe, après une première transformation sommaire due au fait même de l'avoir ingéré, aux abeilles qui se trouvent près de l'entrée, puis elle repart butiner.

L'abeille qui, dans la ruche, a reçu le nectar entame le véritable processus de conversion : elle allonge sa trompe et régurgite une petite goutte du liquide qu'elle a stocké dans son jabot, en la laissant s'écouler le long de sa langue. De cette manière, la surface d'évaporation augmente et le liquide (qui n'est plus du nectar mais pas encore du miel) perd une partie de son humidité.

Plusieurs abeilles accomplissent cette opération qui, pour chaque gouttelette, dure quelques minutes. Plus le nectar de départ sera riche en eau, plus il demandera de travail pour devenir du miel. À chaque passage le produit est par ailleurs enrichi d'enzymes sécrétés par les insectes, qui participent à la transformation.

La seconde phase du processus se déroule dans les cellules. Le liquide obtenu précédemment, qui revêt désormais presque l'aspect du miel, contient encore trop d'eau : les abeilles ventileuses font donc passer un courant d'air sur le produit emmagasiné dans les alvéoles jusqu'à ce que l'humidité se réduise à un niveau allant de 17 à 19% environ. Dès que le miel est parvenu à maturité, les abeilles scellent les cellules par une couche de cire (opercule) qui l'isole du milieu extérieur en l'empêchant d'absorber la moindre d'humidité et en évitant ainsi tout risque de fermentation (figure 02) (Ravazzi, 2007).

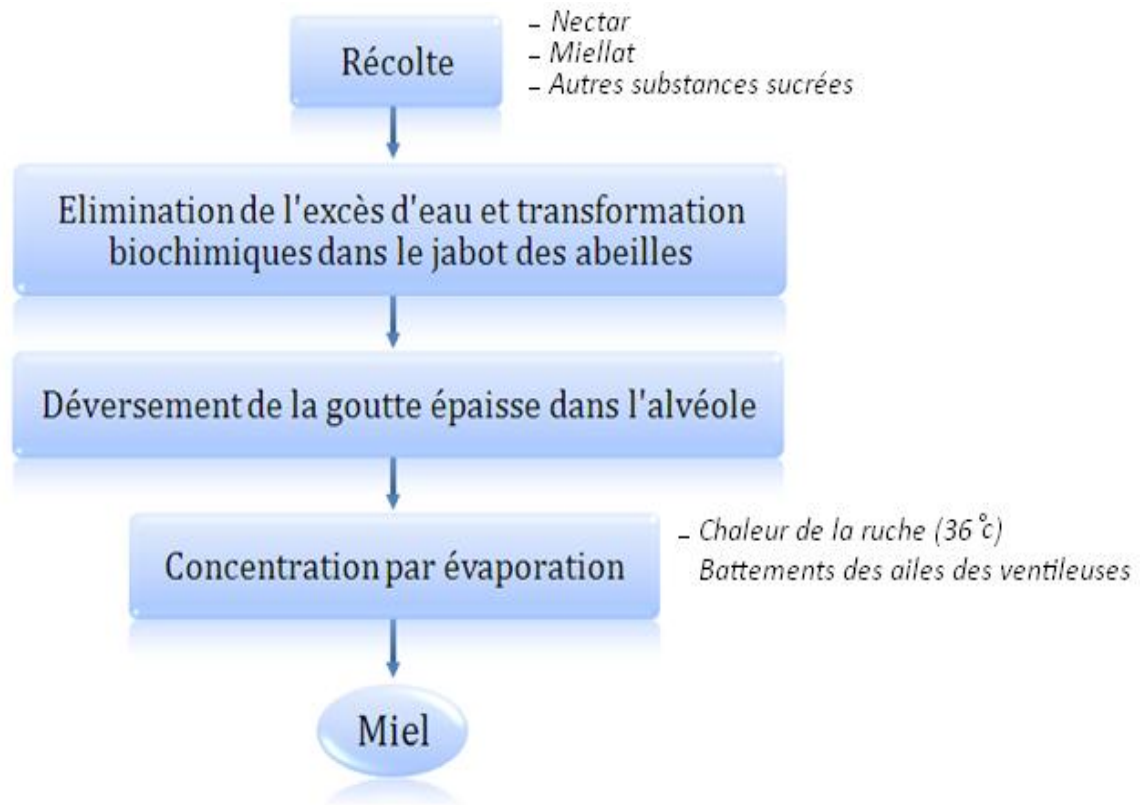


Figure 02 : Etapes de formation du miel.

## I-5. Composition et propriétés du miel

Le miel est un produit naturel dont la composition et les caractéristiques présentent d'importantes variations liées à son origine géographique et botanique (Ramirez et al, 2000). Il contient un très grand nombre de substances appartenant à des familles diverses (figure 3) (Gonnet, 1982).

### I-5.1. Composition et propriétés chimiques essentielles

Le miel est principalement un mélange très concentré de sucres dans une solution sirupeuse, mais d'ordinaire contient également d'autres composants mineurs, y compris des enzymes, des vitamines, des flavonoïdes et des produits chimiques organiques (Molan, 1996).

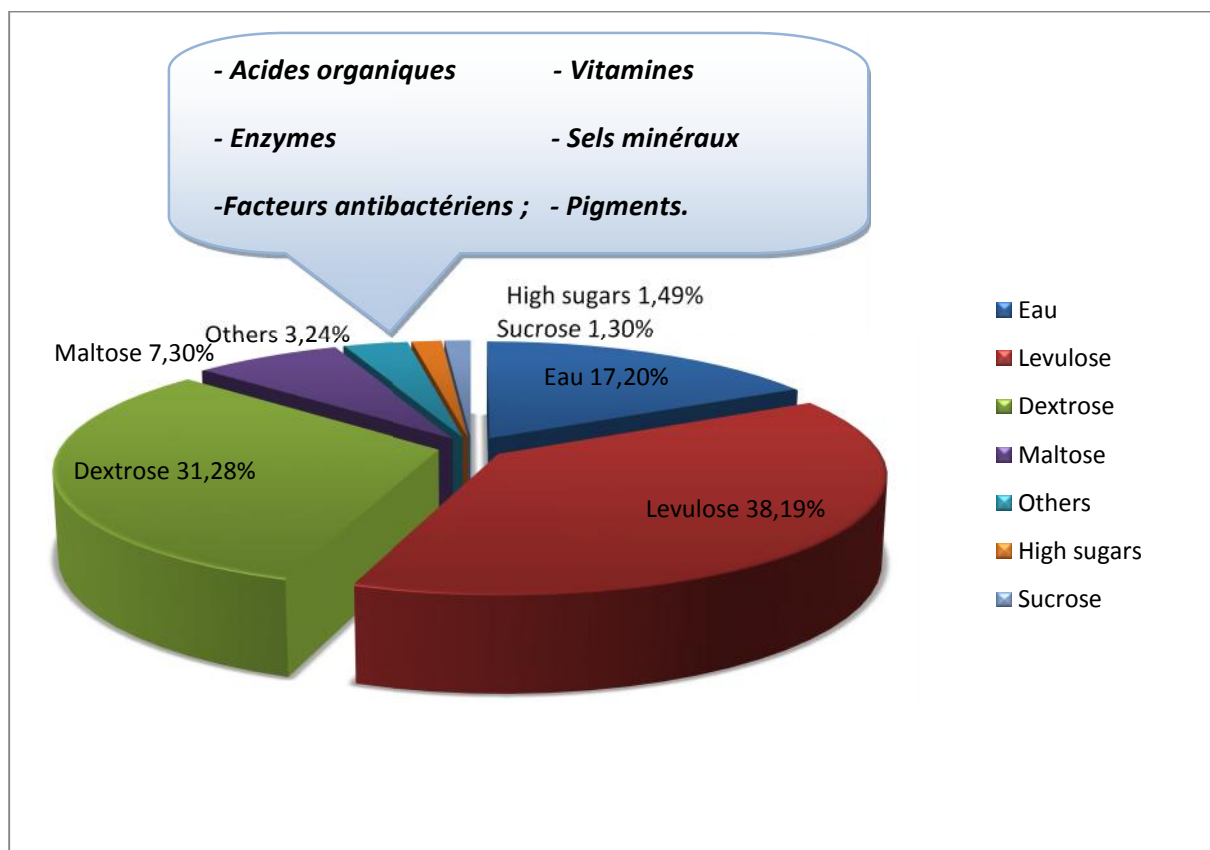


Figure 03 : Composition chimique du miel (Jeanne, 1993).

### I-5.1.1. Composants majeurs

#### I-5.1.1.1. L'eau

Selon Huchet *et al.*, 1996, l'eau est présente en quantité non négligeable puisque sa teneur moyenne est de 17,2%, mais comme le miel est un produit biologique, cette valeur peut varier. En fait, les abeilles operculent les alvéoles lorsque la teneur en eau avoisine 18%.

#### I-5.1.1.2. Les sucres

Les sucres constituent la plus grande partie du miel, soit environ 80%. Parmi ces sucres, figurent le fructose et le glucose, que l'on trouve en quantité voisine dans les miels (Khenfer *et al.*, 2001). De nombreux autres sucres sont également présents dans le miel, en plus faible quantité. Certains sont d'origine purement végétale (ils entrent dans la composition du nectar ou du miellat) : le glucose, le fructose, le saccharose, le kestose, le mélézitose et le raffinose. D'autres, tels que le maltose, l'isomaltose, l'erlose et le dextrantriose, apparaissent seulement comme des produits secondaires après transformation par les enzymes de l'abeille (Laudine, 2010) (Tableau 01).

Tableau 01 : Les proportions des différents sucres constituants des miels (Schweitzer, 2012).

Sucre	Proportion (%)
Fructose	30 à 50 % (des sucres présents dans un miel)
Glucose	20 à 42 %
Saccharose	moins de 1% jusqu'à 15% (pour le « lavande »)
Turanose	0.5 à 2.5% (isomère du Saccharose ; quasiment caractéristique des miels)
Maltose	1 à 3 % (composé de 2 Glucoses)
Isomaltose	1 à 3 % (isomère du maltose).

Les miels les plus doux sont les plus riches en fructose : ce sont ceux de châtaignier, sainfoin,...etc. Le glucose est dominant dans les miels de bruyère. Le mélézitose, l'erlose, le raffinose sont des tri- et polysaccharides provenant généralement des miellats (miels de sapin, d'épicéa, de mélèze...) (Clement et al, 2000).

### I-5.1.2. Composants mineurs

#### I-5.1.2.1. Les acides

Le miel contient aussi des acides dont leur provenance est diverse : certains sont issus du nectar directement, d'autres sont le fruit de réactions enzymatiques et de fermentations (Laudine, 2010). Le plus important est l'acide gluconique dont l'origine serait une bactérie, appelée *Gluconobacter*, qui, lors de la maturation du miel, transformerait le glucose en acide gluconique. On y trouve également une vingtaine d'acides organiques comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide oxalique, l'acide butyrique, l'acide pyroglutamique et l'acide succinique. On y trouve des traces d'acide formique (un des constituants du venin), d'acide chlorhydrique et d'acide phosphorique. D'autres composés, les lactones, dont la présence est constante, ont également une fonction acide (Huchet et al., 1996).

#### I-5.1.2.2. Les sels minéraux

La teneur en sels minéraux d'un miel est en général faible, avec d'importantes variations : les miels foncés en contiennent plus que les miels clairs (Laudine, 2010).

#### I-5.1.2.3. Les protéines

Les protides sont présents en faible quantité (1.7 gramme par kilogramme de miel soit une teneur de 0.26%) et la teneur en azote est négligeable (de l'ordre de 0.041%). Il s'agit essentiellement de peptones, d'albumines, de globulines et de nucléo-protéines qui

proviennent soit de la plante, soit de l'abeille. Il y a également des acides aminés libres dont la proline, qui provient des sécrétions salivaires de l'abeille (Huchet *et al.*, 1996). Seul le miel de bruyère *Calluna* contient une protéine particulière, responsable de l'évolution de sa viscosité au cours du temps (la thixotropie) (Laudine, 2010).

#### **I-5.1.2.4. Les enzymes**

Le miel contient un certain nombre d'enzymes, y compris la *glucose oxydase*, l'*amylase* et l'*invertase*, leur présence dans le miel paraissant provenir des abeilles productrices du miel.

La catalase et l'acide phosphatase ont également été trouvés dans certains miels, ces plus probable étant dérivé du pollen et du nectar de certaines plantes. Parmi ces enzymes, la glucose oxydase semble être d'une importance particulière car il est responsable de la production d'acide gluconique et de peroxyde d'hydrogène. Ce dernier étant l'un des facteurs clés impliqués dans l'activité antibactérienne du miel (Molan, 1996).

#### **I-5.1.2.5. Les vitamines**

Le miel contient une quantité infime de vitamines, probablement issues des quelques grains de pollen qu'il renferme. Le miel de menthe (*Mentha aquatica*) a la particularité de contenir de la vitamine C (ou acide ascorbique) (Laudine, 2010).

#### **I-5.1.2.6. Les substances aromatiques**

Les substances aromatiques sont, comme leur nom l'indique, à l'origine de l'arôme du miel. Seules quelques unes ont été identifiées, notamment l'anthranilate de méthyle, le diacétyl, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acétone et l'isobutyraldéhyde (Laudine, 2010).

#### **I-5.1.2.7. Les pigments**

Certains appartiennent au groupe des caroténoïdes et des xanthophylles ; d'autres aux polyphénols (flavonoïdes) (Clement *et al.*, 2000). Laudine, 2010 signale que les substances phénoliques interviennent sur la couleur du miel : la couleur jaune, par exemple, est liée aux flavonoïdes.

### **I-5.2. Propriétés physiques**

#### **I-5.2.1. Indice de réfraction**

Il varie proportionnellement avec la température et la teneur en eau (de 1,5041 à 1,4915 pour une teneur en eau de 13 à 18 %, donc pour la plupart des miels, et atteint 1,4789 pour les miels de callune avec 23 % d'eau). L'utilisation d'un réfractomètre permet ainsi de connaître la teneur en eau des divers échantillons (Clement *et al.*, 2000).

### **I-5.2.2. Densité**

Les variations de densité proviennent surtout des variations de la teneur en eau ; plus un miel est riche en eau et moins il est dense. En moyenne elle est de 1,42 à 20°C (Louveaux, 1985).

### **I-5.2.3. Viscosités**

Elle diminue quand la température s'élève jusqu'à 30°C. Elle est fonction de la température, de la teneur en eau et des autres constituants du miel, en particulier de la composition des différents sucres (Jean-Prost, 2005).

### **I-5.2.4. Conductivité électrique**

La conductivité électrique représente un bon critère pour la détermination de l'origine botanique du miel. Cette mesure dépend de la teneur en minéraux et de l'acidité du miel, plus elles sont élevées, plus la conductivité correspondante est élevée (Bogdanov, 1999).

### **I-5.2.5. Pouvoir rotatoire**

Selon la nature de l'ensemble des sucres contenus dans les miels, la lumière polarisée est fréquemment déviée à gauche dans la plupart des échantillons ou, plus rarement, à droite (Clement *et al.*, 2000). Jean-Prost, 2005 confirme que la majorité des miels sont lévogyres mais il existe des miels naturels dextrogyres.

### **I-5.2.6. Hygroscopicité**

Le miel a la capacité d'absorber l'humidité de l'air lorsqu'elle est supérieure à 55%. Le fructose est largement responsable de cette propriété (Bruneau, 2005).

## **I-5.3. Propriétés chimiques**

### **I-5.3.1. Acidité**

L'acidité est un critère de qualité, dû aux acides organiques présent dans le miel (Bogdanov, 1999). La norme européenne pour le miel fixe une valeur maximale de 50 milliéquivalent/kg (Bogdanov, 2005).

### **I-5.3.2. pH**

Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5 ; elle est due à la présence des acides organiques (Bogdanov *et al.*, 2004). Selon Schweitzer, 2005, les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellats, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5.

### **I-5.3.3. Hydroxyméthylfurfural (HMF)**

L'HMF est un facteur important de la qualité du miel. À la récolte, le miel n'en possède pas, mais le temps et la température favorisent sa formation. Or, les normes légales acceptent jusqu'à 40 mg d'HMF/kg (Laudine, 2010).

### **I-5.4. Propriétés organoleptiques**

Selon leurs origines, les différents miels présentent des caractères visuels, olfactifs, gustatifs et tactiles particulièrement diversifiés. L'examen organoleptique d'un produit est la fiche descriptive donnée par l'ensemble des perceptions sensorielles ressenties par le consommateur. Il peut ainsi apprécier ses qualités essentielles mais aussi ses défauts (Clément *et al*, 2000).

#### **I-5.4.1. Couleur**

La couleur est une caractéristique physique importante des miels car elle est en rapport avec leur origine florale ainsi qu'avec leur composition. Elle peut aller d'une teinte presque incolore au brun sombre. Le chauffage, le vieillissement ainsi que la lumière provoquent une intensification de la coloration du miel (Laudine, 2010).

#### **I-5.4.2. Odeur**

Dans les différents miels, elles varient considérablement mais s'évaporent très rapidement. Elles sont végétales, florales ou fruitées, puissantes ou non, fines, lourdes, vulgaires. Une odeur de fumée ou de fermentation est un défaut (Clément *et al*, 2000).

#### **I-5.4.3. Goût**

Il s'agit des arômes, de la saveur (acide, sucrée, salée, amère) et de la flaveur par voie rétro-nasale. Ils sont végétaux, floraux, empyreumatiques, fins, puissants ou persistants, exogènes. L'arrière-goût peut être amer ou acide et laisse une fin de bouche de tanin, de rance, de fumée...etc (Clement *et al*, 2000).

#### **I-5.4.4. Cristallisation**

Le miel consiste en une solution sucrée sursaturée. La cristallisation du miel est ainsi un processus naturel. La vitesse de cristallisation dépend surtout de la teneur en glucose du miel ; Les miels dont la teneur en glucose est < 28 g/100 g ou dont le rapport glucose/eau est < 1,7 restent plus longtemps liquides (Msda, 2003).

Bogdanov, 1999 signale que les facteurs qui vont favoriser la cristallisation du miel sont :

- **La teneur en sucre** : plus la teneur en glucose est élevée, plus rapide sera la cristallisation du miel.



- **La température :** la température optimale pour la cristallisation du miel se situe entre 10 et 18°C, une température constante de 14°C est idéale.
- **La teneur en eau :** les miels avec une teneur en eau de 15 à 18% donnent une bonne cristallisation. Ceux dont la teneur est inférieure ou supérieure cristallisent plus lentement.

### **I-6. Altération du miel**

Le miel est un produit périssable qui subit au cours du temps un certain nombre de modifications aboutissant inévitablement à la perte de ses qualités essentielles. La rapidité de la dégradation dépend de la composition du produit ainsi que des conditions de sa conservation. De plus, étant très hygroscopique, le miel confiné en atmosphère humide absorbe l'eau rapidement. Ce phénomène gagne rapidement en profondeur et le miel hydraté acquiert une structure très fragile. Dans la mesure du possible, les bocaux de conservation du miel seront secs et aérés et les emballages se feront en containers pleins et fermés hermétiquement (Huchet et al., 1996).

#### **I-6.1. Effet du vieillissement**

Selon Louveaux, 1968a, le vieillissement du miel à une température ordinaire conduit à une dégradation progressive qui se traduit par une perte des substances volatiles qui contribuent à l'arôme du miel, à l'augmentation de la coloration, à la teneur en HMF et à l'acidité. Il est principalement dû à l'action des enzymes et aussi des modifications chimiques lentes, avec le temps les miels brunissent, ils perdent du glucose et du lévulose avec une augmentation du maltose et du saccharose (Polus, 2007).

La gravité de cette altération, à laquelle est associée une augmentation du taux de l'acidité et une disparition rapide des enzymes, est directement liée à de mauvaises conditions de stockage (Huchet et al, 1996).

#### **I-6.2. Effet du traitement thermique**

Le miel ne doit pas être chauffé ou transformé à un point tel que sa composition essentielle soit changée et/ou que sa qualité s'en trouve altérée (Codex, 2008). Si le produit s'échauffe, on observe alors une dégradation plus ou moins rapide des sucres, dégradation qui s'effectue essentiellement aux dépens du fructose et s'accompagne de la formation d'hydroxyméthylfurfural (*figure 4*). Ce dernier produit n'existe pratiquement pas dans les miels en rayons dans la ruche mais apparaît après quelques mois par vieillissement naturel. Il est le résultat de la déshydratation moléculaire des monosaccharides et, tout particulièrement, le fructose qui sont dégradés en milieu acide :

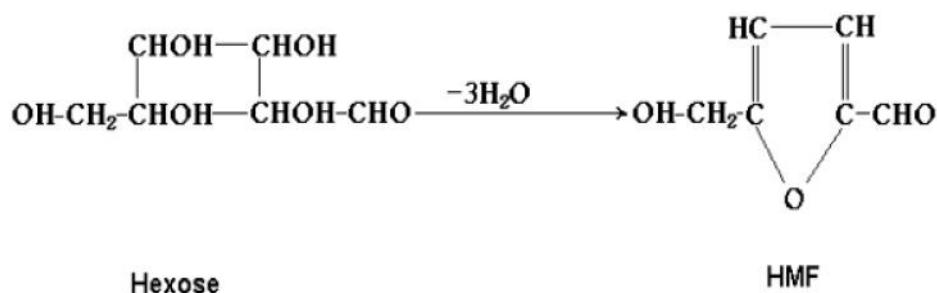


Figure 04 : Formation d'hydroxyméthylfurfural (Bogdanov, 2009).

L'acidité et une teneur en eau élevée favorisent cette transformation, mais l'excès de chaleur et un entreposage prolongé sont des facteurs encore plus importants dans ce processus (Marceau, *et al.* 1994).

### I-6.3. Effet de la fermentation

Le miel a une tendance naturelle à fermenter s'il n'est pas conservé au sec et de manière hermétique. Lors de la fermentation, les qualités organoleptiques du miel et ses propriétés sont détériorées (Laudine, 2010). Les levures responsables de la fermentation sont des levures osmophiles qui proviennent du nectar mais également de pollutions accidentelles dues aux abeilles ou par contamination après la récolte (Makhloufi, 2010). Cette fermentation peut être décelée par l'analyse des levures au microscope (Msda, 2003). Si le miel à stocker présente un risque de fermentation, il faudra impérativement le pasteuriser ou le conserver à une température de 4 à 5°C (Huchet *et al.*, 1996).

### I-7. Fraude de miel

L'adultération est une pratique frauduleuse consistant en l'ajout d'un produit de moindre valeur à un autre produit, qui est alors vendu ou donné pour ce qu'il n'est pas. On en observe dans le miel depuis la commercialisation de sirops de sucre bon marché et de compositions chimiques voisines de celles des miels. Ces sirops de sucre peuvent être additionnés au miel après la récolte, ou directement durant la miellée. Ces actes malveillants ont des conséquences économiques néfastes pour les producteurs respectueux de la législation (Cotte, 2003).

Selon Cordella et Moussa, 2009, Le contrôle de l'adultération des miels exige une très bonne connaissance du produit. Il peut emprunter deux voies souvent complémentaires : la caractérisation du produit pour en connaître les constituants chimiques et mettre en évidence de fortes variations de ceux-ci et la recherche et l'identification d'anomalies constitutives (traceurs cellulaires ou moléculaires).

### I-7.1. Fraudes de nature physico-chimique

▪ Les plus simples consistent à mettre sur le marché des miels « sales », avec de nombreuses traces minérales tels argiles, cristaux, terres, des débris d'épidermes ainsi que de cellules renfermant de l'amidon, des restes d'insectes, des levures inactivées pouvant même former de véritables tapis;

▪ Un miel qui renferme un taux d'humidité trop élevé est généralement un produit récolté soit trop tôt, avant operculation et maturation dans la ruche, soit dans des régions tropicales humides, surtout à la saison des pluies. De tels miels sont riches en levures et fermentent très rapidement.

▪ **La pollution** : des résidus de produits chimiques divers, en particulier de traitements insecticides ou fongicides et autres substances de protection des végétaux, de la pollution atmosphérique ou de traitements vétérinaires des ruches normalement à faire en période de repos des abeilles ;

▪ **L'addition de sirop ou de sucre de canne** est aisément détectée par une simple analyse chimique du miel ou bien par la présence de cellules et de débris de cellules végétales observés en microscopie photonique en lumière normale ou polarisée (Clement *et al.*, 2000).

▪ **L'ajout de l'amidon** qui peut être détecté lors de l'analyse pollinique du miel : la quantification ou le dénombrement des grains d'amidon se fait par rapport aux pollens. Généralement, un échantillon de miel est considéré conforme lorsque la quantité d'amidon ne dépasse pas un à quatre grains pour cent pollens (Cordella et Moussa, 2009).

### I-7.2. Fraudes de nature botanique et géographique

Les analyses polliniques des miels sont réalisées pour déterminer ou contrôler l'origine géographique des miels.

▪ Toute élimination des particules solides des miels, tels le pollen et les spores, est interdite, de même que leur addition.

▪ Une nouvelle méthode d'authentification de l'origine géographique d'un miel à partir du pollen peut être mise au point en étudiant la structure de la cellule, de l'intine et du pollenkitt de ce dernier. Si aucun grain ne présente de modifications ultrastructurales, le pollen a été introduit après récolte ; en revanche, si l'intine et le cytoplasme de nombreux grains ont subi des dégradations sous l'action des enzymes alors que le pollenkitt est en bon état, cela signifie que le pollen était présent lors de l'élaboration du miel (Clement *et al.* 2000).

Chapitre



Mélistopalyndologie

## **II- Caractérisation pollinique du miel: Méliisso-palynologie**

### **II-1. Relations entre les abeilles et les plantes à fleurs**

Les abeilles dépendent exclusivement du monde végétal pour leur alimentation. Le nectar, le miellat et le pollen constituent les trois aliments essentiels de la colonie. Le miellat, déjection sucrée d'origine animale (pucerons, cochenilles, etc.), peut aussi parfois représenter une source de nourriture non négligeable. Indépendamment de ces trois aliments, un autre produit végétal est également récolté; il s'agit d'une substance résineuse qui sert, entre autres, à l'aménagement de l'habitat de la colonie : la propolis. En contrepartie, les plantes à fleurs bénéficient généralement du transport du pollen. La pollinisation est ainsi assurée, elle permet la fécondation des ovules qui pourront se transformer en graines. Par la même occasion, la formation des fruits sera possible (Melin E., 1999).

### **II-2. Pollinisation**

Le transport du pollen sur le stigmate (partie supérieure du pistil) est un phénomène appelé pollinisation. De nombreuses plantes à fleurs exigent une fécondation croisée pour assurer la production de graines et de fruits (les ovules ne peuvent être fécondés par le pollen originaire de la même plante). Les agents qui assurent le transport du pollen sont les suivants :

- Le vent (plantes anémogames) : 20 à 30 % des plantes (graminées, certains arbres);
- L'eau : 1 à 5 % des plantes (plantes aquatiques);
- Les animaux : oiseaux, escargots, limaces mais essentiellement insectes (plantes entomogames) : 75 à 80 % des plantes. (Melin E., 1999).

Les insectes pollinisateurs sont un groupe comprenant un très grand nombre d'espèces. L'abeille domestique (*figure 05*) est sans doute l'espèce la plus connue, mais il est important de ne pas oublier les autres espèces de pollinisateurs telles que les bourdons et les abeilles solitaires, les papillons, certaines mouches telles que les syrphes ou encore certains coléoptères. Ces insectes visitent les fleurs, principalement pour se nourrir de nectar et de pollen. Une abeille peut visiter plus de 200 fleurs en une heure, et elle stocke plus de 500 000 grains de pollen sur une seule de ses pattes, sans compter tous les grains qui s'accrochent à ses poils et vont ainsi fertiliser les autres fleurs visitées (Cabannes B. et Gautier M., 2013). Ce faisant, ils transportent le pollen de fleurs en fleurs et réalisent la pollinisation des plantes permettant ainsi leur reproduction. L'attractivité des fleurs pour les pollinisateurs diffère entre espèces de plantes. La couleur, la forme, le parfum, l'offre en nectar sont autant de caractères qui interviennent dans cet attrait (Baude M. et al., 2011). En réalité, La récolte du pollen par les abeilles va dépendre de la qualité et de la quantité des grains. Un grain trop fin et trop

agglutinant ne sera pas récolté préférentiellement (cas du troène); un grain trop gros sera également délaissé (cas de la mauve sauvage). Un pollen trop abondant peut aussi être évité par la gêne importante qu'il occasionne à l'abeille lors de la récolte (cas du tournesol). L'évolution de la récolte du pollen au cours de l'année dépend nécessairement de l'environnement floral. Dans nos régions, les saules et les arbres fruitiers sont les principales espèces qui contribuent aux récoltes printanières. Celles-ci représentent d'ailleurs souvent plus de la moitié du poids de pollen récolté sur l'année. En fin de saison, les trèfles et le lierre participent aussi de manière significative aux récoltes (Melin E., 1999).

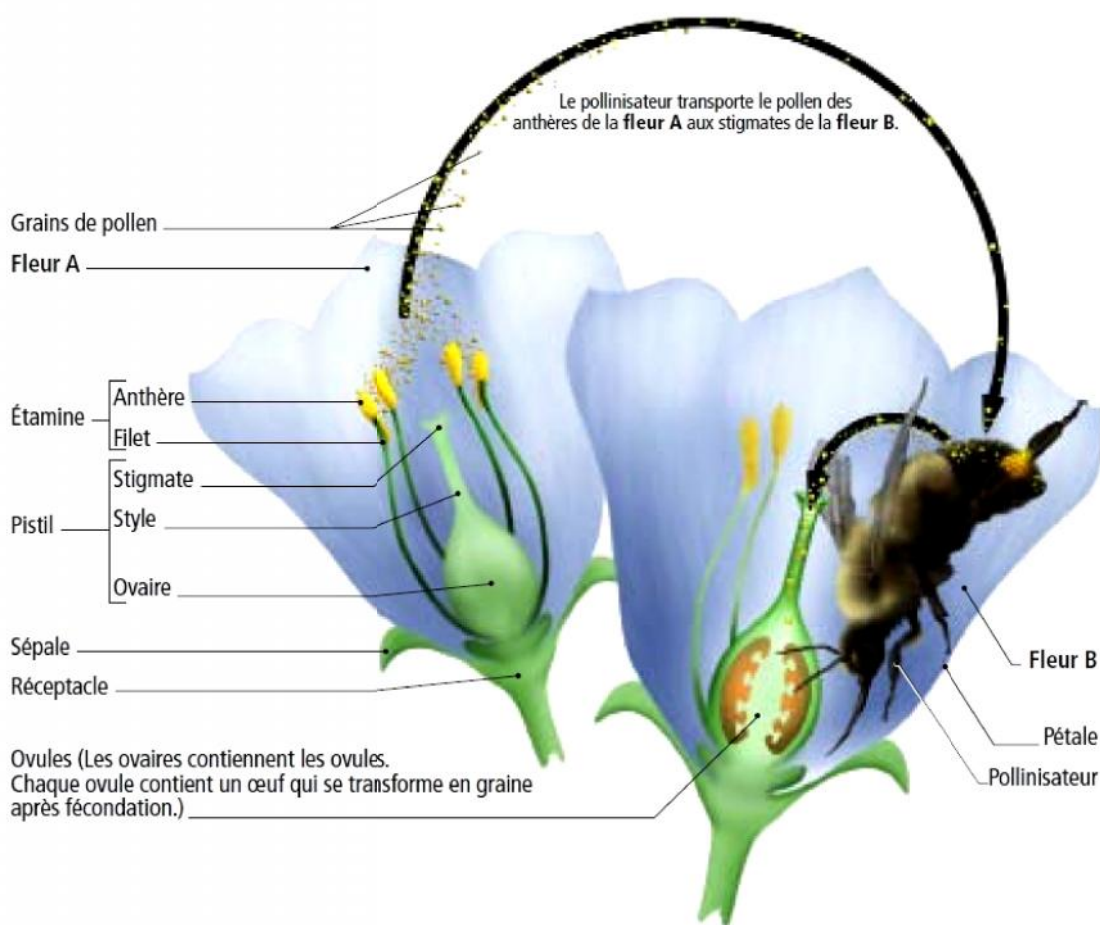


Figure 05 : Processus de pollinisation (FCF, 2015).

Parmi le grand nombre de plantes à fleurs (Spermatophytes) que comporte la flore de notre région (l'Algérie), on peut remarquer des plantes nectarifères et d'autres pollinifères et susceptibles d'être visitées par les abeilles. Toutes ces plantes ne sont pas systématiquement butinées. Divers paramètres influencent l'attractivité de ces plantes vis-à-vis de l'abeille. Les conditions du milieu et le fonctionnement biologique de la plante vont en particulier être déterminants. Dès lors, on peut considérer que les principales plantes mellifères régulièrement

visitées par les abeilles sont au nombre d'une bonne centaine. Et parmi celles-ci, il ne reste plus qu'une trentaine de plantes qui peuvent participer significativement à une miellée ou à un apport conséquent de pollen. En raison de ces éléments, la pratique de l'apiculture mérite nécessairement une connaissance élémentaire des plantes apicoles, de leur physiologie (nature et qualité de leur production nectarifère et pollinifère) et de leur écologie (répartition des plantes, influences des facteurs de l'environnement) (Melin E., 1999).

### II-3. Rôles économiques et écologiques des abeilles

Selon Bruneau (1991), les colonies d'abeilles ont des rôles économiques et écologiques essentiels :

- *Rôle économique direct* : L'apiculture est à la base des produits de la ruche (miel, pollen, gelée royale, cire, propolis). Ainsi le nombre de personnes salariées employées dans ce secteur.
- *Rôle économique indirect* : Par leurs qualités pollinisatrices, l'abeille (plus de 90%) et les autres insectes représentent un apport économique de plus de 10% de la valeur globale des productions agricoles. Exemples : les abeilles contribuent à 18% des récoltes de pommes, 55% de celles de mandarines, 50% de celles d'aubergines pour la C.E.E. en 1985.
- *Rôle écologique* : L'apiculture contribue également à la préservation du patrimoine écologique. 20.000 espèces végétales dépendent ainsi de l'abeille pour leur reproduction (Melin E., 1999).

### II-4. Pollen

Le pollen (du grec *Palè* = "poussière" ou "farine") des plantes sont les gamétophytes mâles. C'est lui qui va fournir le noyau haploïde qui ira féconder la cellule haploïde femelle (l'oosphère). Il est contenu dans les anthères, c'est à dire les sacs polliniques suspendus aux extrémités des filets, (anthère et filet formant l'étamine). Riches de divers pigments protecteurs : caroténoïdes et flavonoïdes, les grains arborent souvent des couleurs jaunes ou orangées, mais aussi parfois pourpres, vertes, blanches ou violettes, bleues, roses suivant l'espèce.

Le grain de pollen constitue le gamétophyte mâle des plantes à fleurs, c'est-à-dire un sac de deux cellules dont l'une assurera la fécondation de l'oosphère contenue dans les ovules. Après la fécondation, le pistil évolue en fruit tandis que le ou les ovule(s) se transforme(nt) en graine(s). Le pollen est produit au niveau des anthères, sacs à deux loges de la partie supérieure des étamines. Les grains de pollen ont des caractères morphologiques spécifiques; on peut donc identifier une plante (espèce, genre ou famille) par l'observation de son pollen.



La taille du pollen peut varier de 0,002 à 0,3 mm. La forme et l'ornementation de la paroi sont également typiques; celle-ci est constituée de sporopollénine, un polymère dur et compact qui est la substance naturelle la plus résistante produite par un végétal. La composition du pollen est très variable. Néanmoins, les composants suivants s'y retrouvent de façon constante : protéines (environ 20 %), glucides (25 à 48 %), lipides (1 à 20 %), vitamines (surtout B, C, carotène et caroténoïdes) et sels minéraux (environ 3 %). La richesse en protéines est particulièrement importante lors du développement de la colonie au printemps. A ce moment, l'élevage des larves exige une nourriture riche en azote. La récolte annuelle d'une colonie est de l'ordre de 30 à 50 kg. Une pelote de pollen pèse environ 10 mg et comporte entre 200.000 et 2.000.000 de grains. (Melin E., 1999). Selon (Ravazzi, 2007), Un grain de pollen est composé d'un cytoplasme très riche en matière de réserve contenant les noyaux reproducteurs et végétatifs et entouré d'un sporoderme. Ce dernier est subdivisé en deux couches concentriques (*figure 06*):

- **L'intine**, une mince pellicule interne de nature cellulosique.
- **L'exine**, une enveloppe extérieure constituée du sporopollenine (substance plus polymérisée, du groupe de caroténoïdes). Cette dernière confère au grain le pouvoir de résister aux diverses causes de dégradation et de se conserver presque indéfiniment au cours des temps. Chaque grain de pollen d'une espèce végétale est déterminé après observation microscopique qu'il soit optique ou bien électronique grâce à sa forme, sa taille, ses caractéristiques morphologiques et la structure variée de sa surface (Renault et al., 1992).

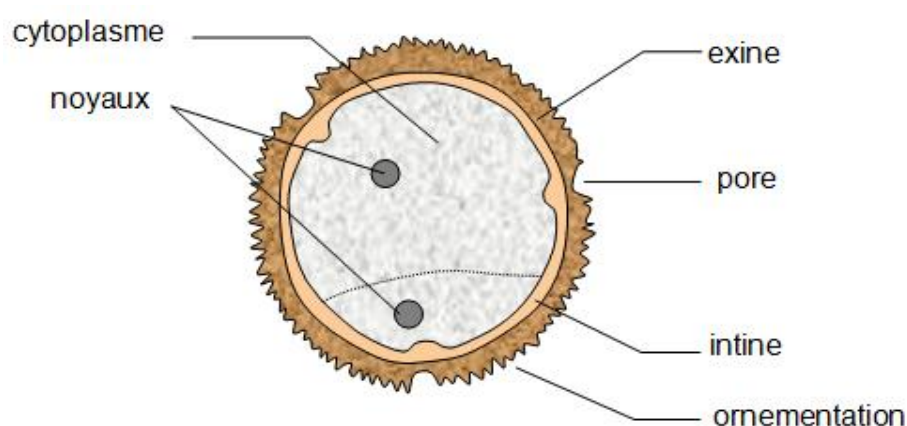


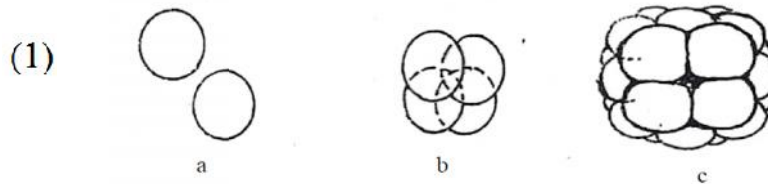
Figure 06: Structure schématique d'un pollen (Prost, 1987).



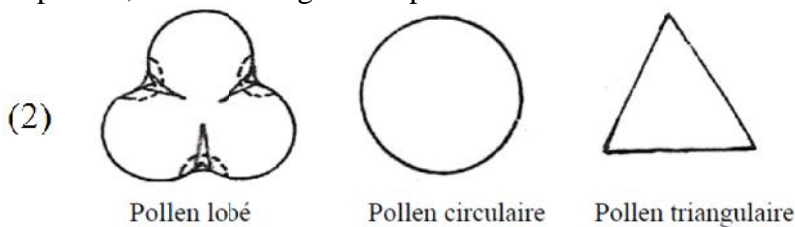
### II-4.1. Forme et la symétrie

La forme du grain de pollen est variable (*figure 07* et *figure 08*), on peut avoir :

- des grains de pollen simples (les grains se séparent tout de suite après la méiose) : eumonades (a) ;
- des grains composés (les grains formés ne se séparent pas). On a les tétrades (b) (grains groupés en 4, polyades (c) (formés par plusieurs grains).

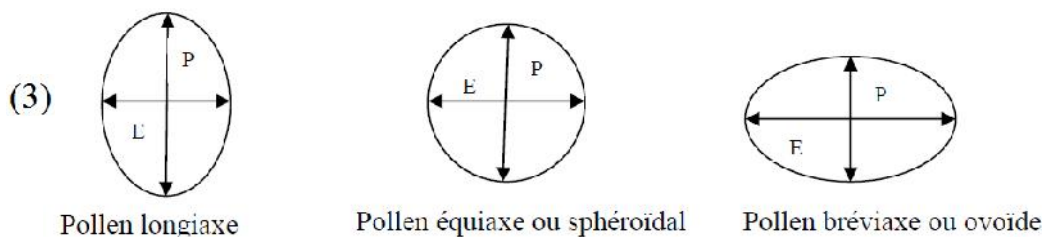


En vue polaire, la forme du grain de pollen est variable :

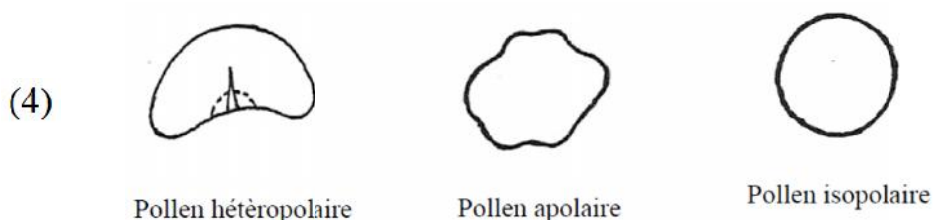


En vue méridienne, le pollen représente un volume pour lequel on définit deux axes :

- l'axe polaire P ligne joignant les deux pôles ; le pôle proximal étant celui qui est situé vers le centre de la tétrade mère, le pôle distal lui étant opposé à l'extérieur.
- L'axe équatorial E perpendiculaire à l'axe P.



La symétrie des pollens est définie par l'emplacement des zones germinales ou ouvertures.

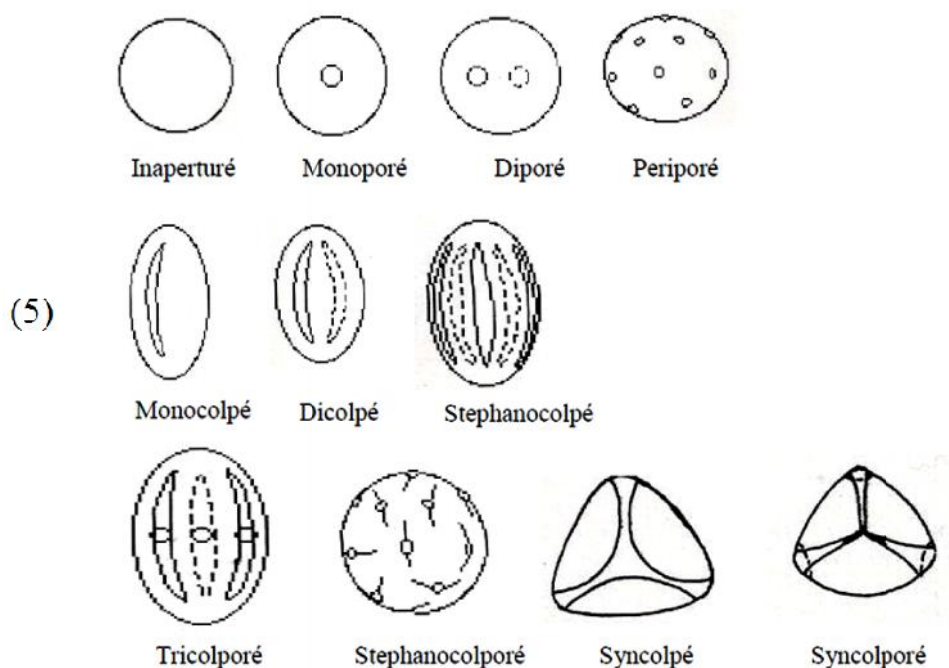


- le pollen apolaire : sans axe de plan de symétrie ;
- le pollen isopolaire : vues polaires identiques et symétriques par rapport au plan équatorial ;

- le pollen hétéropolaire : présentant un axe de symétrie mais les vues polaires sont différents au pôle proximal et au pôle distal.

#### II-4.2. Apertures ou zones germinales

L'aperture est une zone de moindre résistance, due à l'amincissement ou à la disparition de l'exine, qui permet la sortie du tube pollinique (Erdtman, 1952). Ces apertures peuvent se situer aux pôles, à l'équateur ou être réparties sur l'ensemble du grain. Les ectoapertures affectent la couche la plus externe de l'exine, l'ectexine tandis que les endoapertures affectent sa couche la plus interne, l'endexine. La forme de l'aperture peut être variable.

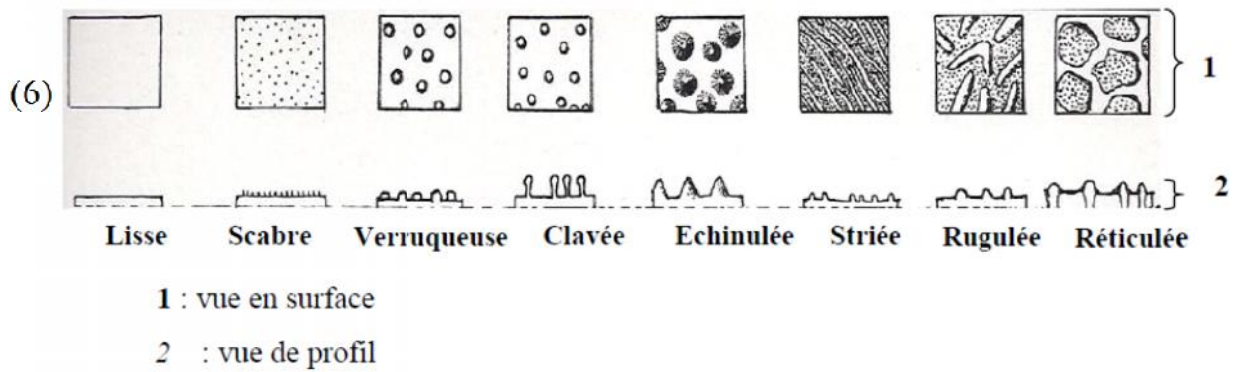


#### II-4.3. Exine

##### a. Ornementation de l'exine

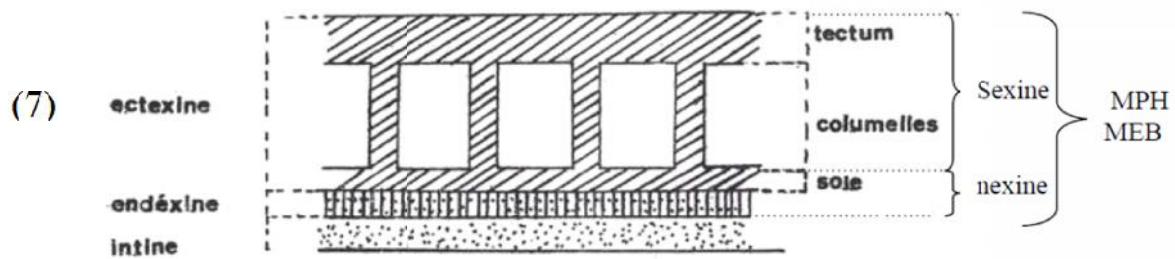
L'exine est une membrane externe, inerte et très résistante du pollen, sa morphologie permet la caractérisation des pollens. La méthode de L.O. ou Lux Obscuritas (lumière, obscurité) permet l'observation de l'ornementation de l'exine par la mise au point de la vis micrométrique du microscope.

L'exine peut être :



**b. Structure de l'exine**

La structure de l'exine définit la constitution de ses différentes couches.



Suivant les groupes taxonomiques, la structure de la couche infratectale est différente :

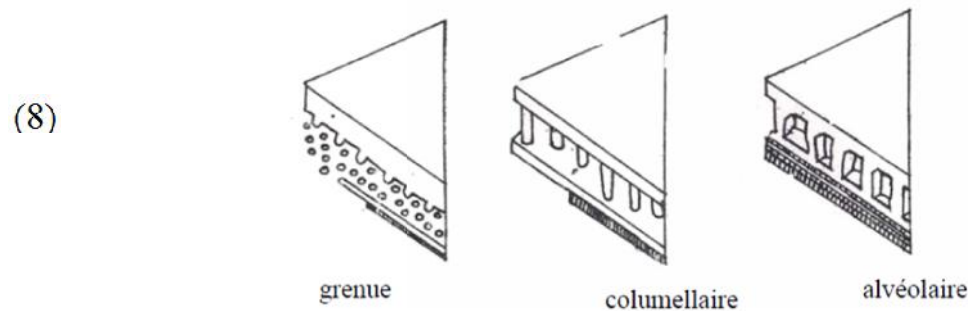


Figure 07: Terminologie de la palynologie (Punt & al, 1994 ; Van Campo, 1957) cité par Randrianarivelo R.H.M. (2010).

(1, 2, 3, 4) : Forme et la symétrie ; (5) : Apertures ou zones germinales ; (6) : Ornementation de l'exine ; (7, 8) : Structure de l'exine.

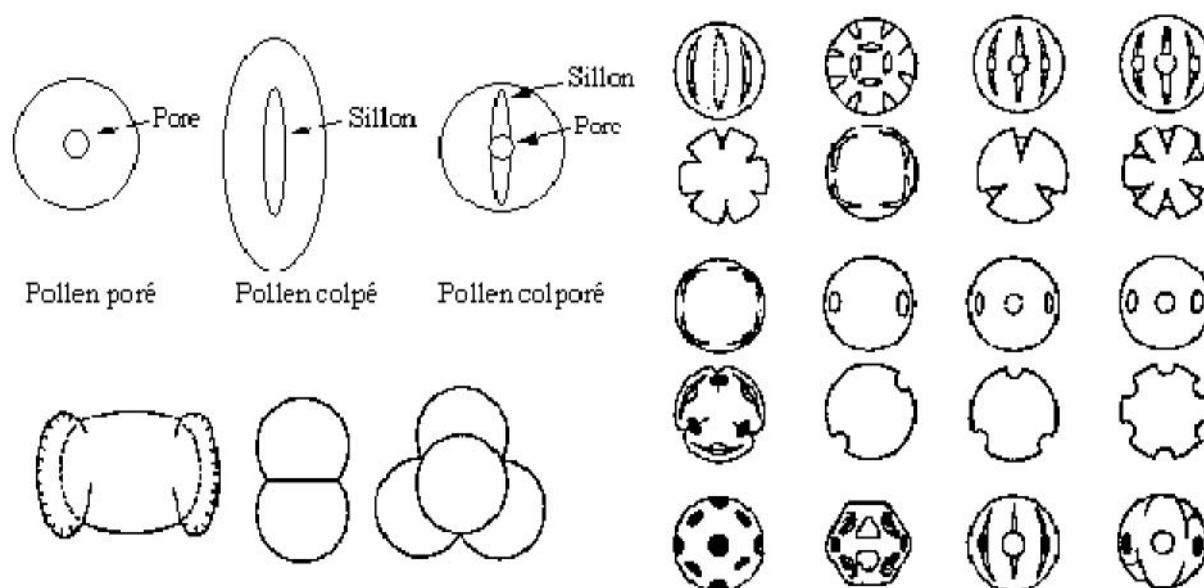


Figure 08: Différents aspects morphologiques des grains de pollen (Jean F.C., 2014).

## II-5. La flore mellifère

Les plantes mellifères -qu'il faudrait appeler plus justement "nectarifères"- produisent du nectar, substance liquide très sucrée récoltée par les insectes butineurs et les oiseaux nectarivores. Certaines abeilles mellifères (*Apis*, *Trigona*, *Mellipona*...) transforment ce nectar en miel. Beaucoup de plantes sont nectarifères, mais seulement une partie peut être butinée par les abeilles domestiques, du fait de leur morphologie (encombrement du corps, longueur de la trompe...). L'apiculture classe une plante comme mellifère lorsque celle-ci est exploitable par l'abeille domestique.

L'Algérie dispose d'un tapis végétal mellifère riche et varié (*figure 09*), il est réparti dans des zones à étages bioclimatiques différentes. Du nord du pays avec ses variétés de miel exquis (agrumes, toutes fleurs...), en passant par les zones montagneuses et les forêts avec des miels très variés jusqu'à la steppe, destination des apiculteurs qui transhument vers d'autres espèces comme le jujubier. Selon les plantes mellifères disponibles pour l'abeille, il peut y avoir des variétés de miels qui sont plus ou moins appréciées et recherchées par les consommateurs. Par ailleurs, et depuis quelques années, les apiculteurs ont compris que pour faire plusieurs récoltes à l'année au lieu d'une seule ou deux seulement, il faut recourir à la transhumance ; une opération qui consiste à transporter les ruches dans des endroits différents, à savoir les hauts- plateaux et même le Sahara. En plus, ces déplacements, même s'ils demandent beaucoup de temps et beaucoup de moyens, surtout matériels, ne sont jamais vains

puisqu'ils permettent de récolter d'autres variétés de miel qui n'existent pas au nord du pays. En effet, en plus du miel multi fleurs, d'oranger, d'eucalyptus, de carotte sauvage...Les professionnels du secteur récoltent chaque année le miel du «Juburier» très réputé et auquel sont conférées plusieurs vertus thérapeutiques, en plus du miel de thym, d'euphorbe...

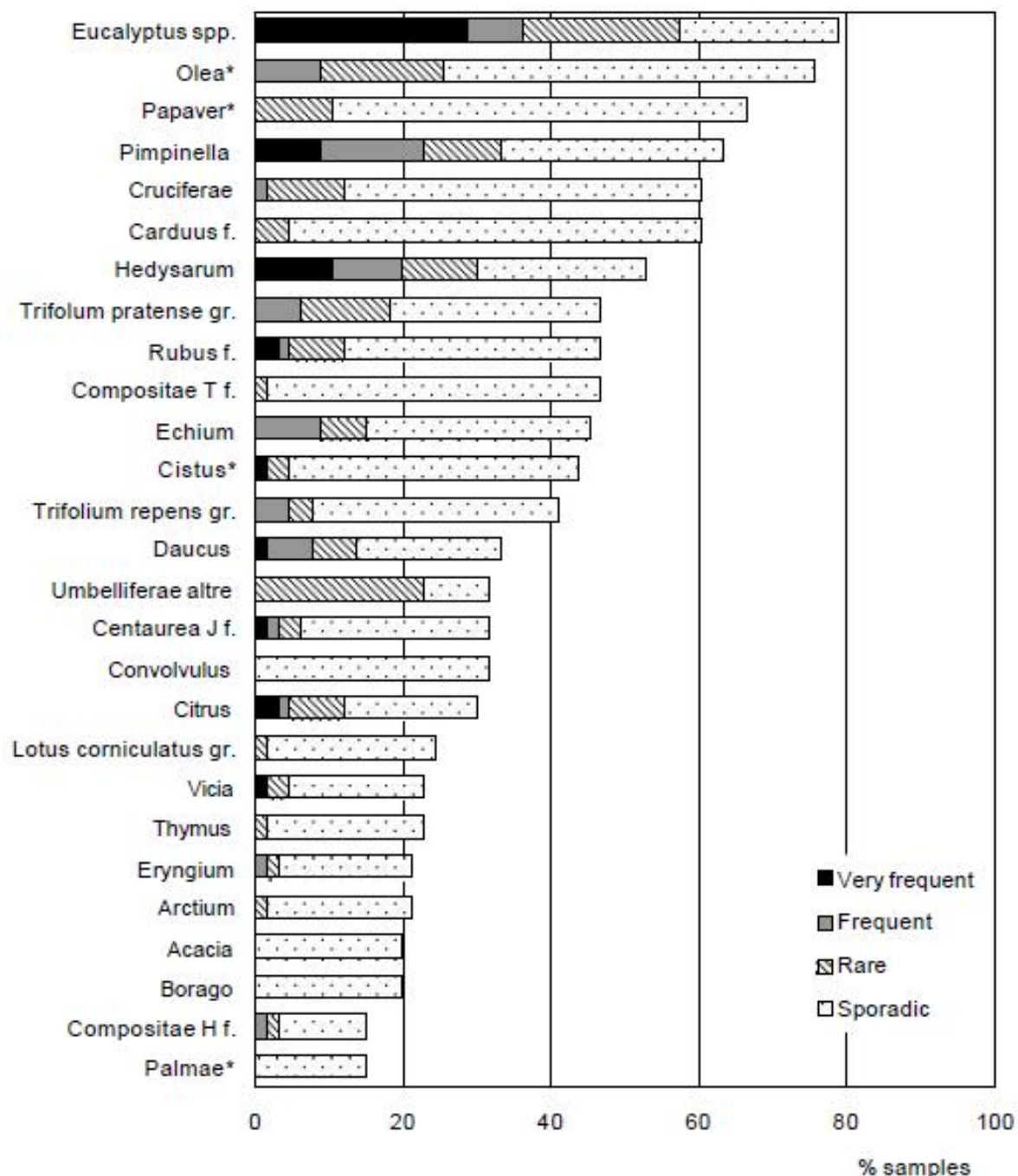


Figure 09: Principales types de pollen identifiés dans 66 échantillons de miel Algérien. (\* = espèces nectarifère) (Makhloufi C. et al., 2007)



## II-6. Plantes toxiques pour les abeilles

Il faut également être vigilant sur la nature des plantes ornementales butinées car certaines d'entre elles présentent une toxicité pour les abeilles ou pour les consommateurs de miel (Laudine, 2010) (Tableau 02).

Tableau 02 : Plantes toxiques pour les abeilles (Adler L.S., 2000).

Famille	Espèces toxiques	Principe toxique identifié
Hippocastanacées	<i>Aesculus californica</i>	Saponines
Fabacées	<i>Astragalus</i> spp. <i>Sophora microphylla</i>	Alcaloïdes
Convolvulacées	<i>Cuscuta</i> spp.	Alcaloïdes
Cyrtillacées	<i>Cyrtilla racemiflora</i>	
Loganiacées	<i>Gelsemium sempervirens</i>	
Ericacées	<i>Kalmia latifolia</i>	Alcaloïdes
Solanacées	<i>Solanum nigrum</i>	Alcaloïdes
Liliacées	<i>Veratrum californicum</i> <i>Zygadenus venosus</i>	
Corynocarpacées	<i>Corynocarpus laevigata</i>	
Apiacées	<i>Angelica triquetra</i>	
Théacées	<i>Camellia thea</i>	
Bombacacées	<i>Ochroma lagopus</i>	
Tiliacées	<i>Tilia</i> spp.	
Apocynacées	<i>Asclepias</i> spp.	

### II-6.1. Miels toxiques

D'après Faliu L. (1994), des intoxications par le miel ont été observées depuis des siècles et sur plusieurs continents, mais elles sont extrêmement rares. Toutes les plantes toxiques butinées ne donnent pas obligatoirement des miels toxiques, car il faut d'une part que le poison se retrouve dans le nectar (c'est le cas le plus fréquent), le pollen ou le miellat, et que, d'autre part, les plantes toxiques butinées soient très abondantes pour que le miel contienne une quantité suffisante de toxine susceptible de provoquer des symptômes. Les espèces végétales responsables de la production de miels toxiques sont récapitulées dans le tableau suivant (Tableau 03 et figure 10).

Tableau 03 : Plante produisant des miels toxiques et symptômes de l'intoxication (Fallu L, 1994 et Adlers L.S, 2000)

Famille	Espèces toxiques	Principe toxique identifié	Symptômes	Traitement
Ericacées	<i>Rhododendron ponticum</i>	Grayanotoxines I à XII	15 à 25 min après l'ingestion de miel Troubles digestifs : nausées, vomissements, diarrhée Troubles cardiaques : douleurs au niveau de la poitrine, ralentissement cardiaque 30 à 50 bpm. arythmie, hypotension sévère (60/40 mmHg) Troubles nerveux : céphalées, engourdissement des extrémités, picotements; parfois convulsions, paralysie progressive, trouble de la vision, grande faiblesse, perte de conscience	Lavage gastrique Assistance cardiaque
	<i>Rhododendron flavum</i>			
	<i>Rhododendron vitatum</i>			
	<i>Rhododendron arboreum</i>			
	<i>Campanulatum</i>			
Coriariacées	<i>Kalmia</i> spp.	Tutine Hydranchine Corianthrine	Trouble nerveux: hypersensibilité, convulsions, céphalées Douleurs abdominales Vomissements, Agitation violente avec délire Perte de mémoire voire coma	Barbituriques (pentobarbital sodique) ou Diazépan (Valium®)
	<i>Agaricia</i> spp.			
	<i>Andromeda</i> spp.			
	<i>Azalea pontica</i> <i>Tripetale</i> (Azalee du Japon)			
Loganiacées	<i>Gelsemium sempervirens</i> (Faux-jasmin)	Gelsemine	Agitation, cécité, mydriase, lassitude, nausées convulsions	-
Solanacées	<i>Datura stramonium</i>	Hyoscyamine Scopolamine	-	-
	<i>Datura metel</i> <i>Tyloscyanus niger</i>			
Euphorbiacées	Euphorbes	-	Irritation de la bouche et de la gorge, nausées	-
	<i>Aconit napel</i> Aconit me-loup			
Légumineuses	Cytise	-	-	-
	Gené d'Espagne Astragales			
Hippocastanacées	Marouliers	-	-	-
	Tilleuls			
Buxacées	Buis	-	-	-

Araliacées	Lierre	-	-
Ombellifères	Grande ciguë ou Ciguë de Socrate	-	-
Asclepiadacées	<i>Asclepias</i>	-	-
Apocynacées	Laurier-rose	-	-
Tyméléacées	Bois gentil <i>Daphne mezereum</i>	-	-
Liliacées	Vérâtes	-	-
Boraginacées	<i>Echium plantagineum</i>	Alcaloïdes	-
Sapindacées	<i>Paullinia australis</i>	-	-
		Cirrhose hypertrophique du foie	-





			
<i>Datura stramonium</i> ( <i>Datura stramonium</i> )	<i>Euphorbia lathyris</i> ( <i>Euphorbia lathyris</i> )	<i>Nerium oleander</i> ( <i>Nerium oleander</i> )	<i>Polygonatum odoratum</i> ( <i>Polygonatum odoratum</i> )

Figure 10 : Plantes toxiques pour les abeilles (Faliu L., 1994)



## II-7. Palynologie

La palynologie est l'étude des grains de pollen et spore actuels mais aussi des palynomorphes (cellules et organismes microscopiques à parois organiques). Les applications de la palynologie sont diverses :

- La **paléopalynologie** : c'est la science qui étudie les palynomorphes fossiles, elle se base sur l'incroyable facilité avec laquelle le pollen peut se retrouver intact à l'état fossile. Elle permet de dater des **couches géologiques**, des **ossements**, des **objets**, mais aussi, par reconnaissance des espèces, de déterminer les types de végétation passés et donc l'évolution des climats.
- L'**aéropalynologie** : par l'étude de pollen en suspension dans l'**atmosphère**, on peut estimer le taux de pollinisation des cultures, mais surtout prévoir des cartes de risques d'allergies aux pollens.
- La **mellisopalynologie** : cette science permet de quantifier et d'identifier le pollen présent dans le miel, et ainsi de déterminer sa provenance, éventuellement détecter des fraudes et certifier le miel en tant que miel mono-floral. Exemples : Miel de tournesol, Miel de lavande...
- En **analyses archéologique** et/ou **criminologie** : la détection et l'identification de pollens sur les objets, des textiles ou des corps, peut donner de précieux renseignements. On peut ainsi estimer à quelle période de l'année se sont déroulés les faits et la provenance géographique d'un l'objet.

### II-7.1. Analyse pollinique de miel « Méliisopalynologie »

La flore variée de l'espace méditerranéen permet d'avoir de multiples variétés de miels, aux goûts et propriétés différents. La dénomination du miel fait référence soit à la plante principale qui le compose, soit à l'aire géographique de butinage ([Cabannes B. et Gautier M., 2013](#)). Le seul moyen infaillible pour délivrer la « carte d'identité » d'un miel est de faire son analyse pollinique (ou méliisopalynologie), cette dernière donne une information précise sur les principales plantes mellifères et permet de caractériser les miels par leur origine botanique ou géographique. Elle apporte aussi des informations importantes sur le comportement de butinage des abeilles. Par ailleurs, la teneur en pollen des miels permet de contrôler leur qualité, augmentant ainsi leur valeur économique ([Telleria, 1988](#)). Il permet également de faire des constatations sur l'éventuelle souillure du miel par des particules insolubles ainsi que sur la quantité de levures présentes ([Laudine, 2010](#)). La méliisopalynologie

palynologie est donc une garantie sûre de contrôle de qualité, de prévention et de répression des fraudes.

### II-7.1.1. Analyse pollinique quantitative

L'analyse pollinique quantitative consiste en l'identification fine de chaque pollen. C'est une analyse assez longue de par la diversité des pollens rencontrés, de l'ordre de la centaine. Le spectre pollinique est le pourcentage de chacun d'entre eux (Laudine, 2010).

Selon Clément *et al.* (2000). Les observations sont réalisées en balayant la lame de gauche à droite en haut de la préparation, puis arrivé à l'extrémité droite en descendant de plus d'un champ afin d'éviter tout recouvrement des régions déjà observées ; les pollens de cette seconde ligne sont comptés en progressant de droite à gauche et ainsi de suite avec une nouvelle ligne jusqu'à ce que l'ensemble de la préparation soit totalement étudié.

Les résultats sont classiquement exprimés en donnant le nombre de grains de pollen pour 10 g de miel. Et il est possible de classer les miels en 5 catégories :

- **Classe I** : moins de 20 000 pollens pour 10 g de miel;
- **Classe II** : 20 000 à 100 000 pollens;
- **Classe III** : 100 000 à 500 000 pollens;
- **Classe IV** : 500 000 à 1 000 000 pollens;
- **Classe V** : plus de 1 000 000 pollens

Quatre classes également sont définies d'après les quantités relatives du pollen des différentes espèces :

- Pollen dominant (plus de 45 %) ;
- Pollen principal ou secondaire (16 à 45 %) ;
- Pollen d'accompagnement ou mineur important (3 à 15 %) ;
- Pollen isolé ou mineur (moins de 3 %).

### II-7.1.2. Analyse pollinique qualitative

L'analyse pollinique qualitative consiste en l'identification des pollens présents dans l'échantillon afin d'en déterminer globalement la nature : miel de montagne, miel de plaine, miel exotique, etc. (Laudine, 2010).

La morphologie des grains de pollen est très variable selon les espèces végétales. Certains critères morphologiques tels que la taille, la forme, la présence de sillons, de pores et l'ornementation externe permettent aux palynologues de déterminer à quelle espèce appartient le grain (*figure 6*) (Chauzat et Pierre, 2005). L'exine présente fréquemment les figures

géométriques ou des traits qui permettent généralement une bonne identification (Renault et al., 1992). Selon Jeanne (1983), Un très grand nombre de grains de pollen ont une taille de l'ordre de 20 à 50 µm, certains pollens sont de très petite taille, la plus grande dimension ne dépassant quelques micromètres (ex : *Myosotis*). D'autres sont très gros, comme celui de la courge qui est de l'ordre de 200 µm.

### II-7.1.3-Principaux types de miels

#### a-Miels monofloraux

Les miels monofloraux (figure 11) sont élaborés à partir du nectar et/ou du miellat provenant d'une seule espèce végétale et cela nécessite d'installer les ruches à proximité de la plante recherchée. Par exemple;

- *Miel de bruyère blanche* : Couleur ambre, très odoriférant à saveur de caramel, il cristallise rapidement avec une texture fine et onctueuse.
- *Miel de châtaignier* : Couleur ambre foncée, marron à l'état solide avec une cristallisation assez grossière. Odeur forte et goût corsé, avec une certaine amertume. Qualités cicatrisantes et bénéfique pour la circulation sanguine.
- *Miel de lavande ou lavandin* : Un des fleurons des miels français, que les apiculteurs vont souvent chercher dans les Alpes de Haute-Provence en transhumant leurs ruches. Miel très clair dégageant un bouquet de saveurs fruitées et colorées, cristallisant assez finement.
- *Miel de romarin* : miel très clair qui cristallise rapidement, à grains fins.

Arôme discret et goût subtil, réputé depuis l'antiquité (Cabannes B. et Gautier M., (2013) ; Rossant (2011).



Figure11: Observation microscopique du pollen d'un miel monofloral d'*Eucalyptus* (400X)

(Rasoloarijao T.M. (2013).

### b-Miels polyfloraux

Les miels polyfloraux (*figure 12*) sont élaborés à partir du nectar et/ou du miellat provenant de plusieurs espèces végétales. Pour valoriser leur spécificité et permettre au consommateur de reconnaître leur caractère dominant, les apiculteurs indiquent leur origine géographique. Celle-ci indique soit l'aire de production (région, département, massif...) (Rossant, 2011).



Figure 12: Observation microscopique du pollen d'un miel multifloral de forêt (400X) (Rasoloarijao T.M. (2013)).

#### II-7.2.Méthode utilisées en méliisso-palynologie

Le principe de ces méthodes repose sur le fait que tous les miels naturels contiennent en suspension avant et après leur extraction des constituants figurés microscopiques dont les plus importants sont les grains de pollen provenant des fleurs que l'abeille a visitées pour la récolte du nectar. Outre les grains de pollen, les miels naturels peuvent contenir en très faibles quantités : des spores de champignons, des algues microscopiques, des levures, des grains d'amidon, des fragments d'insectes et des poussières atmosphériques. Par centrifugation d'une solution de miel dans l'eau, les éléments figurés peuvent être concentrés dans un très faible volume pour en confectionner des préparations dont l'examen sous microscope apporte les informations sur son origine botanique, son origine géographique, son mode d'extraction, sa souillure éventuelle par des matières insolubles dans l'eau, son état de conservation et son degré de filtration.

##### II-7.2.1. Méthode de Louveaux 1970

L'ingénieur de l'INRA Louveaux a publié en 1970 un référentiel sur lequel se basent de nombreux laborantins encore aujourd'hui. Cette technique est utile pour étudier les miels pauvres en pollen, tel que le miel de lavandin, par exemple (Laudine, 2010).

Cette technique d'extraction et de montage des pollens a été codifiée par la Commission Internationale de Botanique Apicole sous la forme suivante:

10 g de miel sont mis en solution dans l'eau chaude (< 40°C) et centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation est prélevé, déposé sur lame, séché, inclus dans la glycérine gélatinée et recouvert d'une lamelle. Après solidification complète du milieu, la préparation est lutée au baume du Canada (Louveaux, Maurizio et Vorwohl, 1970).

D'après Louveaux (1968b), les préparations obtenues présentent très souvent deux défauts : elles manquent de clarté, ce qui rend plus difficiles les observations, et elles se conservent mal.

### II-7.2.2. Méthode par acétolyse

La méthode de l'acétolyse permet l'étude précise de la morphologie pour l'identification des grains de pollen. Elle permet une observation fine et rigoureuse de la structure de la paroi pollinique, élément qui devient indispensable dans le cas des régions où la flore mellifère est mal connue. En revanche, elle détruit les éléments accessoires des miels tels que levures, spores et algues utiles pour déterminer si un miel a fermenté ou contient du miellat. Par conséquent, on la préférera pour l'étude des pollens exotiques, mais pas pour une analyse de miel en routine.

Cette méthode a été mise au point par Erdtman et a été précisée par Gadbin en 1979 dans la revue *Apidologie*. Etant donné la nécessité de manipuler des mélanges d'acides à chaud sous une hotte, cette méthode ne peut être réalisée qu'en laboratoire (Laudine, 2010).

En 1967, Vorwhol exclut l'acétolyse des méthodes d'analyse du miel comme prenant trop de temps et provoquant la destruction d'éléments figurés accessoires tels que les algues, levures, morceaux d'insectes intéressant pour l'étude du miel (Gadbin, 1979).

### II-7.3. Observation microscopique de pollen

L'observation microscopique et la détermination des caractères morphologiques des grains de pollen a été faite grâce aux techniques d'acétolyse et de lyophilisation. La méthode d'acétolyse utilisée est celle d'Erdtman (1952). Les pollens placés dans un mélange acétolysant: anhydride acétique pur et acide sulfurique concentré (9:1 v.v.), sont placés dans un bain marie froid qui est amené à ébullition durant une minute. Après refroidissement le mélange est centrifugé à 1800 tours/minute pendant 10 minutes. Deux rinçages par centrifugation à l'acide acétique et deux à l'eau distillée sont effectués. Les pollens sont ensuite mis dans un mélange d'eau glycinée (50:50 v.v.), laissés reposer 30 mn et

centrifugés une dernière fois. Les tubes sont retournés pour permettre l'essorage des pollens. Pour l'observation en microscopie photonique, le montage entre lame et lamelle est réalisé dans la gélatine glycinée (50:50 en poids) et lutage à la paraffine. Pour l'observation en microscopie électronique à balayage (MEB), après les rinçages à l'eau, un échantillon est prélevé à l'aide d'une pipette et déposé sur une lamelle de 12 mm de diamètre; la préparation est congelée, puis lyophilisée pour permettre aux pollens de garder leur forme initiale (Youmbi E. et al., 1998). Les caractères d'identification des pollens rencontrés dans une préparation pollinique portent sur :

- la forme et la symétrie,
- les dimensions du grain de pollen,
- l'ornementation de l'exine,
- le nombre et la forme des apertures (Randrianarivelo R.H.M., 2010).

### II-7.3.1. Microscope Optique

On utilise le microscope optique ou photonique classique (avec oculaire et objectif) permettant de couvrir tous les besoins jusqu'à un grossissement de 2 000 fois. L'excellente résolution de ces appareils permet l'observation de détails très fins jusqu'à environ 0,3 micromètre, mais pas plus (figure 13). Par ailleurs, la profondeur de champ est presque nulle ce qui signifie que l'on a une image quasiment plane où le relief n'apparaît pas. L'image est cette fois obtenue par transmission de la lumière à travers l'objet. Il faut donc travailler sur des prélèvements fins ou même des coupes fines pour qu'ils soient transparents à la lumière. Les détails observés sont dus aux variations de contraste dues aux différences d'absorption de la lumière (Beunier L. et Borensztajn S., 2000).

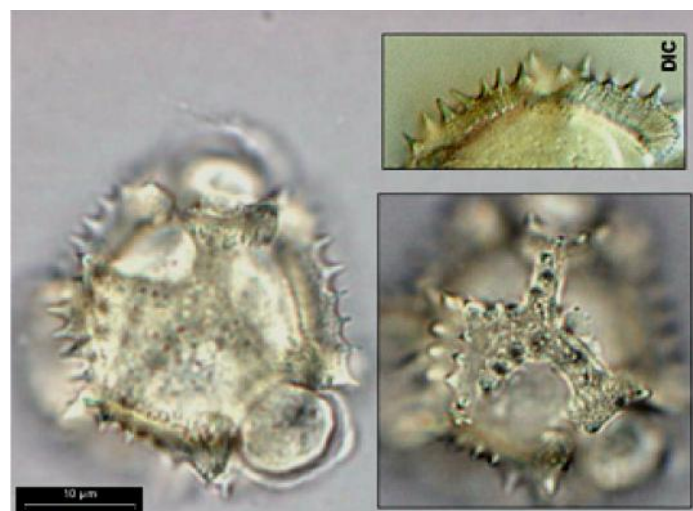


Figure 13: Observation de pollen de *Taraxacum officinale* (Pissenlit) (1000X) par MO



### II-7.3.2. Microscope Electronique

Pour observer de plus en plus petit, les techniques actuelles d'observation peuvent faire appel à un outil particulièrement performant, le microscope électronique. L'avantage du microscope électronique à balayage réside principalement dans l'observation de la surface d'un échantillon entier, en structure tridimensionnelle, sous réserve que celui-ci "supporte" le vide indispensable au passage du flux des électrons. Le microscope électronique à balayage est donc utilisé comme une grosse loupe avec des rapports de grossissements allant jusqu'à 100 000 fois (*figure 14*); il ouvre ainsi la possibilité d'observer des détails très fins, non observables par les autres techniques (Beaunier L. et Borensztajn S., 2000).

L'emploi de la microscopie électronique au cours de ces dernières années a apporté de nombreuses données nouvelles sur la structure des spores et pollens tant pour les formes fossiles que pour les actuelles, en même temps que se confirmait l'importance que revêt cette structure pour la taxinomie et la phylogénie du monde végétal (Cerceanu M-T. et al., 1976).

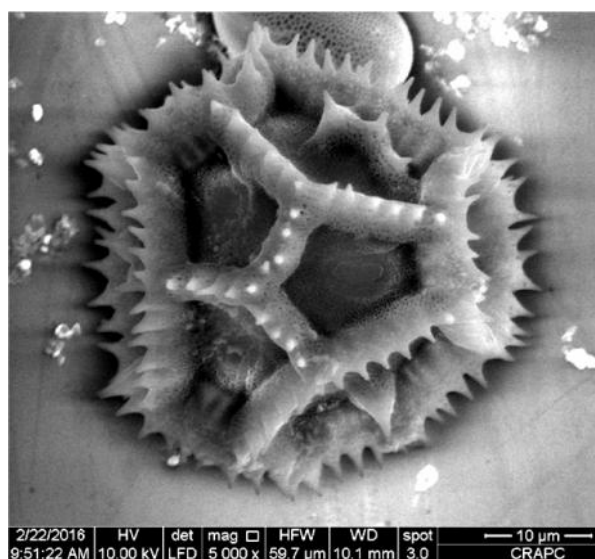


Figure 14: Observation de pollen de de *Taraxacum officinale* (*Pissenlit*) par MEB (5000X) (CRAPC, 2016)

### II-7.4. Préparation des lames de références

L'identification du pollen ne peut se faire que par comparaison de la morphologie observée avec celles de grains connus qui constituent des références (Schweitzer, 2009). Celles-ci peuvent être des microphotographies, soit sur papier, soit numérisées : elles constituent une banque de données que l'on peut consulter pour comparaison (*Annexe*). La documentation utilisée a permis de déterminer les pollens généralement au niveau du genre et quelquefois au niveau de l'espèce. Elle a dû être arrêtée au niveau de la famille dans le cas où les caractères polliniques sont homogènes comme chez les pollens de *Poaceae*. Le terme cf.

(confer) a été utilisé lorsque les pollens ont des caractères morphologiques proches de ceux d'un pollen déjà identifié. Toutefois, certains pollens ont dû être classés indéterminés (Randrianarivelo R.H.M., 2010).

En outre, La meilleure façon de s'initier à la reconnaissance des espèces végétales - qu'elles soient mellifères ou non - est de réaliser un herbier. La récolte des plantes permet leur identification précise, constitue une banque de données de référence et autorise une consultation à n'importe quelle période de l'année. Il faut cependant signaler qu'un certain nombre de plantes sauvages jouissent d'un statut de protection légal, en raison de leur rareté. La réalisation d'un herbier ne doit donc se concevoir que si celui-ci à une réelle vocation éducative ou scientifique. La réalisation de photographies ou de diapositives des espèces mellifères constitue aussi la base d'une intéressante source de documentation. On ne peut qu'inciter à la réalisation de ce type de travail (Melin E., 1999).



Chapitre



Contaminants dans le Miel

### III-1. Contaminants dans le miel

L'abeille, pour les besoins de la colonie, récolte du nectar, miellat, pollen et eau dont l'environnement est exposé à divers contaminants bactériologiques et chimiques qui peuvent se retrouver dans les produits de la ruche consommés par l'homme (comme le miel, gelée royale, ...etc.). À cette pollution des milieux peut s'ajouter une contamination des productions apicoles au moment de conditionnement (Fléché C. *et al.*, 1997).

### III-2. Sources de contamination de miel

Les deux sources de contamination du miel (*figure 15 et tableau 04*) sont : l'environnement, dès les étapes de l'élaboration du miel ; Mais aussi l'apiculteur, par des pratiques apicoles peu rigoureuses. Les contaminants environnementaux sont des métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le mercure et l'arsenic, le fluor, des isotopes radioactifs, des polluants organiques, des résidus de traitements phytosanitaires et des bactéries pathogènes. Les contaminants liés à l'apiculteur et ses techniques sont essentiellement des résidus de médicaments (souvent interdits) utilisés dans la ruche : les acaricides (substances lipophiles, acides organiques, composants d'huiles essentielles) et les antibiotiques (tétracyclines, streptomycine, sulfonamides et chloramphénicol). D'autres substances peuvent également contaminer le miel : para dichlorobenzène (utilisé pour le contrôle de la fausse-teigne) et autres répulsifs (Bogdanov S. 2006).

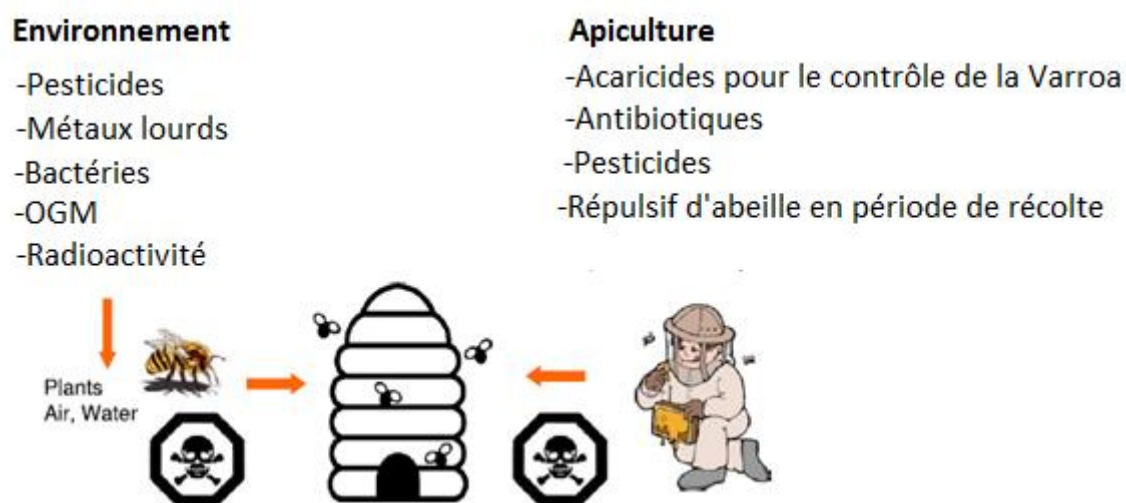


Figure 15: Sources de contamination de la ruche (Bogdanov S., 2005).

OGM: Organisme Génétiquement Modifié

Tableau 04 : Facteurs de contamination du miel (Al-Waili, 2012).

---

<b>Contaminants environnementaux</b>
Métaux lourds (plomb, cadmium)
Isotopes radioactifs ( $^{40}\text{K}$ , $^{137}\text{Cs}$ )
Polluants organiques (polychlorobiphényle = PCB)
Pesticides (insecticides, fongicides, herbicides)
Bactéries pathogènes
Organismes génétiquement modifiés
<b>Contaminants issus des pratiques apicoles</b>
Acaricides (synthétiques et naturels)
Antibiotiques (traitement des maladies du couvain)
Paradichlorobenzène (PDCB, répulsif pour le traitement de la cire)

---

Ces polluants peuvent atteindre les matières premières de produits d'abeille (le nectar, le miellat, le pollen, la plante entière et ses exsudats) que ce soit par l'air, l'eau ou le sol. Ils peuvent être aussi transportés dans la ruche par les abeilles qui sont en contact direct (Laudine 2010).

### III-3. Résidus de métaux lourds

Les métaux lourds issus de l'industrie et des transports polluent l'air, l'eau et le sol. Si les ruches se situent à proximité d'une zone polluée, le miel risque de contenir des résidus de ces métaux, notamment du plomb et du cadmium (Laudine, 2010). Les abeilles peuvent butiner sur une distance de plusieurs kilomètres de ruches et ils échantillonnent efficacement l'environnement pour les contaminants dans les plantes, le sol et l'atmosphère. Des grandes concentrations de métaux lourds ont été trouvées dans les produits apicoles des ruches situées dans des zones d'activité industrielle ou agricole élevé. Voilà pourquoi le miel et autres produits apicoles sont considérés comme bon matériel pour la surveillance de la contamination environnementale (Formicki et al., 2013).

A l'heure actuelle, aucune LMR n'a encore été fixée pour les métaux lourds, en Europe. Les résultats d'analyses montrent que le miel est relativement peu contaminé, contrairement aux abeilles. Là aussi, certains auteurs pensent que l'abeille filtre les métaux lourds de l'environnement et qu'elles peuvent, elles et leurs produits, servir de bio-indicateurs pour une contamination par des métaux lourds dans un rayon de 3 km autour de la ruche

(Bromenshenk J.J. *et al.* 1991 et Devillers J. et Pham-Delegue M.H. 2002). Il faut toutefois rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats car les métaux lourds peuvent également contaminer le miel au cours de son extraction ou de sa conservation (Laudine, 2010).

#### **Plomb**

Le plomb, issu des moteurs, pollue l'air et contamine directement le nectar et le miellat. D'après Bogdanov S. (2006), les valeurs retrouvées dans le miel sont comprises entre 0,001 et 1,4 mg/kg. Ces valeurs ont tendance à diminuer depuis l'utilisation de pots catalytiques et d'essence sans plomb. Le seuil de tolérance pour le plomb est de 100 µg/kg. On retrouve également du plomb dans des miels extraits avec du matériel ancien, qui ont été en contact avec une peinture à base de plomb.

#### **Cadmium**

Le cadmium provient des industries métallurgiques et des incinérateurs. Il est acheminé par le sol dans la plante et contamine lui aussi le nectar et le miellat. Si les ruches sont placées à proximité d'un incinérateur, elles peuvent également être contaminées par l'air ambiant. D'après Bogdanov S. (2006), les valeurs retrouvées dans le miel peuvent varier entre 0,001 et 0,113 mg/kg. Le seuil de tolérance pour le cadmium est fixé à 50µg/kg.

#### **Mercure, nickel**

D'autres métaux lourds tels que le mercure et le nickel ont été également étudiés. Le seuil de détection pour le mercure est de 0.0005 mg/kg (Devillers J. et Phamdelegue M.H. 2002) cité par Laudine 2010.

#### **Autres : cuivre, arsenic**

Dans une étude de 1989, Kronic M-D. a montré que lors d'une pollution de l'air par l'arsenic provenant d'une usine de traitement du cuivre, le miel n'a pas été contaminé, contrairement aux abeilles et au pollen (Laudine, 2010). Une autre étude par José M. Bastías *et al.* (2013), il rapporte que la pollution de miel par l'Arsenic provienne principalement de la nature (éruption volcanique) et les activités anthropiques (exploitation minière). Les concentrations de l'As total et As inorganique dans les échantillons de miel dans cette étude ne constituent pas un risque pour la santé humaine parce que ses niveaux sont inférieurs à la limite permmissible.

### **III-4. Résidus des antibiotiques**

Au-delà des pesticides, on retrouve des traces d'acaricides et d'antibiotiques, tous deux utilisés régulièrement pour traiter la ruche. Cependant, lorsque ces produits sont utilisés dans de bonnes conditions (éviter la période de miellée, quantité raisonnable, utilisation de

méthodes alternatives), les apiculteurs peuvent limiter l'impact de ces produits sur le miel. Au niveau mondial, l'oxytétracycline ou le chloramphénicol sont régulièrement utilisés pour traiter les maladies du couvain (les loques) causées par *Paenibacillus*. Des résidus ont été mesurés dans des miels indiens et turcs notamment (Al-Waili et al., 2012). Des apiculteurs utilisent rarement des produits vétérinaires de complément avec des antibiotiques (oxytétracycline) pour aider le développement de la ruche. De nombreux pays européens ont banni l'usage des antibiotiques, mais il n'existe pour autant pas de limites établies pour ces antibiotiques dans le miel. D'autant que dans les pays où l'utilisation est tolérée, on remarque que les tétracyclines sont particulièrement rémanentes. Après douze semaines entre le traitement et la récolte, on peut observer des taux non négligeables dans le miel (Thompson et al., 2005). On remarquera donc la complexité de cette question. L'usage des produits chimiques est aujourd'hui devenu courant et face aux maladies de la ruche ou de la culture, il semble inévitable de retrouver de tels produits dans le miel. Mais tout comme la contamination des abeilles, des solutions sont à envisager mais ne sont pas pour autant faciles à percevoir (Crousilles A., 2014).

D'après Bogdanov S. (2006), sept classes différentes sont actuellement détectées dans le miel : sulfonamides, aminoglycosides, tetracyclines, amphénicols, macrolides, -lactames et métabolites du nitrofurane. Cependant les principaux antibiotiques contaminants le miel à l'échelle mondiale sont : tétracyclines, streptomycines, sulfonamides et chloramphénicol.

L'utilisation d'antibiotiques dans l'apiculture est illégale dans certains pays de l'UE. Cependant, il n'y a pas de LMR fixées pour les antibiotiques dans le miel conformément à la réglementation de la Communauté européenne, ce qui signifie que les résidus de miel contenant des antibiotiques ne sont pas autorisés à être vendus alors que dans d'autres pays, comme la Suisse, Royaume-Uni, et la Belgique, ont établi des limites d'action (niveau d'antibiotiques dans le miel au-delà duquel l'échantillon est jugée non conforme) pour les antibiotiques dans le miel, qui se situe généralement entre 0,01 à 0,05 mg / kg pour chaque groupe d'antibiotiques (tableau 05) (Al-Waili et al., 2012).

Tableau 05: Seuils de tolérance de résidus d'antibiotiques dans le miel en Suisse (Bogdanov S. et Fluri P., 2001).

Matières actives	Seuil de tolérance (mg/kg)
Sulfonamides	0,05
Tétracyclines	0,02
Streptomycine	0,02

La présence d'antibiotiques est décelable par plusieurs méthodes ou appareillages ; Les méthodes les plus économiques, (Elisa et Charm Test) sont aussi les moins fiables. C'est la raison pour laquelle tout résultat positif obtenu ainsi est systématiquement validé ensuite par l'HPLC ou LC-MS/MS que personne ne conteste. Pour les antibiotiques " classiques ", (streptomycines, sulfonamides, tétracyclines), les seuils de détection sont passés en quelques années d'un seuil de 500 ppb à 10 ppb. Mais il est possible de descendre beaucoup plus bas si nécessaire (Piro R. et Mutinelli F., 2003). Pour le chloramphénicol, antibiotique prohibé en médecine vétérinaire tant en Europe qu'aux Etats-Unis, les enjeux sont différents puisqu'il s'agit d'une molécule classée à haut risque. En conséquence, même les analyses de routine offrent un seuil de détection beaucoup plus bas : 0,3 ppb (Ortelli D. et al., 2004). C'est sur la base de ces analyses qualifiées par la presse apicole de " non fiables " et " non validées " que l'Union Européenne a bloqué les importations de toutes les productions animales d'origine Chinoises y compris le miel.

#### II-5. Résidus de Pesticides

À coté des métaux lourds et de résidus d'antibiotiques, Le miel peut contenir d'autres contaminants : les pesticides issus de l'environnement agricole ou de la pratique apicole :

##### *Origine agricole*

Les insecticides organiques synthétiques, quant à eux, sont apparus entre les années 1930 et 1940. Le premier insecticide, herbicide et fongicide est le dichlorodiphényltrichloroethane (DDT) (Casida & Quistad, 1998). Aujourd'hui, il existe environ 700 pesticides pouvant agir sur 95 cibles biochimiques différentes appartenant aux insectes, aux plantes ou aux moisissures (Charpentier G., 2013).

### Origine apicole

Les apiculteurs effectuent des traitements vétérinaires sur leurs ruches afin de les aider à lutter contre les différents agents pathogènes. Ces traitements sont le plus souvent orientés vers la lutte contre le *Varroa* par (Charpentier G., 2013).

Les pesticides sont des substances permettant de lutter contre les ennemis des cultures (figure 16). Ils regroupent les fongicides, herbicides, insecticides et bactéricides. Il en existe de très nombreux sur le marché actuellement (EU Pesticides database, 2010). Ces pesticides présentent un intérêt évident pour l'agriculture. Cependant des résidus dans les aliments peuvent poser des problèmes de santé. Des efforts sont faits pour mettre en place une approche raisonnée des pratiques phytosanitaires. Les pesticides les plus fréquemment recherchés dans le miel sont les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates, Pour identifier les résidus de pesticides, deux techniques chromatographiques sont utilisées : la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire (Flamini C. 1986 et Dreyfuss M-F. *et al.* 1994). Les limites de sensibilité obtenues avec ces techniques s'échelonnent de 25 à 200 ppb. Ces concentrations sont très inférieures aux normes européennes et françaises en vigueur (Dreyfuss M-F. *et al.* 1994) cité par (Laudine 2010).

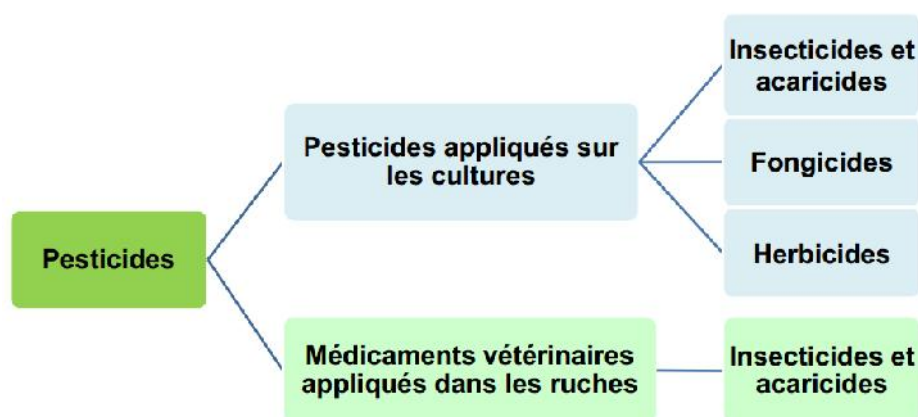


Figure 16: Différents groupes de pesticides (Martel A.C., 2014).

### Insecticides : organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides de synthèse

Les organochlorés (OC) sont des composés organiques de synthèse très stables. La plupart d'entre eux ne sont plus utilisés en agriculture, mais sont toujours présents dans l'environnement. Fernandez Muino M-A. a recherché une dizaine de ces molécules dans les miels. Il les a détectées par chromatographie en phase gazeuse avec détection de capture



d'électrons avec un seuil de détection de 0,56 à 2,78 µg/kg selon le pesticide recherché. Il conclut, au vu du grand nombre d'échantillons dans lesquels il a détecté des organochlorés, que l'objectif « zéro-résidu de pesticides » est utopique et propose de déterminer plutôt des limites admissibles maximum en fonction de la dose journalière admissible de pesticides et de la consommation de miel par la population (Fernandez Muino M-A. et al. 1995). D'après Bogdanov S. (2006), la plupart des pesticides retrouvés dans les miels sont des organochlorés. La plupart des valeurs obtenues sont inférieures à 0,5 mg/kg. Par rapport aux autres aliments, le miel ne participe que de manière minime à la dose journalière de pesticides ingérée. Comme nous le verrons par la suite, le fluvalinate est utilisé dans la ruche comme acaricide pour combattre *Varroa jacobsoni*. Il est également efficace dans le traitement des végétaux contre les acariens et les insectes. Il a l'avantage d'être applicable en vergers d'arbres fruitiers en pleine floraison car il n'est pas dangereux pour l'abeille dans la limite de doses raisonnables.

L'étude de Haouar publiée en 1990 dans la revue *Agronomie* permet de prouver l'inocuité sur le miel d'un tel traitement. Un mois après celui-ci, aucun des échantillons de miel prélevés ne dépassait le seuil de détection de 2 µg/kg (Haouar M. et al. 1990) cité par (Laudine 2010). La prévalence de *Varroa* dans le pays oblige les apiculteurs à utiliser des traitements réguliers capables d'endiguer la prolifération du parasite à côté de traitements occasionnelles contre les loques, la nosérose et l'acariose. Ces traitements sont effectués habituellement au redémarrage des colonies en hiver ainsi qu'à l'automne, avant la pause hivernale. Ces traitements sont effectués en dehors des miellées (Fléché C. et al., 1997). Les molécules employées sont généralement des acaricides de synthèse lipophiles et persistants comme l'amitrazé (Tactic®) (figure 17) ou le fluvalinate (Apistan®) ; ils causent une pollution importante de la cire, mais faible pour le miel. L'utilisation de produits naturels (les acaricides non toxiques : acides organiques et les composés des huiles essentiels, thymol...etc.) est une alternative récurrente. Par exemple, répandre de la fumée d'armoïse ou du thym séché grâce à l'enfumoir (Bogdanov, 2006; Crousilles A., 2014).

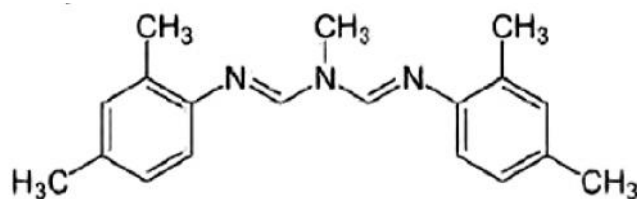


Figure 17: Structure chimique de l'Amitrazé (Charpentier G., 2013).



### Herbicides, bactéricides et fongicides

Les herbicides sont peu retrouvés dans le miel en général, mais en comparaison avec les autres pesticides, le miel contient plus de fongicides, notamment des fongicides systémiques. [Kubik M.](#) a analysé les résidus de fongicides : par chromatographie en phase gazeuse pour l'iprodione et la vinchlozoline et par chromatographie haute pression pour le thiophanate méthyl. La contamination du miel a généralement été faible (0,02 à 0,1 mg/kg). Il a noté un résultat pour le moins inattendu : l'augmentation de la teneur en vinchlozoline au cours du stockage du miel. [Kubik M.](#) explique cela par une liaison réversible du pesticide avec son substrat ([Kubik M. et al. 1999 et 2000](#)). La relativement faible contamination du miel par les pesticides semble être due à la filtration de ceux-ci par les abeilles (parfois d'un facteur 1000). La plupart des pesticides récents se désintègrent après usage et ne se retrouvent pas dans les miels. La limite fixée pour les pesticides (*tableau 06*), lorsqu'elle n'est pas fixée par une LMR est en général de 0,01 mg/kg, ce qui correspond à leur seuil de détection ([EU Pesticides database 2010](#)). Les pesticides présents dans les miels n'ont jusqu'à présent pas posé de problème sanitaire. Cependant, par mesure de précaution, il est recommandé aux apiculteurs de placer si possible leurs ruches à plus de trois kilomètres des zones rurales traitées avec des produits phytosanitaires ([Bogdanov S. 2006](#)) cité par ([Laudine, 2010](#)).

Depuis plusieurs années, les apiculteurs tirent la sonnette d'alarme quant à l'impact des pesticides sur leurs abeilles. Mais il est difficile de faire prendre conscience aux politiques et aux particuliers des dangers qui guettent nos abeilles, pollinisatrices des fleurs de nombreuses plantes donnant fruits et légumes. Les principaux insecticides mis en cause dans la disparition des abeilles sont: Gaucho® ou Imidaclopride, Régent TS® ou Fipronil, Cruiser® ou Thiamethoxam et Proteus® ([Eon N. \(2011\)](#)). Le mode d'administration bas volume crée un brouillard qui accroît l'accessibilité du produit à l'abeille. Aussi, les poussières de semis ou de moisson et la guttation (*figure 18*) peuvent également être sources de contamination issues de cultures non mellifères. C'est une problématique qui suscite beaucoup d'interrogations et d'inquiétudes. Où on observe une disparition de l'abeille mellifère domestique suite à l'intensité des traitements chimiques appliqués. D'ailleurs cette interrogation alimente un débat houleux quant à l'impact de l'Homme sur ce phénomène et plus globalement toutes les conséquences des activités humaines sur l'environnement ([Crousilles A., 2014](#)).



**Figure 18: Une abeille boit l'eau de guttation\***

*\*Ces gouttelettes constituent une source d'eau pour les abeilles. Or lorsque la plante (ou la semence) a été traitée, cette eau de guttation est contaminée par les pesticides utilisés.*

Diverses recherches de contaminants ont été réalisées sur des abeilles, du miel et du pollen en particulier dans les pays de Loire près de Nantes en 2011 et 2013. Les résultats montrent la présence de 37 pesticides, et surtout d'acaricides comme l'amitraz (figure 17) (Apivar - 68% des miels avec des doses parfois énormes, jusqu'à 116 ng/g) et le coumaphos (77%) dans tous les ruchers, un fongicide le carbendazime (64%, jusqu'à 88ng/g – interdit dans l'UE depuis 2009) et 6 insecticides (Wiest, L. et al., 2011, Lambert O. et al., 2013). Cela montre que la détoxification par les abeilles fonctionne mal. A noter que les néonicotinoïdes comme l'imidaclopride sont mal dosés avec la méthode utilisée par ces auteurs, elle n'est trouvée que dans 3% des miels alors que d'autres études le trouvent dans 22% et ce sont surtout les métabolites qui sont encore plus nocifs. La contamination semble venir souvent du pollen où l'on trouve des néonicotinoïdes et leurs dérivés parfois à forte concentration (170 ng/g d'acétamipride et thiaclopride) (Giroud B. et al., 2013).

**Tableau 06:** limites maximales de Résidus (MLR) théoriques dans les miels, calculables selon les règles de l'organisation mondiale de la santé (Fléché C. et al, 1997).

Produit	Dose Journalière admissible	LMR théoriques dans le miel (mg/kg)	Taux moyens trouvés dans les miels (mg/kg)
Alphaméthrine	-	-	0,005
Amitraze	0,003	0,18	0,213
Atrazine	0,0005	0,03	0
Bromophos	0,04	2,4	0,004
Bromopropylate	0,01	0,6	0
Chlorpyriphos-éthyl	0,001	0,06	0,008
Coumaphos	0,035	2,1	0,017
Cyfluthrine	0,2	12	0,048
Cyperméthrine	0,05	3	0,004
Deltaméthrine	0,01	0,6	0,029
Endosulfan	0,006	0,36	0,063
Fenvalérate	0,02	1,2	0
Fluvalinate	0,01	0,6	0,033
Lambdacyalothrine	0,02	1,2	0,028
Lindane	0,008	0,48	0,008
Parathion-éthyl	0,004	0,24	0,022
Perméthrine	0,003	0,18	0
Phosalone	0,0025	0,15	0
Simazine	0,001	0,06	0

### III-6. Les organismes génétiquement modifiés (OGM)

La question des organismes génétiquement modifiés (OGM) est particulièrement importante. En effet, de côté de l'Atlantique, la politique agricole promeut l'utilisation de telles semences afin de limiter l'usage de pesticides. Mais l'affaire de miels contaminés par du pollen provenant d'OGM a été soumise à une procédure judiciaire. Voici l'histoire d'un litige entre un apiculteur amateur et l'État de Bavière à propos de la contamination de son miel par du pollen de plantes transgéniques. La décision de justice indique qu'un miel contenant du pollen issu d'OGM ne peut être commercialisé sans autorisation préalable.

La Cour de justice de l'Union Européenne a indiqué que « des produits comme du miel et des compléments alimentaires contenant du pollen issu d'une variété de maïs génétiquement modifié constituent des denrées alimentaires contenant des ingrédients produits à partir d'OGM », et en ce sens, leur commercialisation est soumise à autorisation préalable. L'introduction de pollen dans le miel n'est pas forcément intentionnelle, mais la présence de pollen d'OGM, y compris en proportions infimes, oblige à une autorisation de commercialisation (Radisson, 2011 ; Crousilles A., 2014). En outre, Le Parlement européen définit le pollen, dont le pollen génétiquement modifié, comme "un composant naturel du miel" et non "un ingrédient". Rejoignant la position de la Commission européenne, il a revu ses conditions d'étiquetage. Les apiculteurs doivent donc étiqueter leur miel "avec OGM" (Organisme Génétiquement Modifié) si une présence de pollen transgénique supérieure à 0,9% dans la masse totale du miel est décelée. Cependant, il faut savoir que le miel contient environ 0,5% de pollen, il est donc difficile d'atteindre les 0,9% d'OGM dans un miel. Dans ce cas, très peu de miels auront l'étiquetage « avec OGM » (Bruneau E., 2013 ; Nicolaÿ J., 2014).

### III-7. Microorganismes

Le miel est une denrée présentant peu de risques microbiologiques. D'une part, la colonie d'abeilles et l'intérieur de la ruche ne sont généralement pas contaminés par des germes pathogènes pour l'homme. Les germes pathogènes pour l'abeille sont très spécifiques et ne peuvent en aucun cas être transmis à l'être humain. D'autre part, les abeilles sont d'excellentes nettoyeuses et, en conditions normales, réalisent une élimination permanente des germes et des parasites.

Dans ces conditions, la contamination du miel par des germes pathogènes ne survient que lors d'une mauvaise manipulation du produit. Il paraît évident de respecter les mesures d'hygiène lors de l'extraction ou du conditionnement. Cependant, lors du transport des hausses entre le rucher et la miellerie, ces conditions peuvent parfois faire défaut (Laudine, 2010; Miroslava Ka ániová et al., 2009).

Enfin, le miel est un aliment bactériostatique, du fait de sa concentration importante en sucre et par conséquent une pression osmotique élevée, aussi sa faible teneur en eau libre et en humidité, son pH faible et la présence de substance à activité antibactérienne. Ce qui ne permet pas la croissance microbiologique. Seules quelques bactéries comme des *Bacillus* sont parfois retrouvés dans le miel souvent sous forme de spores. Mais celles-ci ne sont pas pathogènes pour l'homme. Malgré tout, des spores de *Clostridium botulinum* ont été

retrouvées occasionnellement dans certains miels, mais jamais la toxine botulique. Cependant, elle peut être libérée après digestion des spores, et ce, essentiellement chez le nourrisson de moins d'un an. C'est pour cela que certains pays déconseillent la prise alimentaire du miel chez le nourrisson (Nicolay J., 2014). Un traitement des miels à usage thérapeutique par les rayons gamma permet d'éliminer les spores du bacille botulique sans altérer les propriétés thérapeutiques du miel (Molan et Allen, 1996) cité par (Hoyet C., 2005).

Les principales sources de contamination microbienne sont susceptibles d'inclure le pollen, le tube digestif des abeilles, la poussière, l'air, la terre, le nectar, la propreté de la miellerie et du matériel. Cependant les conditions de récolte sont considérées également comme des sources de contamination pour le miel. Ces facteurs peuvent être maîtrisés par des bonnes pratiques d'hygiène de l'apiculteur.

Comme tout produit d'origine animale, le miel possède une flore microbienne qui lui est propre et fait partie intégrante du produit et dépend aussi de ses propriétés physico-chimiques. deux origines différentes : une flore habituelle, mésophile et mycélienne et un microbisme occasionnel, résultat des manipulations nécessaires au conditionnement (Fléché C. et al., 1997).

- *La flore mésophile totale (bactéries se multipliant entre 30°C et 38°C) :* Elle est sans pouvoir pathogène pour l'homme et n'a pas d'action néfaste sur le miel. Par contre, elle peut être néfaste pour l'abeille et responsable de la loque américaine ou européenne. Elle est introduite par les abeilles et elle fait partie de l'environnement et se constitue presque exclusivement de *Bacillus*, souvent à l'état de spores ;
- *La flore mycélienne et les levures banales :* sont constituées de champignons filamenteux du genre *Aspergillus* sont rares et se trouvent à l'état dormant (spore) et en très faible quantité dans le miel où ils peuvent intervenir dans son altération. Puisque le miel étant un milieu pauvre en protides, leur activité métabolique n'est pas favorisée ;
- *Les levures osmophiles :* ce sont des organismes glucidophiles inféodés à la végétation et capables de se développer sur des milieux très concentrés en sucre, c'est à dire à pression osmotique élevée. Leur recherche est très importante car les levures du genre *Saccharomyces* sont des agents de la fermentation alcoolique qui altèrent les miels et modifient leur conservation. Ces levures proviennent des pollens et des pattes, langues et jabots des abeilles, contaminés au contact des nectaires floraux et éventuellement des fruits mûrs ; elles risquent de provoquer une fermentation; On peut tolérer un seuil

de levures allant jusqu'à 100 germes par gramme ; au-delà, le miel risque de se fermenter ; surtout si le taux d'humidité est important ;

- *Les germes témoins de contamination entérique* : pour ces germes, sont recherchés les *streptocoques* du groupe D de lancefield (ou *entérocoques*), les *coliformes* : *Escherichia coli*, les *salmonelles* dont l'absence est impérative. On peut également retrouver des germes anaérobies *sulfito-réducteurs* comme *Clostridium perfringens* (agent de la gangrène gazeuse) et *Clostridium botulinum* (agent du botulisme) ; leur absence est également impérative. Ces germes peuvent contaminer le miel, la gelée royale, le pollen au cours des manipulations nécessaires au conditionnement, effectuées dans de mauvaises conditions hygiéniques (Assie B., 2004 ; Snowdon Jill A. et al., 1996 ; Fléché C. et al., 1997).

### Réglementation

D'après Fléché C. et al., (1997), La législation portant sur l'analyse microbiologique des produits de la ruche est quasi inexistence. Le décret n°71-636 du 27 juillet 1971 préconise une recherche de germes mais accompagner cette recommandation de normes permettant de qualifier les miels. Cependant les travaux du CNEVA Sophia-Antipolis (*Centre national d'études vétérinaires et alimentaires*) ont permis de préciser une échelle de numération, d'une part des micro-organismes susceptibles d'altérer la conservation, comme les levures, d'autres part des germes témoins d'une hygiène douteuse des manipulations qui suivent la récolte, fixant ainsi des normes encore officieuses.

Pour les levures *osmophiles*, ces normes sont les suivantes :

- Moins de 100 levures *osmophiles* par gramme : bonne conservation du miel ;
- De 500 à 1000 levures par gramme : le miel commence à fermenter ;
- Au-dessus de 1000 levures par gramme : le miel ne peut plus être commercialisé.
- Quant à la flore occasionnelle, elle ne doit pas être tolérée pour un miel de qualité.

### III-8. La radioactivité

Selon Crousilles A. (2014), le cas de la radioactivité a été particulièrement investigué à l'occasion de l'accident nucléaire de Tchernobyl. En effet, le césium 137 est l'isotope le plus étudié pour ses retombées atmosphériques. À la suite de l'accident nucléaire, les mesures faites sur les miels des régions environnantes ont démontré une forte augmentation du <sup>137</sup>Cs pour atteindre 4430 Bq/kg. Les études des pays frontaliers n'atteignent pas les valeurs extrêmes obtenues en Ukraine (532 Bq/kg en Allemagne). Le potassium 40K, quant à lui, est un élément naturel présent chez les plantes. Et le miel, d'après quelques études, en contient

maximum à hauteur de 211 Bq/kg. Les limites observées se réfèrent au lait avec un maximum de 370 Bq/kg. Aussi, la radioactivité n'est pas un problème pour la santé publique (Bogdanov S. 2006).

### **III-9. Règlementation**

#### **III-9.1. Interdictions quant à la qualité d'un miel**

Le miel ne doit pas avoir de gout ou odeur suspects pouvant être apportés par des résidus étrangers, comme des moisissures, des insectes, des pesticides, des débris d'insectes, de couvain ou autres matières étrangères, au cours de l'extraction ou de la conservation. Il ne faut pas que le miel fermente ni que l'on chauffe le miel jusqu'à ce que les enzymes contenues dans le miel soient détruites ou inactivées. Aucun additif n'est autorisé (Alphadery, 1992). Le miel doit être pur. Rien ne doit être ajouté, pas de sucre, pas de colorant (Fournier, 2009).

#### **III-9.2. Etiquetage et conditionnement**

Il est interdit d'inscrire sur les étiquettes des pots de miel, le mot « pur », « naturel », « sain », « 100% » puisque le miel est par définition pur et sans additif (Fournier, 2009).

La dénomination de vente doit indiquer l'origine florale et végétale ainsi que géographique ; par exemple, miel d'acacia, miel de montagne, miel de printemps...la composition précise des miels polyfloraux doit être déclinée.

La date limite d'utilisation optimale est mentionnée par la formule « à consommer de préférence avant fin... ». Si les conditions de la conservation sont bonnes, on peut consommer le miel même après cette date.

L'étiquette doit aussi mentionner la quantité nette de miel ainsi le nom du fabricant, du conditionneur ou de vendeur et aussi le pays d'origine du miel où il a été récolté (Lefief-Delcourt, 2010).

On donne aussi le nom et l'adresse de l'apiculteur, la date de la récolte, la date de conditionnement et le numéro du lot de conditionnement. On trouve parfois sur les étiquettes la mention « miel obtenu par extraction à froid » ou miel obtenu par simple centrifugation mécanique » (Darrigol, 1979) cité par (Eon N., 2011).

Actuellement, les traitements chimiques semblent être la seule parade aux parasites du Varroa. L'efficacité n'étant pas de 100%, il est préférable de changer de produit, de principe actif, et non d'augmenter la dose ou la fréquence des traitements. Il est aussi très utile de faire de la prévention en évaluant le nombre de parasites qui a pu s'infiltrer dans la ruche avant

l'hivernage. Ce test est généralement effectué en avril, à la sortie de l'hiver. Le produit utilisé est l'amitraz, du nom de spécialité Tactic®, en gouttes, utilisé également contre les parasites du chien (Riondet, 2010) cité par (Eon N., 2011).

### III-10. Les bonnes pratiques apicoles

- ☞ • En zones de grandes cultures mellifères ou de vergers, il est vivement conseillé de dialoguer avec les propriétaires ou les locataires pour connaître les traitements effectués et prévus ou la présence de cultures OGM.
- ☞ • il faut placer les ruches hors de portée des pulvérisations et épandages (on tenir compte les dérives).
- ☞ • En cas de traitement des ressources mellifères,
  - l'idéal est de déplacer les colonies, si ce n'est pas possible, il faut les fermer temporairement pendant la période d'activité du produit pulvérisé.
- ☞ • En cas de production de pollen, il faut absolument éviter les zones régulièrement traitées ou les lieux à risque (pollutions par les hydrocarbures, métaux lourds...).
- En cas de culture OGM à proximité (rayon de 5 km), le pollen récolté risque fortement d'être classé comme étant OGM.
- ☞ • Pour éviter la présence de métaux lourds, il faut éviter de placer les ruches dans un environnement industriel pollué en métaux lourds (à proximité d'entreprises très polluantes ou à proximité de sites où se trouvaient des entreprises très polluantes).

Ces bonnes pratiques apicoles peuvent participer en quelque sorte à conserver l'image flatteuse de miel comme produit naturel et bon pour la santé humaine en se rend compte que sa contamination aujourd'hui est possible tant l'environnement a subi de profonds changements sous la pression de l'Homme. Le miel et les produits de la ruche, au même titre que l'abeille elle-même, peuvent jouer un rôle d'indicateur de la contamination environnementale (Chauzat et al., 2006; Bogdanov S., 2006).

Ce produit d'origine animale ne peut constituer un danger pour la santé humaine, qu'il s'agisse de pollution bactérienne ou de pollution chimique. Cependant, pour ce produit comme pour d'autres produits de la ruche (la gelée royale, le pollen et la propolis...), des analyses réalisées plus systématiquement sur des prélèvements issus de plans d'échantillonnage rigoureux devraient permettre d'avoir une meilleure connaissance de la fréquence des pollutions. En particulier, la mise en évidence de taux relativement élevés de



métaux lourds décelés dans des miels importés invite à intensifier les contrôles dans notre pays. Ces contrôles ne seront possible et efficaces que si des normes sont établies tant sur les taux admissibles que sur les techniques pour les mettre en évidence (Fléché C. et al., 1997).

Chapitre



Effets thérapeutiques  
de miel

## **IV-Effets thérapeutiques de miel**

En effet, contrairement aux aliments ordinaires, le miel est un aliment imputrescible, ce qui détermine en grande partie son statut symbolique d'aliment remède. Il posséderait des « vertus » considérées comme « magiques » dans de nombreuses civilisations. Autrefois, on utilisait le miel, certes dans l'alimentation, mais aussi dans de nombreux rites. Pour beaucoup, le miel pouvait prolonger la vie. De tout temps, le miel a été considéré comme un agent de prévention de nombreuses maladies. Il est utilisé depuis l'Antiquité en médecine traditionnelle, on le retrouve également en médecine moderne dans le milieu chirurgical où il rend de très nombreux services, Le miel est souvent considéré comme un « alicament », c'est-à-dire un aliment à qui on prête des vertus médicales. En effet, il est crédité de nombreuses propriétés thérapeutiques et pharmacologiques que nous tenterons de découvrir (Tetart G., 2004 ; Rossant A., 2011). Ces propriétés médicinales varient selon les nectars recueillis par les abeilles, puisque son activité a deux sources: animale (salive) et végétale (nectar) Toullec A.N.K. (2008).

### **IV-1.Propriétés biologiques**

#### **IV-1.1. Valeur alimentaire et diététique**

Le miel est un produit complexe, contenant un très grand nombre d'éléments intervenant directement sur l'harmonie de notre équilibre biologique. C'est un produit 100% naturel, d'origine essentiellement végétale, le miel est tout d'abord un véritable concentré d'énergie. Sa forte teneur (environ 70%) en sucres simples (fructose, glucose et saccharose) et parfaitement assimilables par l'organisme : il passe dans le sang très rapidement et la glycémie décroît ensuite lentement. Il est souvent utilisé par les sportifs pour sa valeur énergétique : 310k Cal / 100g. Il est cependant moins calorique que le sucre (environ 405k Cal / 100g), ce qui en fait un aliment apprécié des diététiciens (Gout, 2009). Il est donc conseillé, autant que possible, de remplacer dans l'alimentation le sucre par du miel car il a non seulement de bonnes propriétés nutritives, mais surtout de bonnes propriétés thérapeutiques.

#### **IV-1.2. Valeur thérapeutique**

##### **IV-1.2.1. Effet antibactérien**

Les premiers résultats issus de l'analyse des miels datent de 1892, puisque Van Ketel a alors été le pionnier de la redécouverte du miel et de ses propriétés antibactériennes. Puis il faudra attendre les années soixante-dix pour que la communauté scientifique s'intéresse plus encore à ce produit. Ce renouveau de la recherche sur ce produit suit l'actuelle mouvance à

propos des produits naturels. En effet, face à l'étude approfondie des pharmacopées traditionnelles et des produits naturels servant de médecine, le miel est devenu un sujet de recherche dédié à ces principes. D'ailleurs, le principal intérêt du miel aujourd'hui pour le domaine de la santé et son utilisation par les professionnels est le traitement des plaies (brûlures, chroniques et même chirurgicales) (Crousilles A., 2014).

D'une autre coté et avec l'augmentation de la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques, ajoute Rossant A. (2011), le miel est de plus en plus apprécié pour son activité antibactérienne qui est influencé par son origine florale (Hoyet C., 2005). La puissante activité *in vitro* du miel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les résultats prometteurs obtenus lors de l'application du miel sur des plaies, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs qui ont tenté de caractériser les pouvoirs bactéricide et bactériostatique du miel. *Staphylococcus aureus* est un microorganisme qui s'est révélé être l'une des bactéries les plus sensibles à l'action antibactérienne du miel. Ceci est d'importance médicale, puisque ce germe est devenue une cause majeure d'infections des plaies et de septicémies en milieu hospitalier (Theunissen et al., 2001).

L'efficacité du miel a été démontrée au travers de multiples études depuis longtemps *in vivo* (Aristote, 1910) et *in vitro* (Sackett, 1919), cependant les explications tardent à donner des réponses précises quant aux éléments qui en sont la cause. Plusieurs paramètres sont impliqués dans ce pouvoir bactéricide et sont avancés pour expliquer cette efficacité:

#### IV-1.2.1.1. L'osmolarité

Le miel est une solution sursaturée de sucres ; il agit de manière osmotique, en provoquant une forte déshydratation des germes qui n'ont plus alors suffisamment d'eau pour survivre; la teneur en eau de miel ne peut dépasser en générale 20% de la masse (Codex alimentarius, 2001). La forte interaction des molécules de sucres avec les molécules d'eau ne laisse que très peu de ces molécules d'eau disponibles pour les micro-organismes. Cette eau «libre» est ce qui est mesuré par l'activité de l'eau (aw), la valeur moyenne de l'activité hydrique du miel se situe entre 0,56 et 0,62 (Molan, 2006). Par ailleurs, une activité en eau inférieure à 0,85 correspond à la limite pour les bactéries pathogènes et toxinogènes les plus fréquentes sous forme végétative; aussi la stabilité microbiologique d'un aliment est atteinte pour aw inférieure à 0,7 (Collignan, 2011). Donc on observe que pour un miel non dilué, l'activité en eau est toujours inférieure aux limites, ce qui explique en partie son activité lors des essais de traitement de plaies cutanées. Mais les études *in vitro* effectuées avec des dilutions importantes du miel vont à l'inverse de cette idée relative à la forte osmolarité. On

observe en effet que le miel reste efficace à des dilutions élevées ce qui suggère que d'autres facteurs antimicrobiens entrent en jeu (Crousilles A., 2014).

**IV-1.2.1.2. Le pH acide**

Les miels sont des solutions acides, d'après Bogdanov (2009), le faible pH du miel pourrait être responsable de cette activité ; il varie entre 3,5 et 6. Ce pH semble être efficace pour ralentir ou éviter la croissance de nombreuses espèces de bactéries pathogènes. On peut donc dire que le pH acide du miel renforce l'activité antibactérienne de celui-ci (Assie B., 2004). Selon Molan (2009). Cette acidité est due principalement au couple gluconolactone/acide gluconique formé par l'action de l'enzyme glucose oxydase ajoutée au nectar par les abeilles lors de la fabrication du miel (figure 19).

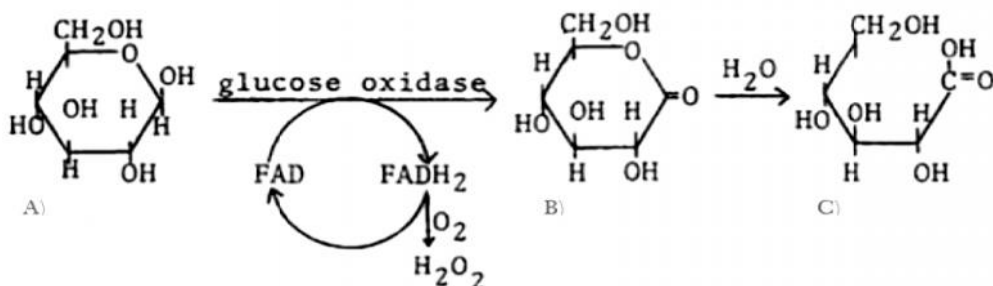


Figure 19 : Réaction de formation du gluconolactone (B) et de l'acide gluconique (C) à partir du glucose (A) Molan (2009).

Le pH semble être un facteur influent pour l'efficacité du miel. Mais bien que tous les miels aient un pH acide ; relativement faible, en-dessous de 4, ils ne sont pas pour autant tous efficaces au même degré. Il y aurait donc encore d'autres facteurs expliquant l'activité de ce produit.

**IV-1.2.1.3. Le système peroxyde d'hydrogène (inhibine)**

La principale « inhibine » que contient le miel est le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) encore appelé eau oxygénée. C'est un très bon antiseptique. Il est produit par réaction enzymatique (figure 20). C'est la gluco-oxydase sécrétée par les glandes hypopharyngiennes de l'abeille lors de la transformation du nectar en miel qui permet la réaction suivante :

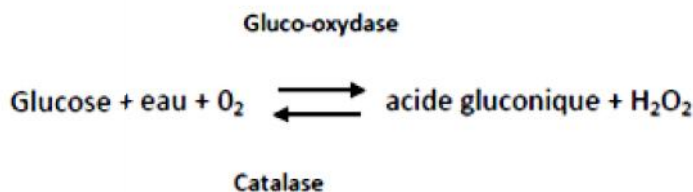


Figure 20: production de peroxyde d'hydrogène par réaction enzymatiques

La production d'eau oxygénée et d'acide gluconique résulte de l'oxydation de l'eau et du glucose. L'eau oxygénée produite a donc une origine végétale grâce au glucose provenant du nectar des plantes, mais sa formation implique une enzyme d'origine animale, la gluco-oxydase, qui est sécrétée par l'abeille. L'acide gluconique formé accroît l'acidité du miel et le rend peu favorable au développement de colonies bactériennes (Descottes B., 2009). La catalase représente l'antagoniste de la gluco-oxydase, et elle réduit l'eau oxygénée. La concentration en peroxyde d'hydrogène dépend donc directement de l'activité de ces deux enzymes. Certaines bactéries possèdent l'enzyme catalase, et elles peuvent donc décomposer le peroxyde d'hydrogène. De même, on peut la retrouver dans le plasma et son taux peut être augmenté dans les exsudats d'une plaie car elle est libérée par les leucocytes morts. Pour que la catalase soit active, il faut une forte concentration en peroxyde d'hydrogène, mais elle montre une activité faible pour des niveaux de peroxyde d'hydrogène physiologiques. Lors de l'application de miel, la libération de peroxyde d'hydrogène se fait de façon lente et prolongée. De ce fait, la catalase n'est que faiblement activée, et ne peut donc pas détruire l'activité antibactérienne du miel produite par le peroxyde d'hydrogène. Ce peroxyde d'hydrogène a donc un meilleur potentiel antibactérien quand il est libéré par le miel que lorsqu'il est utilisé seul dans une préparation antiseptique (Rossant A., 2011). De même le pouvoir antibactérien du miel ne semble pas affecté quand on le traite avec des catalases qui détruisent le peroxyde d'hydrogène. Il semble qu'il existe d'autres facteurs qui contribuent à faire du miel un produit antibactérien (Hoyet C., 2005).

#### **IV-1.2.1.4. Des facteurs phytochimiques**

Parmi les facteurs phytochimiques, on retrouve les huiles essentielles des nectars de fleurs dont le pouvoir antibactérien est déjà connu ; on peut citer par exemple, le thymol du thym, ou encore la pinocembrine qui est un flavonoïde identifié récemment dans une douzaine de miels. L'activité antimicrobienne de la pinocembrine est caractérisée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Elle a été récemment détectée dans le miel de tournesol ainsi que dans la propolis. De par son effet antiseptique, elle jouerait un rôle important dans le maintien de l'hygiène à l'intérieur de la ruche. D'autres composés ayant une activité antibactérienne ont été identifiés dans le miel mais ils sont cependant en quantité trop faible pour contribuer de manière significative à cette activité. On peut citer : l'alcool benzylique, l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoïque (acide syringique), le méthyl 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzoate (méthyl syringate), l'acide 3,4,5 triméthoxybenzoïque, l'acide 2-hydroxy-3-

phényl propionique, l'acide 2-hydroxybenzoïque, le 1,4-dihydroxybenzène et des terpènes (Crousilles A., 2014).

#### IV-1.2.1.5. La défensine-1

Il s'agit d'une protéine fabriquée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des abeilles. Elle est retrouvée dans le miel et la gelée royale. Chez l'homme, les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité spécifique, ou innée. Ces petits peptides peuvent être divisés en deux groupes : les -défensines, présentes au sein de certains granules sécrétoires dans les leucocytes ou des cellules immunitaires spécialisées, et les -défensines, présentes dans l'ensemble des épithéliums et au sein de nombreux organes. Elles jouent un rôle prépondérant dans les pathologies infectieuses, et elles modulent la réponse immunitaire.

Les défensines constituent une famille de peptides cationiques antimicrobiens. Ce sont de petits peptides, de masse moléculaire variant de 3,5 à 6 kDa, qui possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne (bactéries Gram positif et Gram négatif, champignons, virus enveloppés) (Jonard L. et al., 2006). En neutralisant de manière successive les facteurs bactéricides déjà connus du miel, les scientifiques ont conclu que la grande majorité des propriétés antibactériennes du miel proviennent de cette protéine (Kwakman et al., 2010) cité par (Crousilles A., 2014).

#### IV-1.2.1.6. Le méthylglyoxal (MGO)

Certains miels sont doués d'une activité qualifiée de "non peroxydasique", c'est-à-dire qu'ils conservent un fort pouvoir antibactérien même quand leur activité peroxydasique est neutralisée par la catalase ou par chauffage. C'est le cas notamment du miel de manuka, miel néo-zélandais et australien, issu de l'arbuste *Leptospermum scoparium* (famille des myrtacées) et connu sous le nom « d'arbre à thé » (Rigal M-L., 2012).

Des niveaux exceptionnellement élevés d'un composé antimicrobien, le méthylglyoxal (MGO), ont été trouvés dans le miel de Manuka (Adams et al., 2008). En général, le MGO est un aldéhyde réactif (pro-oxydant), qui possède une toxicité. Il est formé à partir de sucres lors d'un traitement thermique ou d'un stockage prolongé des aliments et boissons contenant des glucides. Cependant, les niveaux élevés de MGO dans le miel de Manuka sont issus par conversion de la dihydroxyacétone (DHA) présente à des concentrations exceptionnellement élevées dans le nectar des fleurs. Cette conversion est non-enzymatique et se fait lentement lors du stockage du miel. On ne sait pas comment la DHA est formée dans le nectar, ni pourquoi elle est présente en de telles quantités ; mais à l'issue de tests d'efficacité de ce miel

pour inhiber la croissance de *S. aureus*, il a été démontré une forte corrélation entre le MGO et l'activité antimicrobienne. Si bien que ce composé est avancé comme étant le seul élément explicatif de l'activité du miel de Manuka (Adams et al., 2008). Cependant, pour démontrer cette position, il suffit de chercher à neutraliser ce méthylglyoxal. Or la neutralisation du MGO diminue l'activité du miel de Manuka (Kwakman et al., 2011). On en conclut aujourd'hui que ce composé n'est pas exclusivement responsable de l'activité antimicrobienne de ce miel néo-zélandais. (Crousilles A., 2014).

#### IV-1.2.1.7. Les composés phénoliques et les flavonoïdes

Les composés phénoliques et les flavonoïdes présents dans le miel d'origine du nectar des plantes sont également des candidats probables et ils ont été proposés comme des facteurs importants pour l'activité antibactérienne non peroxyde du miel. Plusieurs composés phénoliques antibactériens ont été identifiés dans les miels, mais leur contribution à l'activité globale du miel reste incertaine (Bogdanov S., 2009 ; Kwakman et al., 2012).

#### IV-1.2.2. Effet antifongique

Il a été démontré que le miel est capable d'éliminer certaines toxines, notamment d'origine fongique. Une solution de miel comparée à une solution isotonique de saccharose inhibe complètement la croissance des moisissures comme *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatis*, *l'Aspergillus niger*, *l'Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Penicillium spp* et *Penicillium chrysogenum* (Rossant A., 2011).

Une autre publication scientifique (Obaseiki- Ebor et Afonya, 1984) rapporte que le miel a une efficacité comparable aux antifongiques classiques sur des candidoses vaginales provoquées par *Candida albicans*. Il faut souligner que pour traiter des mycoses, les concentrations en miel sont plus élevées que pour obtenir un effet antibactérien (Hoyet C., 2005).

#### IV-1.2.3. Effet antiviral

Les Herpès Simplex Virus (HSV) provoquent des lésions très douloureuses soit au niveau labial, soit au niveau génital. Ces virus se "réveillent" plus ou moins fréquemment consécutivement à un traumatisme, à une exposition au soleil, à un stress ou encore pendant les menstruations. La principale molécule à usage topique utilisé pour traiter ces poussées herpétiques est l'aciclovir. AI-Waili (2004) a réalisé un essai clinique avec des patients souffrant de poussées récurrentes d'herpès labiaux et génitaux. Le miel (origine multi florale) diminue de 35% la durée de l'attaque pour l'herpès labial. Avec le miel, les douleurs de l'herpès labial sont calmées plus vite, les croûtes se forment plus rapidement et la guérison est



constatée plus tôt qu'avec l'aciclovir. Il en est de même pour les herpès génitaux. De plus, dans deux cas pour l'herpès touchant la lèvre, et dans un cas pour l'herpès touchant la sphère génitale, le miel a endigué les poussées. L'aciclovir n'a endigué aucune poussée au cours de cet essai. L'effet anti-viral du miel n'est à ce jour pas expliqué. Cependant, certains composants présents dans le miel sont connus pour leurs effets anti-viraux sur l'HSV comme les flavonoïdes (Amoros *et al.*, 1992), le cuivre (Sagripanli *et al.*, 1997). Le monoxyde d'azote (NO) jouerait aussi un rôle anti-viral (Torre, 2002); or on retrouve le NO dans de nombreux miels (AI-Waili, 2003) cité par (Hoyet C., 2005).

#### IV-1.2.4. Effet antioxydant

Le terme «stress oxydatif», décrit le déséquilibre dans l'organisme entre la production de radicaux libres et l'activité antioxydante de protection. La protection contre l'oxydation est impliquée dans la prévention de certaines maladies chroniques. La modification oxydative des lipoprotéines est considérée comme un facteur important dans la pathogenèse de l'artériosclérose.

Il a été démontré que le miel contient une significative activité antioxydante incluant, la glucose oxydase, la catalase, l'acide ascorbique, les acides phénoliques, les dérivés de caroténoïdes, les acides organiques, des protéines et les flavonoïdes pigments présents dans les végétaux et qui constituent une protection contre les rayons ultra violets et la photo-oxydation et jouent un rôle de protection vis-à-vis des radicaux libres (Hoyet C., 2005). En réalité, il y a une corrélation significative entre l'activité antioxydante, la teneur en composés phénoliques du miel et l'inhibition de l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines du sérum humain (Bogdanov, 2009). L'action des antioxydants consiste à neutraliser les radicaux libres, molécules hautement réactives causant des dommages importants aux protéines, à l'ADN cellulaire et aux membranes cellulaires (Tomczak, 2010).

D'après Rigal M.L. (2012), certaines vitamines et oligoéléments sont également impliqués dans l'activité antioxydante du miel. La vitamine C est piègeur de radicaux libres. Elle se transforme en radical ascorbyle au contact des radicaux libres, stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne. En application topique, elle diminue considérablement les dommages causés par les rayons UV. Les oligoéléments tels que le sélénium (Se) et le zinc (Zn) jouent eux aussi un rôle important dans l'équilibre proxydant-antioxydant. Ils ont un fort pouvoir anti-radicalaire et interviennent au niveau du fonctionnement des enzymes qui préviennent le photovieillissement.

#### IV-1.2.5. Effet anti-inflammatoire

Lorsqu'une agression infectieuse (bactérie, virus, levures...), chimiques (antigènes, allergènes, ...), ou physique (traumatismes, corps étrangers, radiations...) se produit dans notre organisme, aussitôt une réaction de défense se met en place: c'est l'inflammation (Hoyet C., 2005). L'effet anti-inflammatoire du miel a été étudié par plusieurs chercheurs. L'ingestion du miel a un effet positif sur des maladies inflammatoires de l'intestin, provoquées expérimentalement chez les rats. Le mécanisme d'action supposé serait basé sur l'hypothèse de l'inhibition de la formation des radicaux libres libérés des tissus enflammés. Ainsi, la réduction de l'inflammation peut être due à l'effet antibactérien du miel ou à un effet anti-inflammatoire direct. Selon certain auteur cet effet anti-inflammatoire du miel pourrait être partiellement expliqué par la présence de flavonoïdes originaires du nectar et du pollen.

Cette activité anti-inflammatoire de miel est très intéressante dans le domaine de la cicatrisation des plaies en plus de l'activité antibiotique puisqu'il diminue le taux plasmatique des molécules pro-inflammatoires IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2 et NO. L'expression d'IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS et COX-2 est aussi diminuée (Jean N., 2014).

#### IV-1.2.6. Effet Anticancéreux

Le risque de cancers est accru dans une population qui présente un déficit en vitamines, en oligo-éléments et en certains nutriments indispensables au métabolisme cellulaire et à la production d'enzymes et d'hormones. Ces nutriments qui ont une action inhibitrice sur le processus cancérigène se trouvent pour la plupart dans le miel. On peut notamment citer les flavonoïdes, qui ont la capacité de ralentir le processus d'évolution des tumeurs (Rossant A., 2011). Le miel est riche en antioxydants et de ce fait joue un rôle intéressant dans la prévention du vieillissement cellulaire et des cancers (Hoyet C., 2005).

Peu d'études (Swellam et al., 2003; Orsolich et Basic, 2004 ; Orsolich et al, 2005) ont étudié les propriétés anticancéreuses du miel au cours de ces dernières années, avec des résultats intéressants. Une étude antérieure de Swellam et al., (2003), le miel (1-25%) a significativement inhibé la croissance de lignées cellulaires du cancer de la vessie lors d'un tests *in vitro*. En outre, des injections intra-lésionnelles du miel (6 et 12%) ont significativement réduit la croissance des tumeurs résultantes de cellules cancéreuses ayant été implantées dans l'abdomen de souris (Chepulis, 2008). Les composés du miel limitent la prolifération des cellules cancéreuses mais également, leur propagation par voie sanguine ou lymphatique. Egalement il a été prouvé que le miel lutte efficacement contre le cancer de la vessie (ANSO, 2012).

#### IV-1.2.7. Effets sur l'immunité

Le système immunitaire joue un rôle capital dans la défense naturelle, mais son activation excessive ou inappropriée peut avoir des conséquences néfastes pour l'hôte. La modulation du système immunitaire « immunomodulation », s'applique à diminuer les réponses excessives ou à l'inverse, à renforcer les réponses insuffisantes de ce système (Labro M.T., 2006). Le miel qui compte parmi les anciens aliments de l'humanité, est l'un des rares produits naturels qui peuvent interférer avec le système immunitaire, par ses agents immunodépresseurs. Il est employé beaucoup plus pour des buts thérapeutiques qu'alimentaires en raison de ses propriétés. Cela lui permet d'être un produit noble et précieux. Il a été démontré pour avoir un effet sur divers aspects de l'immunité :

##### IV-1.2.7.1. Effet immunostimulant

Des preuves anecdotiques suggèrent que le miel peut stimuler la fonction immunitaire. Des études *in vitro* sur le miel (à des concentrations de 0,1 ou 0,2%) ont démontré sa capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes B et T (Abuharfeil et al, 1999) et de stimuler la production d'anticorps au cours des réponses immunitaires primaire et secondaire (Al-waili et Haq, 2004). Les facteurs propres au miel responsables de ces effets sont actuellement inconnus, mais il a été démontré que les mêmes réponses ne sont pas obtenus avec des solutions de glucose diluées (Tonks et al., 2003) ; de tels travaux ont éloigné les pistes suggérant une nature lipopolysaccharidique du composé actif, tout comme ces études affirment que ni des acides aminés, ni des vitamines ou des minéraux ne sont impliqués dans l'activité en question, de ce fait des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser la nature moléculaire du composé actif.

Il est possible que le miel puisse stimuler le système immunitaire grâce à la présence de sucres fermentescibles dans l'intestin. Par ailleurs, d'autres composés, autre que les sucres, peuvent être responsables de ces effets immuno-modulateurs (Tonks et al., 2007).

Il est également possible que le contenu antioxydant du miel peut contribuer à ses effets immuno-modulateurs. Bien qu'il n'existe pas d'études recherchant directement les effets des antioxydants intrinsèques du miel sur la fonction immunitaire, d'autres composés antioxydants ont été montré capables de stimuler la fonction immunitaire *in vitro* (Sabongi et al., 1997) et *in vivo* (De La Fuente et al., 2005). En outre, le miel est capable de fournir un approvisionnement de glucose aux cellules macrophages, permettant la production du peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée qu'est la principale substance utilisée par ces cellules pour détruire l'activité bactérienne) (Ryan et Majno 1977). Les effets immuno-activateurs

corroborent la conviction commune que le miel améliore la réaction humaine aux infections virales (Bogdanov S., 2009).

#### IV-1.2.7.2. Effet immunosuppresseur

Plusieurs expérimentations animales mettent en évidence une activité immunosuppressive du miel. Dans une étude sur des leucocytes isolés, le miel a inhibé l'activité enzymatique de la myéloperoxydase phagocytaire. Ces résultats sont en concordance avec la certitude commune que l'ingestion de miel peut soulager l'hypersensibilité au pollen. Cette même immunosuppression jouerait également un rôle positif dans les maladies auto-immunes (Bogdanov S., 2009).

#### IV-1.2.8. Effet prébiotique

Les prébiotiques sont des composants alimentaires naturels indigestes censés améliorer la santé en influençant favorablement, par une stimulation sélective de certaines bactéries probiotiques (Braegger C. et Zurich, 2004). Plusieurs publications ont rapporté que la croissance de bactéries lactiques (*probiotiques*) et leur survie dans le lait et dans le tractus gastro-intestinal étaient stimulées par la présence du miel d'abeille. Cet aliment contient une gamme d'oligosaccharides variés dans leur degré de polymérisation; cette composition unique du miel suggère qu'il peut être un milieu favorable à la croissance, l'activité et la viabilité de *bifidobactérie* dans le lait ainsi les produits laitiers fermentés (Slacanac V. et al., 2012). C'est une autre qualité s'ajoute à ce qu'il est cité précédemment : c'est un reconstituant de la flore intestinale, il « favorise le développement en grande quantité des germes non pathogènes, notamment *Bacillus Bifidus* que l'on retrouve également dans les matières fécales des enfants nourris au lait maternel » Tetart G. (2004). Ces bactéries lactiques préviennent la contamination de produits alimentaires par des bactéries pathogènes en inhibant leur prolifération, essentiellement par la production d'acide lactique et de peptides antimicrobiens nommés bactériocines (Makhloufi K.M., 2011).

#### IV-1.2.9. Effet antidiabétique

Le miel présente très peu d'effets indésirables. Il peut être employé chez tous les patients quelque soit leur âge. Il y a des précautions à prendre pour les sujets diabétiques chez lesquels la surveillance glycémique devra être renforcée. Cette mesure de précaution est aussi valable en cas d'usage externe sur des plaies étendues (Hoyet C., 2005). Cependant, le miel agit à plusieurs niveaux de la régularisation de la glycémie. Il participe à la modulation de l'expression de l'insuline en influençant plusieurs facteurs de sa régularisation. Le miel augmente l'expression de l'enzyme Akt qui est impliquée dans la signalisation de l'insuline.

Dans la littérature, la quercétine est à l'origine de cette activité. Le miel diminue la sérine phosphorylation du récepteur IRS-1 (Insulin Receptor Substrate = récepteur à l'insuline). Il diminue aussi l'expression de MAPK et NF-kB qui participe, comme la phosphorylation d'IRS-1, à la résistance de l'insuline (Jean N., 2014).

#### **IV-1.2.10. Effet cicatrisant**

Le miel est connu comme un très bon cicatrisant, dont l'origine de cette propriété vient ses activités anti-inflammatoire et antibiotique. Il permet également une angiogenèse à l'abord de la plaie, la migration cellulaire ainsi que l'apport en nutriment sont favorisés. Il permet l'activation du système immunitaire, ce qui entraîne une meilleure détersion de la plaie. Il participe aussi à l'augmentation de la production de collagène. D'un point de vue moléculaire, il favorise l'activation des macrophages et des kératinocytes par le MRJP-1. L'apigénine et le kaempférol sont responsables de l'inhibition du MMP-9 (Metalloproteinase matricielle 9) qui active la collagénase et la gélatinase. On remarque bien que le miel utilise plusieurs mécanismes pour permettre la cicatrisation (Jean N., 2014). Il est capable de soigner des brûlures aussi bien voire mieux que les traitements conventionnels. Les résultats de différentes études montrent que les pansements au miel soignent plus rapidement les brûlures, les désinfectent, diminuent la douleur et l'inflammation, et enfin, favorisent la formation du tissu de granulation et ainsi la cicatrisation. De plus, lorsque l'épiderme est brûlée, la peau perd sa barrière défensive naturelle; du fait de sa texture visqueuse, le miel recrée cette barrière et empêche ainsi toute surinfection. Le miel est un traitement adapté au soin des brûlures légères à modérées (Hoyet C., 2005).

#### **IV-2. Allergies, intolérances**

Le miel a l'avantage de ne provoquer aucun effet indésirable grave. Les allergies et les intolérances sont extrêmement rares (Kiistala *et al.*, 1995); elles sont pour la plupart expliquée par des allergies aux grains de pollen présents dans les miels. Alors, il sera déconseillé à tous les patients présentant des allergies aux hyménoptères d'utiliser le miel comme thérapeutique. Quelques sensations de brûlures, de picotements sont décrites (Molan, 1998; Emarah, 1982) notamment au moment de l'application du miel. Ces sensations désagréables ne persistent pas et ne conduisent qu'exceptionnellement à l'arrêt du traitement (Hoyet C., 2005).

Pour finir ce chapitre, il est important de noter que les propriétés du miel sont le résultat d'une grande cohésion entre les différentes substances qui les composent. Il existe une véritable synergie d'action entre les différents composants, c'est-à-dire que l'activité thérapeutique des constituants actifs, lorsqu'ils sont associés, est supérieure à la somme des

activités thérapeutiques des constituants pris individuellement. En cela, il est impossible d'entreprendre une synthèse artificielle des produits naturels comme le miel (Rigal M.L., 2012). Le miel a toujours été utilisé comme remède à de nombreux maux. Quelques usages empiriques ont traversé le temps comme le fait de prendre une cuillère de miel lorsque la gorge se fait douloureuse, mais les autres sont tombés dans l'oubli. Partant de constatations cliniques impressionnantes, des chercheurs de toutes les parties du globe travaillent afin de démontrer scientifiquement les atouts du miel. C'est un aliment à redécouvrir, car si l'on ignore encore beaucoup de ses propriétés on en sait suffisamment pour comprendre qu'il est bénéfique à la santé (Hoyet C., 2005).

# Partie Expérimentale



# Matériel et Méthodes





## **Matériel et méthodes**

### **1. Matériel biologique**

Neuf variétés de miel locales d'origine botanique connue ont été collectées chez différents apiculteurs de l'ouest algérien (*figure 21, figure 22 et tableau 07*). La collecte des échantillons de miel a été effectuée au cours de l'été de l'année 2014. Les variétés collectées sont conservées au laboratoire à la température de 4°C pour éviter une éventuelle altération. Les différentes variétés serviront en premier temps pour toutes les analyses physico-chimiques et polliniques, la recherche de certains contaminants comme les résidus d'antibiotiques et des métaux lourds avec l'étude de quelques effets thérapeutiques en seconde partie; effet antioxydant (*in vitro*), immunomodulateur (*in vivo*) et effet antibactérien (*in vitro*). Ce travail de recherche a été effectué au niveau des laboratoires (de biotoxicologie, d'immunologie et de technologie Alimentaire) de département de biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université de Sidi Bel Abbés, des laboratoires d'agro-alimentaire et de microbiologie du centre de recherche scientifique et technique en analyses physicochimiques (CRAPC) à Tipaza et au niveau de laboratoire d'analyses pharmaceutique de l'université de sciences et technologie à Irbid en Jordanie.

### **2. Les objectifs**

Les objectifs spécifiques de la présente étude sont les suivants :

- Caractérisation des miels choisis par différentes analyses physicochimiques et polliniques;
- La recherche d'une éventuelle contamination de ces miels par certains résidus des antibiotiques (le Chloramphénicol) et de métaux lourds (plomb et cadmium);
- L'étude *in vitro* et *in vivo* de quelques propriétés thérapeutiques (immunomodulatrice, antioxydante et antibactérienne).

Pour répondre à ces objectifs, le travail expérimental se divise en quatre parties principales. La première partie est destinée à l'étude physicochimique des miels récoltés. La deuxième partie repose sur la méllissopalynologie (ou l'analyse pollinique) qui permet de déterminer l'origine botanique des miels analysés. La recherche de certains contaminants dans ces miels se trouve dans la troisième partie du travail expérimental. À la fin, la quatrième et la dernière partie est sacrifiée pour l'étude *in vitro* et *in vivo* de quelques effets thérapeutiques de miel.

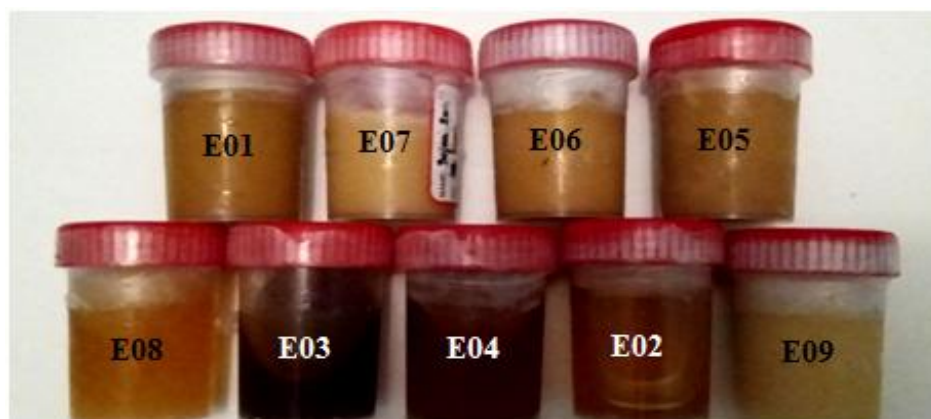
### 3. Echantillonnage

La figure 22 représente les différents sites d'échantillonnage de miel de la région de l'ouest Algérien (Tiaret, Sidi Bel Abbés, Bayadth, Tlemcen, Tissemsilt et Rélizane). Pour chaque échantillon de miel, un numéro est attribué et désigne:

- L'origine géographique du miel ;
- L'origine florale présumée ;
- La période de la récolte ;
- Le mode d'extraction.

**Table 07: Informations sur les échantillons de miel récoltés**

N° d'échantillon	Code	Origine florale présumée	Mode d'extraction	Origine géographique	Période de récolte
01	E01	Miel multifloral	Manuel	Tiaret ( <i>Azioua</i> )	2014
02	E02	Miel multifloral	Manuel	Tiaret ( <i>Tidda</i> )	2014
03	E03	Miel de Foret	Manuel	Tiaret ( <i>Sidi Ali Mellal</i> )	2014
04	E04	Miel multifloral	Manuel	Rélizane ( <i>Had El-Chekala</i> )	2014
05	E05	Miel de Pins	Manuel	Sidi Bel Abbés ( <i>Ras El-ma</i> )	2014
06	E06	Miel multifloral	Manuel	Tlemcen	2014
07	E07	Miel de Jujubier	Manuel	Bayadth	2014
08	E08	Miel de Foret	Manuel	Tissemsilt	2014
09	E09	Miel multifloral	Manuel	Tiaret ( <i>Ain Gassma</i> )	2014



**Figure 21: Présentation des échantillons du miel étudié.**



Figure 22: Localisation des échantillons de miel (Google Earth, 2016)

#### 4. Analyses au laboratoire

##### 4-1. Etude physicochimiques du miel

##### 4-1.1. La conductibilité électrique

Selon la [Commission internationale du miel \(2009\)](#), la détermination de la conductivité électrique est basée sur la mesure de la résistance électrique, dont la conductivité électrique est réciproque et elle est mesurée en utilisant une cellule de conductivité électrique pour une solution de miel à 20% ; p/v de matière sèche.

Si la constante de la cellule n'est pas connue, on prépare une solution de chlorure de potassium 0,1 M en dissolvant 7,4557 g de KCl, séché à 130°C, dans 1000 ml d'eau distillée. Après refroidissement, verser 40 ml de la solution dans un bécher et immerger la cellule du conductimètre dans cette solution puis lire la conductance (*en milli Siemens*) à la température 20°C.

La constante de la cellule est calculée par la formule suivante :

$$K = 11,961 \times 1/g$$

Où :

**K** : constante de la cellule en  $\text{cm}^{-1}$  ;

**g** : la conductance en mS, mesurée avec la solution de KCl ;

**11,961** : la valeur moyenne de la conductivité électrique de l'eau distillée en  $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  et la conductivité de la solution de chlorure de potassium 0,1 M à 20°C.

Dans une fiole de 100 ml, dissoudre 20,0 g du miel dans l'eau distillée puis compléter jusqu'au trait de jauge. Ensuite, transférer cette solution dans un bécher et chauffer à 20°C à l'aide de plaque chauffante.

Après l'avoir rincée avec l'eau distillée, plonger la cellule du conductimètre dans la solution et prendre la lecture lorsque la température arrive à 20°C.

En fin la conductivité du miel est calculée d'après la formule suivante :

$$CE = K \times G$$

D'où :

**CE** : conductivité électrique du miel exprimée en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  ;

**K** : constante de la cellule ;

**G** : conductance de l'échantillon.

#### 4-1.2. La densité

La densité, d'après [Bogdanov S. et al. \(1995\)](#), est le rapport du poids du pycnomètre (10 ml) rempli du miel sur le poids de même pycnomètre rempli d'eau distillée.

Elle est déterminée par la méthode [AFNOR \(1984\)](#) de la manière suivante :

$$d = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0}$$

**P<sub>0</sub>** : étant la masse du pycnomètre vide;

**P<sub>1</sub>** : étant la masse du pycnomètre rempli d'eau distillée;

**P<sub>2</sub>** : étant la masse du pycnomètre rempli de miel;

**d** : la densité.

#### 4-1.3. Le pH

Le pH est mesuré sur une solution de miel à 10% (p/v), c'est la mesure du potentiel hydrogène de cette solution à l'aide d'un pH mètre qui est étalonné avant son utilisation à l'aide des solutions tampons (de 7 et 4 par exemple).

La détermination du pH a été effectuée selon la norme du Codex n° 77-79, ([Codex, 1977](#)) : 2,5 g de miel sont pesés, dissous dans quelques ml d'eau distillée et la solution est complétée à 25 ml dans une fiole jaugée, puis versée dans un bécher sans cesser d'agiter la solution au moyen d'un agitateur magnétique, la pointe de l'électrode est plongée dans le bécher contenant la solution de miel, la valeur du pH s'affiche au potentiomètre.

#### 4-1.4. Teneur en eau

La teneur en eau est une valeur déterminée à partir de l'indice de réfraction du miel en se référant à une table standard qui dérive d'une formule développée par Wedmore des données de [Chataway H.D. et al., 1933 \(Annexe\)](#).

Pour les échantillons de miel qui sont visqueux, il est recommandé de les placer à l'étuve pour les liquéfier et les homogénéiser avant de procéder à leur analyse.

La détermination se fait tout en gardant la température du réfractomètre à 20°C grâce à un circuit d'eau qui lie l'appareil au bain marie ainsi en s'assurant que le prisme du réfractomètre est propre et sec. Directement après homogénéisation, couvrir la surface du prisme par l'échantillon. Après deux minutes, lire l'indice de réfraction puis déterminer le contenu d'humidité correspondant à partir de la table ([Commission internationale du miel, 2002](#)).

#### 4-1.5. L'acidité

Pour mesurer l'acidité, nous avons utilisé la méthode décrite par [A.O.A.C \(1976\)](#), qui consiste à dissoudre 10g de miel dans 75 ml d'eau distillée désaérée dans un bécher de 250 ml. Mélanger ensuite à l'aide d'un agitateur magnétique et, après étalonnage du pH mètre, plonger l'électrode dans la solution, noter la valeur du pH initial et commencer par la suite le titrage par une solution de NaOH (0,05N) à une vitesse de 5 ml/min jusqu'à un pH de 8,5.

Ajouter immédiatement à l'aide d'une pipette, 10 ml de NaOH (0,05N) et faire un dosage en retour par une solution d'HCl (0,05N) jusqu'à un pH de 8,3.

Il faut ainsi faire un essai à blanc (sans miel) dans les mêmes conditions cependant sans le dosage en retour.

Les résultats seront exprimés par les formules suivantes :

$$\text{Acidité libre} = \frac{(\text{Chute de burette NaOH} - \text{volume versé de NaOH pour le blanc}) \times 50}{\text{Prise d'essai (g)}}$$

L'acidité combinée due aux lactones est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Acidité combinée} = \frac{(\text{10 ml NaOH versé pour le dosage de retour} - \text{volume versé d'HCl})}{\text{Prise d'essai (g)}}$$

L'acidité totale est une somme des deux acidités ; libre et combinée.

$$\text{Acidité totale} = \text{Acidité libre} + \text{Acidité combinée}$$

#### 4-1.6. La teneur en HMF

Pour déterminer le taux d'HMF (5-(hydroxyméthyl-) furan-2-carbaldehyde), on suit la méthode décrite par [la commission internationale du miel \(2002\)](#), l'analyse est effectuée en triple en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec un détecteur UV 285 nm; Gamme: 0.2 AUFS avec une colonne C18 phase-reversée matériel; Exemple. Hypersil ODS 5µm, 125X 4 mm ou 250X 4mm. Le volume d'injection de l'échantillon ou de la solution standard est de 20 µl avec un débit de 1.0 ml/min.

##### *Préparation de l'étalon*

Une solution stock en mg/l de 5-(hydroxy-méthyl) furfural (Fluka No.55690) est utilisée pour préparer une gamme de dilutions (1, 2, 5 et 10 mg/l). Les solutions doivent être préparées dans le jour d'analyse.

##### *Préparation de l'échantillon et la phase mobile*

1 g a peut prés de l'échantillon de miel est pesé dans un bécher de 50 ml. L'échantillon est dissout approximativement dans 25 ml d'eau distillée et transféré quantitativement vers une fiole jugée de 100 ml en utilisant un vortex pour bien homogénéiser la solution. Ensuite le volume est ajusté à 100 ml par l'ajout de 75 ml de méthanol. On centrifuge à 3000 rpm/10min et enfin on filtre l'échantillon à 0,45µm en utilisant une seringue-filtre afin de rendre l'échantillon prêt à la chromatographie. La phase mobile est préparée par addition de 900 ml d'eau distillée à 100 ml de méthanol. Avant utilisation, la phase mobile préparée doit être filtré et dégazée dans un bain à ultrason pendant 5 minutes.

#### 4-1.7. Teneur en cendres

D'après [la commission internationale du miel \(2002\)](#), la teneur en cendre du miel signifie le résidu qui est obtenu par un procédé d'incinération à une température n'excédant pas 600°C, elle est mesurée comme suit :

Peser de 5 à 10 g de miel dans un creuset de porcelaine calciné, taré et pesé vide. Chauffer le prudemment jusqu'à ce que l'échantillon devienne noir et sec et qu'il n'y ait plus de risque de perte. Ensuite, calciner le dans un four à moufle à 600°C pendant 1h30.

Laisser refroidir dans un dessiccateur puis peser le creuset. Répéter le procédé jusqu'à obtention d'un poids constant.



Exprimer les résultats en pourcent de la substance sèche, calculés par la formule suivante:

$$M_m (\%) = \frac{(M_2 - M_1)}{M_0} \times 100$$

D'où :

- $M_0$  : masse initiale du miel ;
- $M_1$  : masse de la capsule vide ;
- $M_2$  : masse de la capsule + cendre ;
- $M_m$  : la teneur en cendre.

#### 4-1.8. Teneur en matière sèche

La matière sèche est évaluée après mesure de l'indice de réfraction et de la teneur en eau (Makhloufi, 2007), On lit la valeur de la matière sèche sur la première échelle graduée de l'oculaire du réfractomètre (en degré brix).

#### 4-1.9. Teneur en sucres

Pour les sucres "fructose, glucose sucrose, et maltose", l'analyse est effectuée en double en utilisant chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec un détecteur Scan Type: RID. En utilisant une colonne de type APS2-HYPERSIL 250X4.6 avec une polarité positive. Le volume d'injection est de 10  $\mu$ l. à une température de 30°C et un débit de 1.0 ml/min.

##### *Préparation des solutions standards et la phase mobile*

On prend 1g de chaque sucre et on les met dans une fiole de 100 ml, on ajoute 25ml de méthanol et 75ml d'eau à la fiole et on agite manuellement. Pour la préparation de la phase mobile, 250ml d'eau ultra pure est ajouté aux 750 ml d'acétonitrile dans une fiole jaugée de 1 litre. Avant utilisation, on filtre la phase mobile à travers une membrane de 0,45  $\mu$ m et on l'a mis dans un bain à ultra-son pendant 5 minutes.

##### *Préparation de l'échantillon*

Un gramme de miel est dissout dans 25 millilitres de méthanol, on mélange par un vortex et on transfère la solution dans une fiole jaugée de 100 ml. L'eau distillée ultra pure est ajouté au trait de jauge ensuite la solution est bien mélangée manuellement puis centrifugée à 3000 rpm/10min. Enfin l'échantillon est filtré à travers un filtre-seringue de 0,45 $\mu$ m avant injection manuelle des échantillons et analyse chromatographique par HPLC.

#### 4-1.10. Teneur en polyphénols totaux

##### *Principe du dosage*

Le Dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique  $N(H_3PW_{12}O_{40})$  et d'acide phosphomolybdique  $(H_3PMO_{12}O_{40})$ . En milieu basique, ce réactif oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques. Les produits de réduction (oxydes métalliques de tungstène  $W_8O_{23}$  et de molybdène  $Mo_8O_{23}$ ) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption à 725 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Ainsi, la quantité de polyphénols pour chaque échantillon est déterminée par la projection de la valeur de la densité optique à 725 nm sur une courbe étalon d'un polyphénol standard (acide gallique) réalisée dans les mêmes conditions (Annexe). Le dosage de polyphénols totaux est effectué par la comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue 100-500  $\mu$ l (Gulcin et al., 2005).

##### *Méthode de dosage*

La méthode consiste à ajouter 500  $\mu$ l d'une solution de miel (50% ; p/v dans le méthanol) à 2,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1 :10 v/v) : 1 ml de réactif de Folin+ 9 ml de  $H_2O$  en utilisant un vortex pour bien mélanger la solution; on laisse reposer 3 minutes puis on ajoute 2 ml d'une solution de  $Na_2CO_3$  (20% ; p/v). Le mélange obtenu est incubé à température de 40°C au bain marie pendant environ 30 minutes jusqu'à une heure à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 765 nm. Une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par 100 grammes de miel (mg EAG/100g miel) (Folin O. et Ciocalteu V., 1927).

#### 4-1.11. Teneur en Flavonoïdes

##### *Principe de dosage*

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode de (Arvouet-Grand, A. et al., 1994). Le réactif utilisé est une solution incolore de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$  à 20% ; p/v). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif, entraînant la formation d'un complexe brunâtre qui est absorbé à 510 nm. La comparaison de la densité optique observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur en flavonoïdes totaux (Annexe).



### Méthode de dosage

Les flavonoïdes totaux ont été évalués par colorimétrie en ajoutant à 500 µl de miel (0,1-0,5g/ml), 2ml d'eau distillée et 150 µl de NaNO<sub>2</sub> (5% ; p/v) et on mélange la solution à l'aide d'un vortex. On laisse la solution reposer 6 min puis on ajoute 150 µl AlCl<sub>3</sub> (20% ; p/v) et on laisse reposer encore 6 min. 2 ml de NaOH et 200 µl d'eau distillée sont additionnés à la fin de l'expérimentation. Ensuite, la solution est homogénéisée en utilisant un vortex. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de la catéchine par 100 grammes de miel (mg EC/100g miel).

## 4-2. Etude *in vitro* de l'effet antioxydant de miel (Test de DPPH)

### 4-2.1. Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH (Hartmann, 2007). En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (Epifano et al., 2007).



Plus un composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration du composé phénolique nécessaire pour atteindre une disparition de 50% du DPPH à l'équilibre est connue comme l'IC<sub>50</sub>. Sanchez - Moreno et al. (1998) ont proposé un autre paramètre pour mesurer l'efficacité anti-radicalaire (EA) où le TC<sub>50</sub> est le temps nécessaire pour arriver à l'état d'équilibre en utilisant l'IC<sub>50</sub>. La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs.

### 4-2.2. Détermination de l'IC<sub>50</sub>

L'évaluation de la capacité antioxydante (IC<sub>50</sub>) est réalisée comme suit : 2,7 ml d'une solution méthanolique de DPPH (60 µM) est mélangé avec 0,3 ml de l'échantillon de miel (2,5%, 5%,10%, 20% et 40% ; p/v dans le méthanol). Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 60 min. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 2,7 ml de la solution de DPPH et de 0,3 ml de méthanol. La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions

opératoires (Yedhu Krishnan, R. et al., 2016). La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le I% (pourcentage d'inhibition) est calculé selon la formule suivante (Epifano et al., 2007) :

$$PI = \left[ \frac{(Ab_T - Ab_E)}{Ab_T} \times 100 \right]$$

Dont :

**PI** : Pourcentage d'inhibition

**Ab<sub>T</sub>**: Absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 60 min.

**Ab<sub>E</sub>**: Absorbance des échantillons mesurés après 60 min.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux P., 2004) (Annexe).

### **4-3. Recherche des contaminants**

#### **4-3.1. Analyse des éléments traces métalliques**

Pour l'analyse des éléments traces métalliques la méthode de Spectrophotométrie à Absorption Atomique à flamme (SAA) a été utilisée pour le dosage des métaux suivant : Fe, Mg, Ni, Zn, Cu, Pb et Cd. Pour chaque échantillon l'analyse a été effectuée en triplicata. Cette analyse a été effectuée en deux étapes successives où la première partie s'entoure sur la minéralisation des échantillons. Dans une deuxième étape la mise en solution et le dosage des métaux lourds par la technique de la SAA sont effectuées au CRAPC.

##### **4-3.1.1. Minéralisation et mise en solution**

Cette méthode s'adresse à tout matériel organique. La minéralisation est l'opération par laquelle la matière organique est détruite libérant ainsi les matières minérales que l'on peut alors mettre en solution.

*Minéralisation par voie sèche*: l'échantillon est placé dans un four à moufle et chauffé progressivement jusqu'à 600°C. La matière organique est détruite par combustion. Le résidu est constitué par la cendre minérale. L'opération de minéralisation doit être complétée par mise en solution en milieu acide des cendres obtenues. Cette méthode peut s'appliquer à l'ensemble des éléments en traces mais est inadaptée pour le dosage des éléments volatils (mercure, sélénium, arsenic, etc.).

### Mode opératoire

5 g de chaque échantillon de miel sont chauffés dans une capsule en porcelaine sur plaque chauffante à 100°C jusqu'à l'échantillon devient noire. Ensuite la capsule est placée dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à 600°C et qui est ainsi maintenue pendant 16 heures. Après refroidissement dans le dessiccateur, 3 ml d'acide nitrique pure (HNO<sub>3</sub>) sont ajoutés aux cendres. Le mélange est porté à l'ébullition sur la plaque chauffante jusqu'à l'évaporation totale de l'acide. Puis on ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl) et on filtre la solution à travers un filtre de 0,45 µm dans une fiole de 10 ml en ajustant au trait de jauge avec de l'eau distillé. Les solutions préparées sont homogénéisées par agitation manuelle, puis sont transvasées dans des godets préalablement rincés avec la solution sur lequel le numéro de l'échantillon est inscrit (A.O.A.C., 2000).

#### 4-3.1.2. Préparation des étalons

Les différents étalons des éléments métalliques (Fe, Mg, Ni, Zn, Cu, Pb et Cd) sont préparés en parallèle avec les échantillons et conservés à température de 4°C jusqu'à l'analyse. La gamme de concentrations choisies pour chaque métal a été faite selon l'intervalle de détection de la SAA ce qui permet de tracer les courbes d'étalonnage par la suite.

#### 4-3.1.3. Dosage par spectrophotomètre atomique à flamme (SAA)

Les échantillons ainsi mis en solution vont être dosés par spectrophotomètre atomique à flamme domaine de travail de l'ordre du mg/l (*ppm*) technique s'appliquant aux éléments en traces qui ne sont ni volatils ni fortement réfractaires. L'ensemble des analyses doit être réalisé deux fois par spectrophotomètre atomique à flamme.

La concentration de chaque métal dans les échantillons de miel est calculée en mg/kg, selon la formule suivante:

$$T \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = C \times \frac{V}{S}$$

Où:

T: Concentrations du métal en (mg kg<sup>-1</sup>);

C: Concentrations du métal en (mg l<sup>-1</sup>) déterminée par la courbe d'étalonnage ;

V: Volume d'extraction en ml (10 ml);

S: Poids de la prise d'essais (5 g)

### 4-3.2. Recherche des antibiotiques « chloramphénicol »

La méthode adoptée pour le dosage de résidus de chloramphénicol (*figure 23*) dans le miel est la chromatographie (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) qui est une technique plus sophistiquée permet une isolation très efficace des ions d'analyte du matrice bruit-productrice (Kivrak I. et al., 2016).

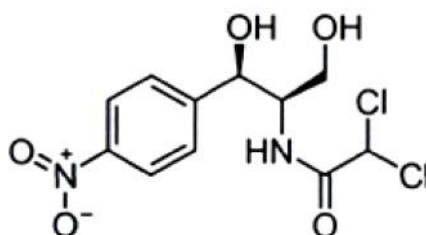


Figure 23: Structure de chloramphénicol (Blachon G., 2011).

#### 4-3.2.1. Préparation des standards (*Florfinicole* et *chloramphénicol*)

A-La solution mère de « *Florfinicole* » est préparée par dissolution de 10,1 mg de l'étalon interne (*Florfinicole*: 98.1%) dans 100 ml (20% ; v/v d'acétonitrile-80% ; v/v eau) équivalant de 100µg/g. Un volume de 0,1 de la solution est dilué dans 100ml d'un mélange constitué de 20% ; v/v d'acétonitrile et 80% ; v/v d'eau afin d'obtenir une dilution de 100ng/g.

B-La solution mère de l'étalon externe «*chloramphénicol*» de (100 mg/kg) est préparée à partir de palmitate de chloramphénicol (97.9%). On ajoute 0,1 ml à 100 ml (un mélange de: 20% d'acétonitrile-80% eau) équivalant de 100µg/g. Un volume de 0,1 ml de la solution préparée est dilué dans 100 ml (20% d'acétonitrile-80% eau) équivalant de 100 ng/g. On continue la procédure afin de réaliser une série de dilutions (0.05, 0.1, 1.0, 5.0, 10, 50, 100 ng/g).

#### 4-3.2.2. Préparation de l'échantillon de miel

La préparation de l'échantillon consiste à l'extraction de l'échantillon de miel en utilisant la méthode décrite par (Rodziewicz L. et Zawadzka I., 2007) avec quelques modifications. Un gramme de miel est ajouté à 100 µl de la solution préparée de standard interne (*florfénicol* à 100 ng/g) et 2 ml d'EDTA. Le mélange est homogénéisé pendant 3,0 min. par un vortex. Ensuite, 4 ml d'éthylacétate sont additionnés et on mélange encore 3,0 min. puis la solution est centrifugée à 4000 rpm/5 min. Après la centrifugation il se forme deux phases, on prend la phase supérieure d'éthylacétate et on les met dans des tubes en verre de 5,0 ml pour évaporation dans un concentrateur à 45°C avec une centrifugation de 2000

rpm. Après séchage des tubes, on reconstitue la phase séché par l'ajout de 1,0 ml de (20% d'acétonitrile plus 80% d'eau) et on injecte à LC/MS/MS.

#### **4-3.2.3. Dosage par LC/MS/MS**

L'analyse a été effectuée par LC/MS/MS avec une interface Electrospray fonctionnant avec le mode négatif (ESI-négatif) et une colonne C18 (50 mmX 0.45) ; où la taille des particules est de 5 microns. Le temps de rétention est de  $2.0 \pm 0.3$  min. pour le florfenicol et de  $2.1 \pm 0.3$  min. pour le chloramphénicol où la limite de détection de 0.02 ng/g pour le chloramphénicol. Pour la phase mobile, on ajoute 500 ml d'eau à 500 ml d'acétonitrile en effectuant une filtration et un dégazage de mélange avant d'utilisation dans un bain à ultra-son pendant 5 minutes.

#### **4-4. Etude palynologique de miel (Méliko-palynologie)**

La méthode de l'analyse pollinique consiste à séparer les grains de pollen de la matière qui les entoure afin de pouvoir en observer la morphologie sur une lame microscopique. Elle donne une information précise sur les principales plantes mellifères et permet de caractériser les miels par leur origine botanique ou géographique. Elle apporte des informations importantes sur le comportement de butinage des abeilles. Par ailleurs, la teneur en pollen des miels permet de contrôler leur qualité, augmentant ainsi leur valeur économique.

##### **4-4.1. Méthode classique**

10 grammes d'un miel bien homogénéisé sont versés dans un bécher. On les dilue dans 20 ml d'eau tiédie acidulée (préparée en mélangeant 5ml d'acide sulfurique dans 1litre d'eau). La solution est centrifugée pendant 10 minutes à 3500 tours-minute et le liquide surnageant est jeté de façon à ne conserver que le culot de centrifugation.

Ce culot est ensuite mis en suspension dans de l'eau distillée puis centrifugé à nouveau 10 minutes à 3500 tours-minute. Le surnageant est éliminé. On aspire ensuite le culot à l'aide d'une pipette Pasteur, autant que possible de façon quantitative, sur une lame porte-objet et on le répartit sur une surface d'environ 20 X 20 mm. On laisse évaporer l'excédent d'eau sur la platine chauffante (ou bien dans l'étuve à 40°C) avant de déposer une goutte de gélatine glycinée qui fixera la préparation.

##### **4-4.2. Méthode d'acétolyse**

Nous avons expérimenté notre méthode sur neuf échantillons de miels de l'ouest Algérien d'origine géographique différente. Dans tous les cas, le culot résultant du traitement a permis aisément une numération sur deux cents (200) grains : nombre maximum de grains

souhaité pour l'analyse pollinique qualitative et permettant une détermination des pourcentages d'espèces présentes (Louveaux, Maurizio, Vorwhol, 1970) très sûre.

① L'acétolyse selon Erdtman (1943) cité par Gadbin C. (1979) est faite sur 10 g de miel, préalablement dissous dans 100 ml d'eau tiède acidulée (pas plus de 40°) : centrifuger la solution obtenue. Décantier. Le but de cette opération est d'éliminer aussi complètement que possible les sucres du miel qui noirciraient la préparation.

*N.B.* Toutes les centrifugations durent 10 min. et se font à grande vitesse pour les petites centrifugeuses. Avec une centrifugeuse, une vitesse de 2 500 rpm pendant 5 min. est suffisante. La décantation est réalisée en versant doucement le liquide d'un mouvement régulier et continu, jusqu'à son élimination complète.

② Sur le culot sont versés 10 ml d'acide acétique pur. Après agitation et centrifugation l'acide est éliminé par décantation.

③ Sur ce culot sont alors ajoutés 2 ml de « mélange acétolytique » : celui-ci confectionné peu avant son utilisation, dans une verrerie sèche, en versant goutte à goutte 0,2 ml d'acide sulfurique pur dans 1,8 ml d'anhydride acétique. L'ensemble est agité avec une baguette de verre sèche, puis placé pendant 5 à 10 min. dans un bain-marie à 70° (prendre garde de ne pas mettre en contact le mélange acétolytique et l'eau).

④ Sortir les tubes du bain-marie, bloquer l'acétolyse en ajoutant de l'acide acétique jusqu'à remplir le tube. Centrifuger et décantier.

⑤ Après centrifugation et décantation, le culot est rincé à l'eau distillée trois fois, agité, centrifugé à nouveau.

⑥ Le montage est réalisé dans la glycérine pure, milieu qui, s'il présente des inconvénients pour la conservation des pollens à long terme, a le grand avantage de permettre la rotation des pollens sous le microscope et leur étude selon plusieurs axes d'observation. On peut lui préférer le montage classique en mélikso-palynologie dans la gélatine glycéinée qui assure une meilleure conservation de la lame.

#### **4-4.3. Observation microscopique et lecture des préparations**

##### **4-4.3.1. Observation par microscope optique (M.O.)**

L'examen microscopique de pollen de différentes variétés de miel a été effectué à l'aide d'un microscope optique (ou photonique) à trois grossissements (X10, X40 et X100). Les observations sont réalisées directement sur les lames de préparation.

Les préparations de lames obtenues à partir des miels sont observées sous le microscope à un grossissement d'environ 400 fois. On utilise le plus souvent un objectif X10 pour la mise au point ensuite on fait augmenter le grossissement en utilisant un objectif X40. Lorsqu'il est nécessaire de préciser un détail, on passe directement au plus fort grossissement (objectif X100), mais on revient toujours à l'objectif moyen qui est le plus convenable pour l'identification rapide des grains de pollen.

Selon Louveaux *et al.*, (1970), La détermination de l'origine géographique et de l'origine botanique repose sur l'identification des pollens et des autres constituants du sédiment d'un miel ainsi que sur leur dénombrement. L'identification se fait avec l'aide des données tirées des publications spécialisées, et au moyen de préparations de comparaison (*Annexe*).

#### *Conduite de l'examen microscopique*

Pour obtenir un spectre pollinique valable : Louveaux, Maurizio et Vorwhol (1970) ont préconisé d'opérer en deux temps :

- Dans un premier temps, on observe l'ensemble de la préparation et on note toutes les espèces rencontrées jusqu'à ce qu'on ne découvre plus d'espèces nouvelles ;
- Dans un second temps, on procède à une numérotation sur au moins 200 grains pris au hasard mais en épuisant complètement tous les champs observés.

La détermination des classes de fréquence, repose sur le traitement de 200 à 300 grains de pollen. Pour les spectres polliniques pauvres en espèces, 200 grains de pollen suffisent. Pour ceux qui sont riches en espèces, il est nécessaire de traiter 300 grains de pollen.

#### **4-4.3.2. Observation par microscope électronique à Balayage (M.E.B.)**

Les grains de pollen sont préparés par la méthode acétolyse puis sont lyophilisés ou séchés à l'air libre ou à l'étuve (à 40°C). L'observation de pollen par le microscope électronique à Balayage permet une meilleure identification de pollen par rapport au microscope photonique ; il assure beaucoup de détails de grain de pollen en image tridimensionnelle (3D). L'examen de la structure fine de pollen a été réalisé au moyen de microscope électronique à balayage pourvu de la capacité d'étudier les échantillons en mode environnemental, c'est-à-dire sans traitement de métallisation préalable. Ce mode permet l'observation directe des structures dans leur état naturel hydraté ou vivant.

#### 4-4.4. Analyse pollinique quantitative

L'analyse pollinique quantitative permet de connaître la variation de la richesse en pollen des miels. Le nombre de grains de pollen contenus dans la quantité de miel de la prise d'essai a été calculé à partir de la formule suivante :

$$N = \frac{F \cdot n}{f \cdot a}$$

N : Nombre de grains de pollen contenus dans le volume de la suspension examinée.

F : Surface de la lame sur laquelle, le volume de la suspension examinée a été étalé.

f : Surface d'un champs en mm<sup>2</sup>.

n : Nombre de grains de pollen dénombrés sur l'ensemble des champs examinés.

a : Nombre de champs examinés.

#### 4-4.5. Analyse pollinique qualitative

L'analyse pollinique qualitative permet d'identifier les grains de pollen retrouvés afin de délivrer la « carte d'identité » d'un miel.

L'identification de grains de pollen se limite souvent à la forme du genre. L'emploi des noms scientifiques devrait donc être limité aux cas où une détermination sûre est possible, lorsque cette condition n'est pas remplie, il convient d'accompagner le nom scientifique d'une mention précisant clairement que celui-ci doit être pris dans un sens large : par exemple *Trifolium repens s.l. (sensu lato)* ou « groupe *Trifolium repens* », c'est-à-dire pollen qui d'après ses dimensions et sa structure est plus ou moins semblable à celui de *T. resupinatum* ou *T. arvense* (Maurizio et Louveaux, 1967 ; Vorwohl, 1968). Selon les mêmes auteurs, lorsque des connaissances détaillées font défaut, le pollen peut être rattaché à un groupement plus important « forme ou type ». Ces deux termes sont utilisés pour indiquer tous les genres ou espèces représentés par le même type morphologique. Enfin quelques formes inconnues ou non identifiées qui ne peuvent être rattachées à aucune famille ont été mises en fin de la liste.

#### 4-5. Etude *in vivo* de l'effet immunomodulateur de miel

Dans cette partie l'étude a été réalisée en deux étapes :

- La première étape consiste en l'immunisation des souris de souche BALB/c par l'ovalbumine en absence ou en présence de miel à différents temps d'injection selon un protocole défini afin d'étudier son effet immunomodulateur.
- La deuxième étape consiste en l'évaluation du taux des immunoglobulines G (IgG) par une technique immunochimique quantitative (ELISA).



#### 4-5.1. Immunisation des animaux

##### 4-5.1.1. Choix de l'animal

Notre choix s'est porté sur des souris mâles de type Balb/c (Bagg Alinos) (*figure 24*). Les souris sont les animaux de laboratoire les plus utilisés. Leur petite taille permet d'élever facilement un grand nombre dans un espace réduit, de multiplier le nombre d'animaux immunisés et d'accroître ainsi les chances de réussite de l'expérimentation.



Figure 24: Souche des souris BALB/c.

##### 4-5.1.2. Préparation des groupes

Ces animaux proviennent de souches parentales acquises auprès de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA). Les souris sont mises en reproduction et sont élevées dans l'animalerie du laboratoire de Biotoxicologie dans des conditions environnementales contrôlées (La température est ajustée autour de 20°C). Les mâles sont regroupés dans des cages conventionnelles avec un nombre de 6 par cage, ces dernières sont dotées d'une mangeoire et d'un biberon.

Les souris sont nourries ad libitum durant toute la période de gestation et de lactation avec un aliment standard pour rongeurs en tourteaux agglomères, commercialisé par SARL (maïs, son, remoulage, soja, CMV) et boivent de l'eau de robinet (Cohen *et al.*, 1991 ; Bailey *et al.*, 1997).

Dés l'âge de trois semaines, c'est-à-dire au sevrage, les mâles nouveaux nés sont séparés de leurs mères et triés pour constituer les différents groupes expérimentaux qui sont réparti comme la suite :

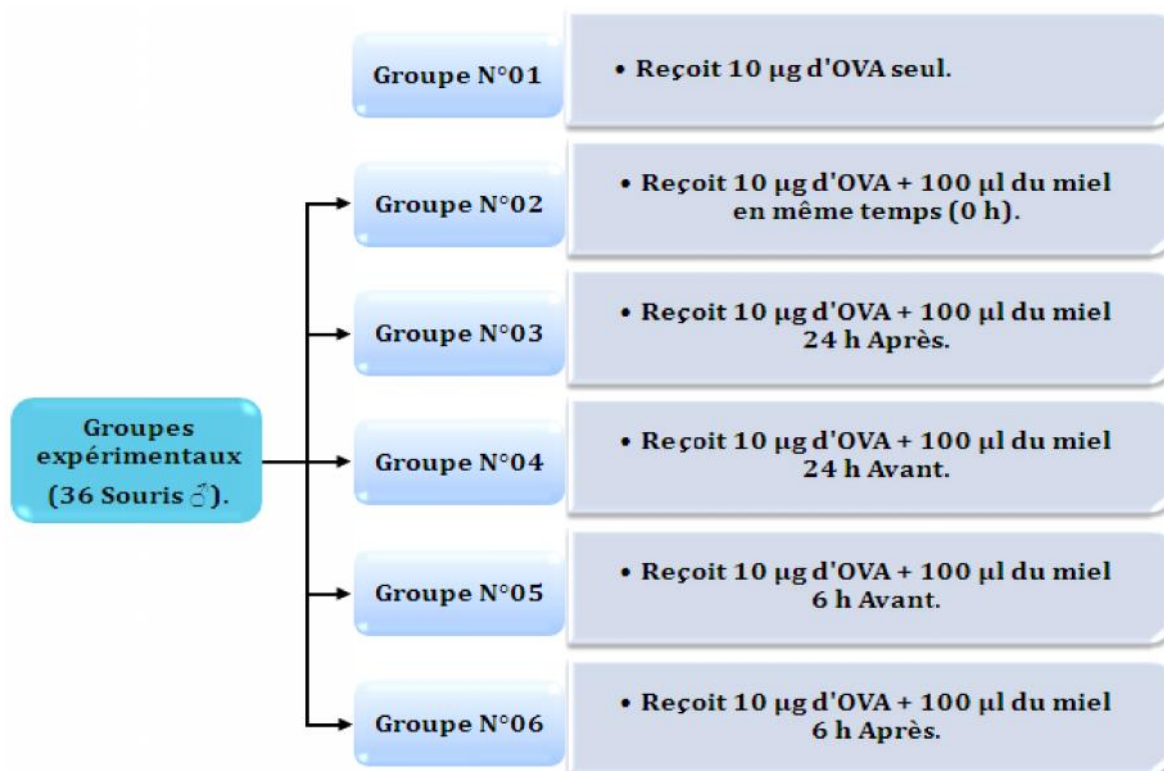


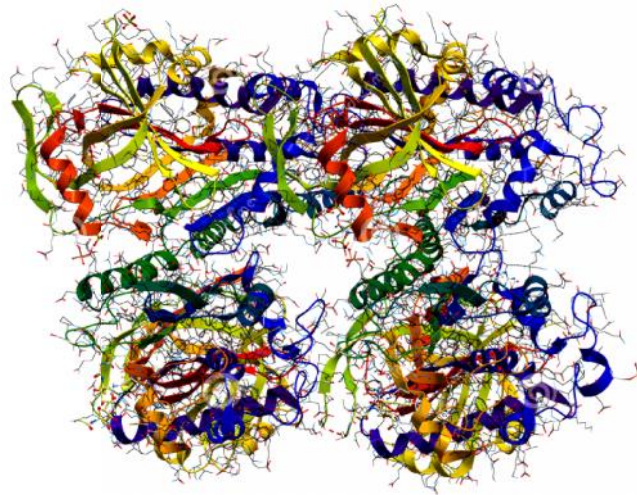
Figure 25 : Répartition des groupes expérimentaux selon le type d'immunisation en fonction du temps.

#### 4-5.1.3. Choix du miel

Nous avons étudié au paravent la conformité et la qualité physico-chimique et pollinique de nos échantillons de miel récolté au niveau de la région de l'ouest Algérien. Et nous avons choisi le meilleur échantillon N°03, celui récolté de la région de « *Sidi Ali Mellele* » et qui présente un taux élevé en polyphénols totaux, une activité antioxydante élevée, une richesse en pollens de plusieurs plantes médicinales et sur laquelle nous avons testé l'effet immunomodulateur du miel chez des souris Balb/c.

#### 4-5.1.4. Choix de l'antigène

L'antigène choisi est l'ovalbumine pour son pouvoir immunogène. C'est une glycoprotéine et la majeure protéine du blanc d'œuf ; il représente 45% des protéines du blanc d'œuf avec un poids moléculaire de 45 kDa (*figure 26*). Il est utilisé depuis 1980 comme modèle de protéine dans la recherche biologique (*Arakawa et al., 2000*).



**Figure 26: Structure quaternaire de l'ovalbumine (Andronov L., 2016).**

L'ovalbumine a été fournie par *Sigma* (A-5253, Lot 60K0844) sous forme lyophilisée en flacon de 250 g. Cette protéine est très soluble dans l'eau distillée stérile.

#### **4-5.1.5. Adjuvants**

Les adjuvants sont constitués à la base d'huile de paraffine, 85%, et de mannide monooleate, 15%. L'adjuvant complet de Freund est complété par 0,005% de *Mycobacterium butyricum* tués. Une émulsion des adjuvants avec l'allergène est réalisée en mélangeant un volume égal de chaque constituant, puis en agitant fortement le mélange. Ces adjuvants sont utilisés pour l'immunisation des souris à raison de 50  $\mu$ l par souris.

Pour effectuer la première immunisation, nous avons mélangé un volume égal d'adjuvant complet de Freund (ACF) et de la solution d'antigène. L'immunisation de rappel est réalisée par l'adjuvant incomplet de Freund (AIF).

Les deux types d'adjuvants, l'ACF (Sigma F5881, Lot 029K8708) et l'AIF (F5506, lot 098K8724) nous ont été fournis sous forme huileuse dans des petits flacons de 10 ml.

#### **4-5.1.6. Voie d'injection**

Notre choix s'est porté sur l'injection par voie intra-péritonéale (i.p.). C'est la voie d'administration la plus recommandée pour les souris et elle permet un contact rapide entre l'antigène et les cellules immunocompétentes des ganglions régionaux. Ainsi l'important volume de la cavité péritonéale permet d'injecter une grande quantité de solution immunogénique (Bach, 1993 et Revillard, 2001). Lors de l'injection, la seringue est inclinée pour ne pas toucher les organes (figure 27).



Figure 27: Immunisation intra-péritonéale des souris BALB/C.

#### 4-5.1.7. Protocole d'immunisation

Les différents groupes de souris sont injectés par voie intra-péritonéale avec 10  $\mu\text{g}$  d'OVA ou OVA plus 100  $\mu\text{l}$  du miel dans les jours 0, 21 et 35 et le sang sera récupéré après 7 jours de la dernière immunisation (Duddukuri *et al.*, 2001).

##### 4-5.1.7.1. Première immunisation

###### 4-5.1.7.1.1. Préparation de la solution antigénique

- 50 mg d'ovalbumine a été dissout dans 250 ml d'eau distillée stérile afin d'obtenir une solution antigénique de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- L'adjuvant de Freund doit être chauffé à une température de 37°C pendant 1 à 2 minutes et avec utilisation de vortex pour suspendre les mycobactéries (Baldrige et Lacy, 2000).
- 1000  $\mu\text{l}$  de l'ACF prélevé à l'aide d'une micropipette et 1000  $\mu\text{l}$  de la solution d'antigène contenant 10  $\mu\text{g}$  d'ovalbumine sont mélangés en utilisant le vortex.
- Un volume de 100  $\mu\text{l}$  de ce mélange est injecté intra-péritonéale à la souris en utilisant l'alcool chirurgical au site d'injection.

###### 4-5.1.7.1.2. Préparation de solution de miel

Le miel pur est difficilement injectable, donc on le dissout dans de l'eau distillée afin de faciliter sa pénétration dans la seringue; on prépare une solution de miel contenant 50% de miel et 50% d'eau distillée. On prélève 200  $\mu\text{l}$  de cette solution à l'aide d'une seringue et on l'injecte par voie i.p. à la souris.

###### 4-5.1.7.2. Immunisation de rappel

Les injections de rappel sont effectuées au 21<sup>ème</sup> et 35<sup>ème</sup> jour en utilisant l'antigène avec l'adjuvant incomplet de Freund en présence et en absence du miel.

#### 4-5.1.7.3. Prélèvement sanguin

Sept jours après la dernière immunisation, la dissection après l'anesthésie des souris au chloroforme a été réalisée afin de récupérer le maximum du sang en utilisant des seringues stériles de 1 ml. Le sang est prélevé à partir de l'aorte abdominale (*figure 28*).

Le sang collecté est transféré dans des tubes Eppendorf et est centrifugé à 3000 g à 4°C/15 min.

Le volume du sang est ensuite réparti en quatre aliquotes et congelé à température de -20°C jusqu'à son utilisation.



Figure 28: Prélèvement du sang à partir de l'aorte abdominale des souris BALB/c.

#### 4-5.2. Evaluation de la réponse immunitaire humorale par le dosage des IgG totaux à l'aide d'une technique immunoenzymatique « ELISA indirecte non compétitive »

##### 4-5.2.1. Choix du test

Les méthodes de dosages immunoenzymatiques en phase hétérogène permettent de doser avec une bonne sensibilité des constituants d'intérêt biologique. Ils ont été décrits pour le dosage d'antigène : IgG à l'aide d'IgG couplées à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline et très vite appliqués au dosage d'anticorps.

Le nom d'ELISA (« Enzyme-linked-immunosorbent-assay ») est couramment employé maintenant pour tous les dosages utilisant des enzymes marqueurs.

Le test ELISA indirecte non compétitive est basé sur un procédé dans lequel une phase solide est nécessaire pour immobiliser l'anticorps associé à l'enzyme et ainsi permettre l'évaluation de l'activité enzymatique du complexe antigène-anticorps-enzyme ; c'est un dosage en phase hétérogène ([Ternynck et Avrameas, 1987](#)).

#### 4-5.2.2. Principe du test

- Le test immuno-enzymatique est une méthode analytique quantitative où l'un des partenaires réactifs porte un marqueur enzymatique. L'antigène ou l'anticorps peuvent être marqués.
- Dans une première étape, un support solide (en général une plaque de microtitration) est recouvert avec l'antigène reconnu par l'anticorps recherché.
- Si le matériel à analyser (par exemple du sérum) contient ces anticorps, il se lie à l'antigène.
- Dans une deuxième étape du test, un anticorps secondaire marqué par une enzyme, se lie aux anticorps recherchés. Puis l'enzyme transforme un substrat incolore en un substrat coloré (figure 29) (Burmester et Pezzutto, 2000).

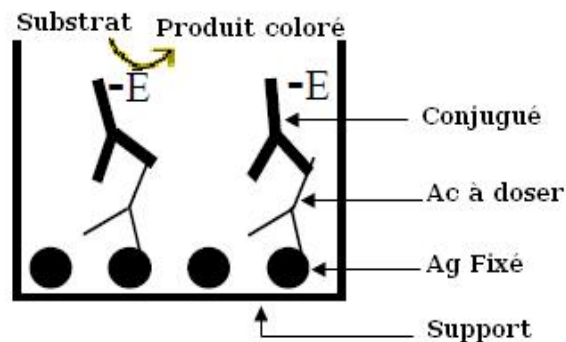


Figure 29: Principe du test ELISA indirecte non compétitive (Vitkova, 2002).

#### 4-5.2.3. Matériels et réactifs

##### 4-5.2.3.1. Matériels

- Lecteur de microplaques à 96 puits (TECAN SUNRISE)
- Incubateur ELISA (THERMOSTAR BMG)
- Microplaques de titration de 96 puits en polystyrène et à fond plat avec couvercle (Nunc, n°167008, Lot : 049283).
- Micropipette réglable
- Micropipette multicanaux
- Vortex
- Bain marie
- Agitateur magnétique

##### 4-5.2.3.2. Réactifs

- Gélatine de porc (Fluka, n° : 2325546, Lot : 387213/1 40101)



- Tween 20
- Immunsérum polyclonal de souris anti-OVA
- Ovalbumine lyophilisée
- Solution d'anticorps conjugué : IgG de chèvre anti-IgG de souris marquée à la peroxydase de raifort (Sigma, 5 CODE 026K4846 A9917-1 ml)
- OPD (Sigma, Lot : 09716 MB-085, n° : P2, 393-8)
- PBS pH 7,4
- Tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9
- Gélatine à 5% (p/v)
- PBS-Tween : ajouter 100 µl de Tween 20 à 100 ml de PBS
- PBS-Tween-Gélatine : ajouter 1 ml de gélatine 5% (p/v) à 9 ml de PBS-Tween.
- Tampon citrate de sodium-acide citrique 0,1 M pH 5,5
- Solution d'eau oxygénée à 3% : additionner 400 µl d'eau oxygénée à 30 V à 1 ml d'eau distillée.
- Acide sulfurique 2N

#### **4-5.2.4. Détermination des dilutions optimales de titrage des différents réactifs par ELISA**

Afin de déterminer les dilutions optimales de l'immunsérum, du conjugué et de l'OVA, des séries de puits (de A à H) ont été sensibilisés avec une gamme de concentration d'OVA de 10µg/ml, 8µg/ml, 5µg/ml, 2µg/ml, 1µg/ml, 0,5µg/ml, 0,1µg/ml, 0,05µg/ml.

Chaque série de puits (de 1 à 12) ont été sensibilisés par une gamme de dilutions de l'immunsérum de souris anti-OVA (de 1/100 à 1/1000, 1/1500) et on laisse le dernier colonne pour le blanc.

Pour le conjugué marqué à la peroxydase, les dilutions: 1/000, 1/1500, 1/2000 et 1/3000 ont été choisi chaque fois.

#### **4-5.2.5. Test ELISA**

Nous avons suivi le protocole adopté par [Ternynck et Avrameas, \(1987\)](#). Les différentes étapes de dosage sont les suivantes :

##### **4-5.2.5.1. Sensibilisation de la plaque (Coating)**

Chaque puits de la plaque de microtitration est sensibilisé avec 100 µl d'OVA (5 µg/ml) dissoute dans le tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,5. Mettre le couvercle et incuber la plaque pendant 2 h à 37°C (ou bien la nuit à 4°C).

Après l'incubation, laver la plaque 3 fois avec du tampon PBS-Tween et sécher par retournement sur du papier absorbant afin d'éliminer toute trace de liquide résiduel.

La plaque reste utilisable durant 2 à 3 semaines si elle est stockée à 4°C ; cela permet de sensibiliser plusieurs plaques à la fois.

#### **4-5.2.5.2. Saturation des sites adsorbant résiduels (Surcoating)**

Une solution de PBS-Tween-Gélatine (100 µl dans chaque puits) est utilisée pour bloquer les sites adsorbant résiduels. Recouvrir la plaque et laisser réagir pendant 1 h à 37°C puis laver 3 fois avec du tampon PBS-Tween.

#### **4-5.2.5.3. Incubation avec l'immunsérum des souris**

Chaque puits reçoit 100 µl de la dilution 1/300 d'immunsérum à doser réalisée dans le PBS-Tween-Gélatine. Durant l'incubation (2 h à 37°C), les anticorps de souris se fixent sur l'antigène (OVA) adsorbé sur la plaque. La plaque est lavée 5 fois par le tampon PBS-Tween et séchée à l'aide du papier absorbant.

#### **4-5.2.5.4. Incubation avec la solution du conjugué**

Les puits sont incubés avec 100 µl de la solution du conjugué dilué à 1/2000 dans le PBS-Tween-Gélatine. Après une incubation de 2 heures à 37°C. Laver 5 fois avec du tampon PBS-Tween et sécher par retournement sur du papier absorbant.

#### **4-5.2.5.5. Révélation**

Dissoudre extemporanément 6 mg d'OPD dans 12 ml de tampon citrate de sodium-acide citrique 0,1 M pH 5,5 et ajouter extemporanément 100 µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3%.

Répartir rapidement 100 µl par puits de ce tampon de révélation et incuber la plaque à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à 37°C.

Durant cette étape, le conjugué enzymatique lié convertit le chromogène incolore qui vire au jaune. L'addition de 50 µl de la solution d'arrêt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) le fait virer du jaune à l'orange.

#### **4-5.2.5.6. Lecture**

La lecture des densités optiques du chromogène coloré est faite à 492 nm à l'aide de lecture de microplaques ELISA.

- Lors des étapes de lavage avec le tampon PBS-Tween, chaque puits reçoit un volume de 100 µl, qui est ensuite retiré avec précaution ;
- La solution d'eau oxygénée doit être renouveler chaque semaine et celle de l'acide sulfurique est conservé à température ambiante jusqu'à épuisement.



#### 4-6. Etude *in vitro* de l'effet antibactérien de miel

La détermination du pouvoir antibactérien des miels fait appel à plusieurs techniques expérimentales en milieu liquide ou solide et elle dépend de plusieurs paramètres comme le type de miel (selon son origine botanique et géographique), la concentration de miel, la nature du contact entre le miel avec le germe : diffusion sur disque, en puits ou en solution...etc. La première étape pour la détermination du pouvoir antibactérien de nos miels consiste à faire un «*Screening*» ou une sélection des miels ayant un effet antibactérien potentiel en comparaison avec différents antibiotiques qui sont utilisés comme un control positif dans l'expérimentation. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative. Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antibactérienne des miels sélectionnés, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces miels. La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99,9% des microorganismes après sous-culture sur milieu sans antibiotique (Lakhdar L., 2015).

##### 4-6.1. Choix des souches bactériennes

Pour tester l'efficacité antibactérienne des miels, nous avons utilisé des souches de bactéries pathogènes en culture jeune (de 24 h), responsables des toxi-infections alimentaires. Ces souches de bactéries, conservées dans le glycérol sont obtenues à partir de la collection de cultures de centre de recherche scientifique et technique en analyses physicochimiques CRAPC qui proviennent elle-même de l'American type culture collection (ATCC), ou à partir d'isolement des hôpitaux. L'identification de ces souches à été effectuée par le MALDI-TOF-SM (Bruker) (figure 30) afin de confirmer leur dénomination.

Les bactéries pathogènes sélectionnées pour l'expérimentation sont :

**Gram<sup>+</sup>**: *Staphylococcus hominis* 18 ESL, *Bacillus cereus* 4080 LBK X8YE

**Gram<sup>-</sup>**: *Escherichia coli* MB1146481 CHB FSC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
THL EC, *Enterobacter cloacae* 13159\_1CHBX9SA, *Proteus mirabilis* RV412\_A1\_2010\_06b  
LBK.

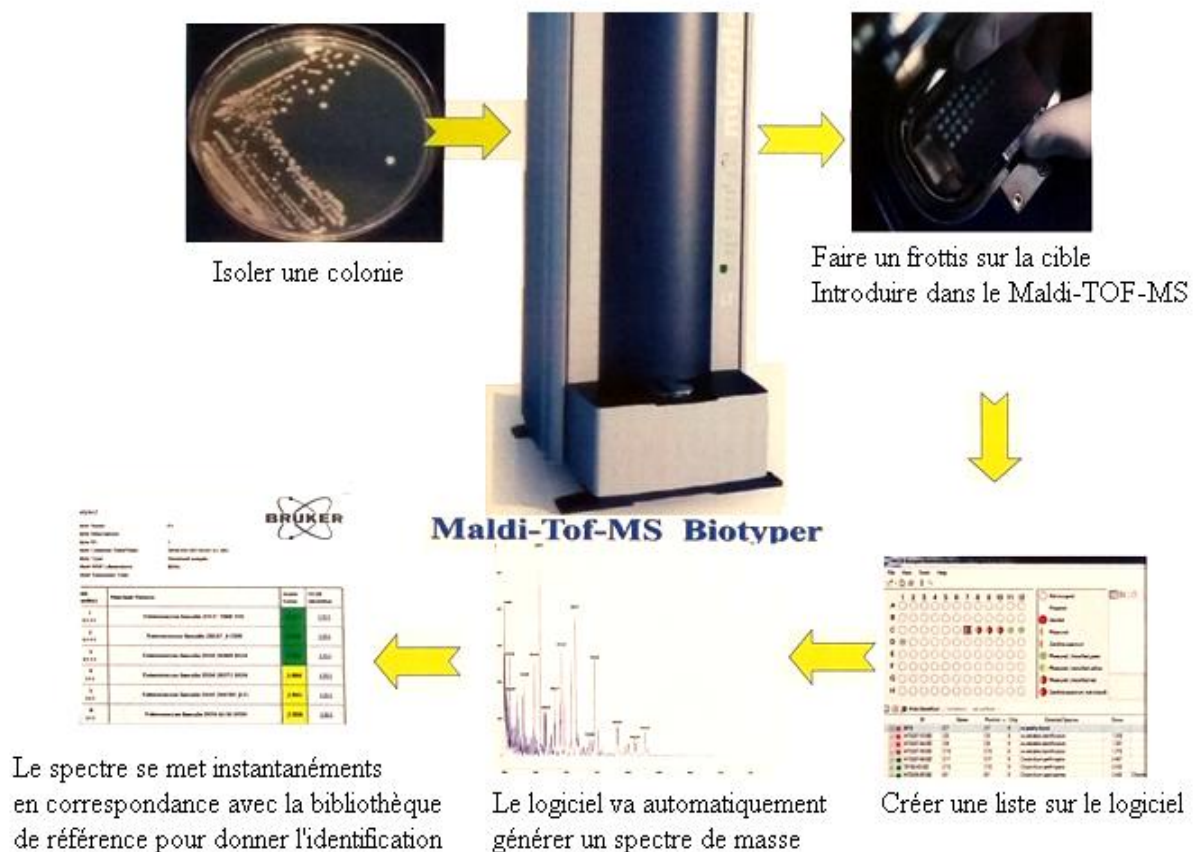


Figure 30: Principe de l'identification bactérienne par le MALDI-TOF-MS (CRAPC, 2016)

#### 4-6.2. Test de sensibilisation aux antibiotiques (Antibiogramme)

C'est une méthode standard de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des antibiotiques. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque antibiotique de 6 mm de diamètre à une concentration fixée déposé sur une géloseensemencée par le germe. Après incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition. Dans notre expérimentation nous avons utilisé 14 différents antibiotiques afin d'évaluer la sensibilité des souches pathogènes testées.

#### 4-6.3. Techniques de screening des miels

Pour évaluer la capacité antibactérienne des miels, nous avons utilisé la méthode de diffusion en puits de Tagg J.R. et Mc Given A.R. (1971). Elle est réalisée par dépôt de différents miels à une concentration de 100% (p/v) dans des puits creusés dans la gélose Muller-Hinton à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Cette technique assure une diffusion totale de miel à partir de puits en donnant une zone d'inhibition claire proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'agent antibactérien (miel) présent dans le puits avec un diamètre facilement mesurable sur géloseensemencée par une suspension bactérienne.

#### 4-6.3.1. Principe de la méthode de diffusion en puits

Elle est basée sur le fait qu'un agent antimicrobien, déposé sur une géloseensemencée va diffuser suivant un gradient de concentration. Le germeensemencé ne se développera pas pour les concentrations supérieures ou égales à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il y aura une zone d'inhibition autour de l'agent antimicrobien, plus ou moins grande suivant la sensibilité de la souche bactérienne (*figure 31*) (Bourdon et Marchal, 1973).

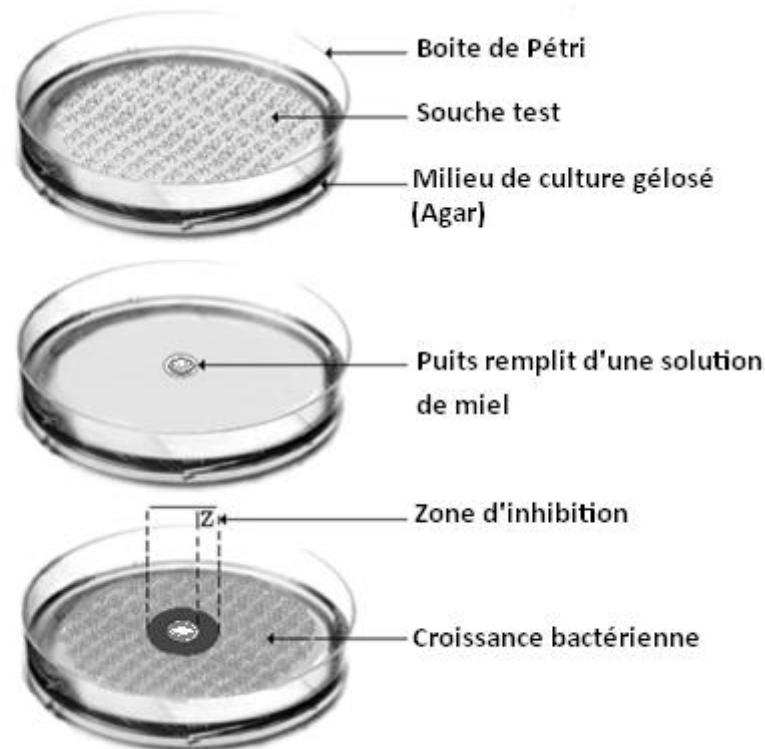


Figure 31: Principe de la méthode de diffusion en gélose

#### 4-6.3.2. Réactivation des souches bactériennes

À partir de souches conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  (dans le glycérol), la mise en culture est réalisée en bouillon nutritif puis les souches ont été repiquées par la méthode des stries (Ezoubeiri et al ; 2005) : la gélose nutritive est fondue au bain marie puis coulée dans des boîtes de pétri. Les boîtes sont ensuite refroidies et séchées pendant 20 min. avant d'êtreensemencées. Chaque boîte de pétri est partagée de l'extérieur en trois parties (en forme de T) pour faciliter l'ensemencement. Une stérilisation de l'anse de platine à la chaleur est effectuée avant le prélèvement de chaque souche bactérienne et après chaque opération d'ensemencement. L'ensemencement se fait en étalant sur la surface de la gélose nutritive, la souche bactérienne sélectionnée. Les boîtes de pétri sont fermées après chaque opération puis renversées et mises en

incubation dans un étuve à 37°C /24 h. Après cette période d'incubation, les boites sont retirées et les cultures pures et jeunes serviront à la préparation des suspensions bactériennes.

#### **4-6.3.3. Préparation des suspensions bactériennes (*Préparation de l'inoculum*)**

À partir de la culture jeune préparée, cinq à six colonies de souches bactériennes sont prélevées, grâce à une anse de platine stérile. Ces colonies sont dissociées dans un tube à essai stérile avec 10 ml d'eau physiologique stérile (une suspension en solution saline stérile (0,9% : p/v NaCl). La suspension ajustée devra ainsi contenir approximativement  $10^8$  CFU/ml (colony forming units/ml) équivalent à un témoin de 0,5 McFarland ou à une DO de 0,8 à 0,10 lue à 620 nm (Andrew, 2009). Il est à signaler que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au delà de 30 minutes au risque d'une augmentation de la densité de l'inoculum à cause de la croissance bactérienne.

#### **4-6.3.4. Ensemencement sur des boîtes de pétri**

L'ensemencement est réalisé selon la technique du NCCLS (2002). Le milieu de Mueller-Hinton est coulé dans des boites de pétri (4 mm d'épaisseur). Les boites sont refroidies et séchées à température ambiante puis sontensemencées à partir des suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillons stériles ; l'écouvillon est imbibé de la suspension bactérienne puis essoré contre la paroi interne du tube à essai. L'ensemencement se fait par des stries serrées, de haut en bas et l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose. Après 15 min, des puits de 6mm sont creusés dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Ensuite, 50 µl de chaque dilution de différentes variétés de miel préparées dans l'eau distillée stérile sont versées dans le puits.

En parallèle 14 différents antibiotiques sont utilisés comme contrôle positif, l'eau distillée stérile est utilisé comme contrôle négatif. Une boîte de pétriensemencée par la suspension bactérienne a été prise comme témoin de croissance bactérienne. Tous les tests ont été effectués en triplicata. À la fin, les boites de pétri ont été maintenues à 4C° pendant deux heures afin que le produit testé (le miel) se répande et diffuse dans la gélose.

#### **4-6.3.5. Incubation et lecture de résultats**

Les boîtes de pétriensemencées sont incubées à l'étuve à 37°C/24h. Après avoir retiré les boites de l'étuve, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en millimètre de la zone d'inhibition autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur des boites fermées (Dahham et al., 2010).

#### 4-6.4. Détermination de la CMI et CMB par microméthode

Les travaux sur microplaque permettent d'étudier l'impact de différentes concentrations de miel sur différentes souches de bactéries afin de déterminer la concentration minimale efficace nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne. Pour évaluer la capacité antibactérienne des miels, nous avons utilisé la microméthode d'Anonyme (1977) où l'application respectivement de différentes concentrations de miel réalisées dans le bouillon BHI (Brain Heart Infusion): 2,5, 5, 10, 15, 20, 40, 50, 80 et 100% ; p/v permettent de déterminer la concentration minimale qui inhibe la croissance bactérienne et qui correspondent à l'inhibition respective des bactéries vis-à-vis les dilutions de chaque variété de miel.

Sur la plaque de microtitration de 96 puits et dans chaque puits, 50  $\mu$ L de la suspension bactérienne préparée à une concentration de  $10^8$  bactéries par mL (0,5 MacFarlan) ont été ajoutés à 150 $\mu$ L de miel à des concentrations finales de 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20%, 40%, 50%, 80% et 100% ; p/v réalisées dans le bouillon BHI (figure 32). Le milieu de culture BHI seul a été utilisé comme contrôle négatif avec un contrôle de croissance (le milieu de culture BHI plus la suspension bactérienne). Aussi un contrôle positif (un antibiotique) a été utilisé dans notre essai sur les miels. L'incubation des plaques de microtitration a été effectuée dans un incubateur (THERMOSTAR BMG) à 37°C/24h avec une vitesse d'agitation de 300 rpm.

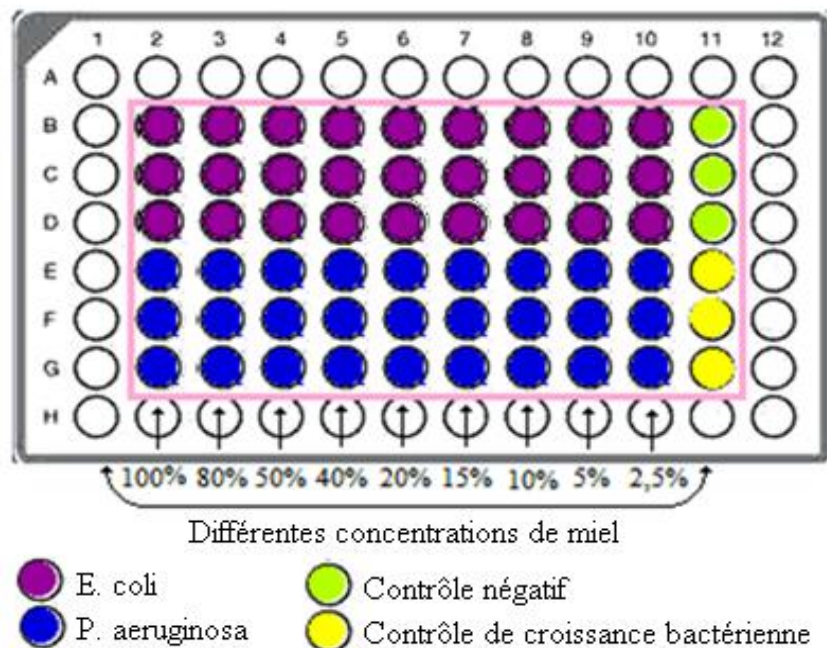


Figure 32 : Distribution expérimentale de la microplaque pour chaque miel testé pour la détermination de la CMI



Le test de capacité bactériostatique ou bactéricide est considéré comme positif quand de suspension de bactéries placée en solution de bouillon et incubé à 37°C/24h ne se développe pas en présence d'une concentration de miel dans le milieu. La solution de BHI se trouble en cas de croissance bactérienne alors qu'elle reste limpide si les bactéries sont éliminées en présence de miel.

La lecture des résultats de la CMI est réalisée par un lecteur de microplaques à 96 puits (TECAN SUNRISE) à 620 nm. Cependant, une lecture à l'œil nu permet de déterminer la CMI visuelle qui correspond à la concentration dans le puits au niveau duquel il n'y a pas de croissance bactérienne visible après 24h d'incubation à 37° (*figure 33*). Pour déterminer la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), une aliquote est prélevée à partir de cultures au niveau des puits ne présentant pas de turbidité visible (*figure 33 et figure 34*), et ensemencée sur des milieux de gélose nutritif GN et incubée pendant 24h à 37°C. La détermination des valeurs de CMB a été réalisée en triplicata. Le rapport CMB/CMI a également été calculé pour mettre en évidence la nature de l'effet antibactérien des miels testés. Lorsque le rapport est inférieur à 4, le miel est considéré comme un miel à effet bactéricide et lorsque le ratio est supérieur à 4, elle est considérée comme un miel à effet bactériostatique (Lakhdari, 2015).



**Figure 33: Plaque de microtitration après incubation à 37°C/24h (photos pris au laboratoire d'immunologie à la faculté de science de la nature et de vie de Sidi Bel Abbés)**

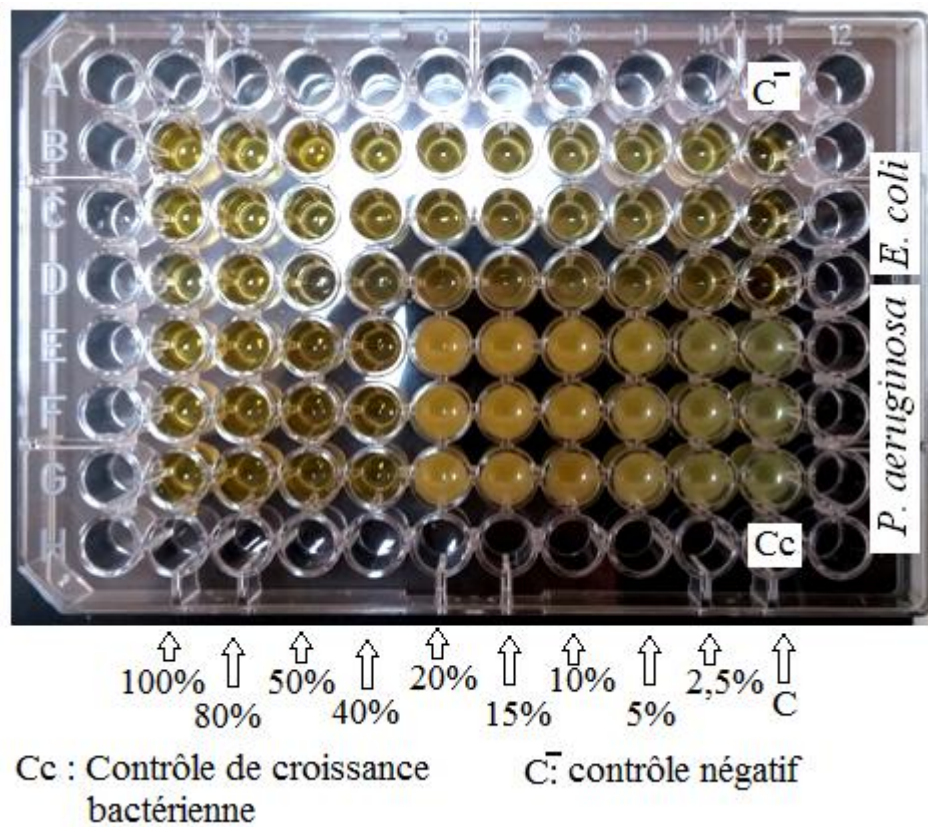


Figure 34: Détermination de la CMI sur boîte de pétri à partir de plaque de microtitration [CMI=40 %]

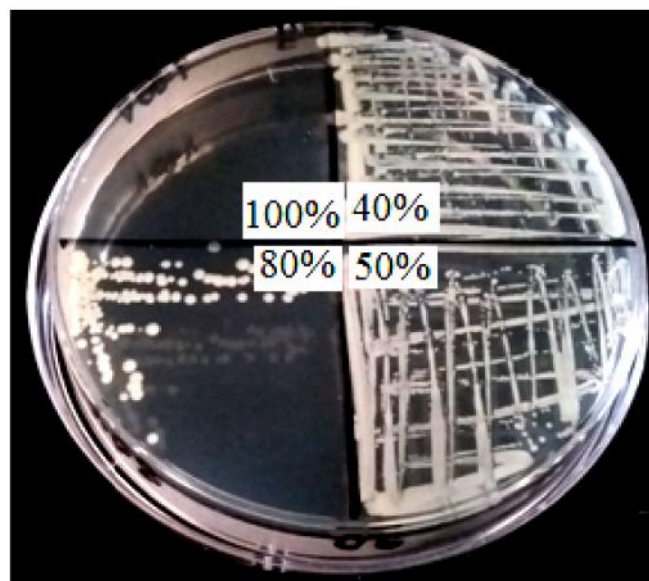


Figure 35: Détermination de la CMB de miel N°06 devant la souche *Enterobacter cloacae* sur boîte de pétri à partir de plaque de microtitration [CMB=100 %]

#### **4-7. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes et leur erreur standard ( $X \pm ES$ ). L'analyse statistique des données est conduite en utilisant le logiciel Microsoft Excel version 7.0. L'analyse statistique des données des différents groupes de souris est réalisée par le test de Student « t », ce test statistique paramétrique est adapté à une analyse comparative entre les moyennes des groupes expérimentaux et celle du groupe témoin. Dans tous les cas, une valeur de  $p < 0.05$  a été considérée comme significative.



# Résultats et Discussion



## Résultats et Discussion

### 1. Etude physicochimiques du miel

#### 1.1. La conductivité électrique

Les quatre échantillons de miels étudiés présentent une conductivité électrique qui varie de 0,413 à 1,33 ms/cm avec une moyenne de  $0,675 \pm 0,296$  (figure 36).

Ces valeurs correspondent aux normes préconisées par [Gonnet \(1982\)](#), qui indique que la variation de la CE est entre 0,1 et 1,5 ms/cm.

La conductivité électrique représente un bon critère pour la détermination de l'origine botanique du miel ([Bogdanov et al. 2004](#)). Il apporte une indication précieuse dans la définition d'une appellation. La (figure 36) montre que tous les échantillons étudiés sont des miels de nectar à l'exception des échantillons N°03 et N°05, car la conductivité des miels de miellat est supérieure à 0,8 ms/cm et celle de miels de nectar est inférieure à cette valeur (0,8 ms/cm) à l'exception de quelques un. Parmi eux par exemple : le miel d'*Eucalyptus* ([Bogdanov et al., 2007](#)).

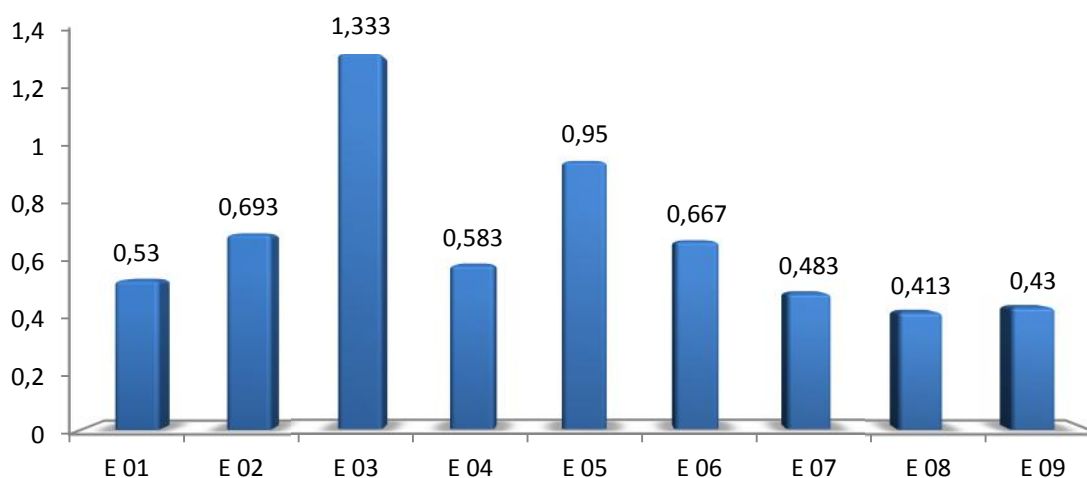


Figure 36: La conductivité électrique (en ms/cm) des échantillons.

En général, les miellats et certains miels de fleurs très colorés conduisent beaucoup mieux le courant que les miels des fleurs les plus clairs.

L'échantillon N°03 qui est la plus colorée parmi nos échantillons et la plus riche en grains de pollen comme le montre les analyses polliniques, présente une *CE* un peu élevée 1,333 ms/cm donc conduit mieux le courant ; quant le reste des échantillons les plus clairs.

Selon [Gonnet \(1982\)](#), les miels foncés sont plus riches en matière minérale ionisable, donc bons conducteurs de courant. [Louveaux \(1976\)](#), affirme que les sels sont apportés par le pollen, par le nectar des fleurs ou les miellats.

### 1.2. La densité

La densité des échantillons étudiés varie de 1,34 à 1,5 avec une moyenne de  $1,439 \pm 0,054$  (*figure 37*). Ces résultats sont conformes aux normes préconisés par l'Association Française de Normalisation et qui sont de 1,39 à 1,52.

L'exception a été faite par l'échantillon N°02 qui présente la valeur la plus faible soit 1,34. Ceci peut être expliqué par sa teneur en eau élevée (17,8%). Selon [Darigol \(1979\)](#). Un miel récolté prématurément, moins mûr aura une densité plus faible. [Louveaux \(1985\)](#), ajoute que les variations de la densité des miels proviennent surtout des variations de la teneur en eau. En général, plus un miel est riche en eau et moins il est dense et réciproquement.

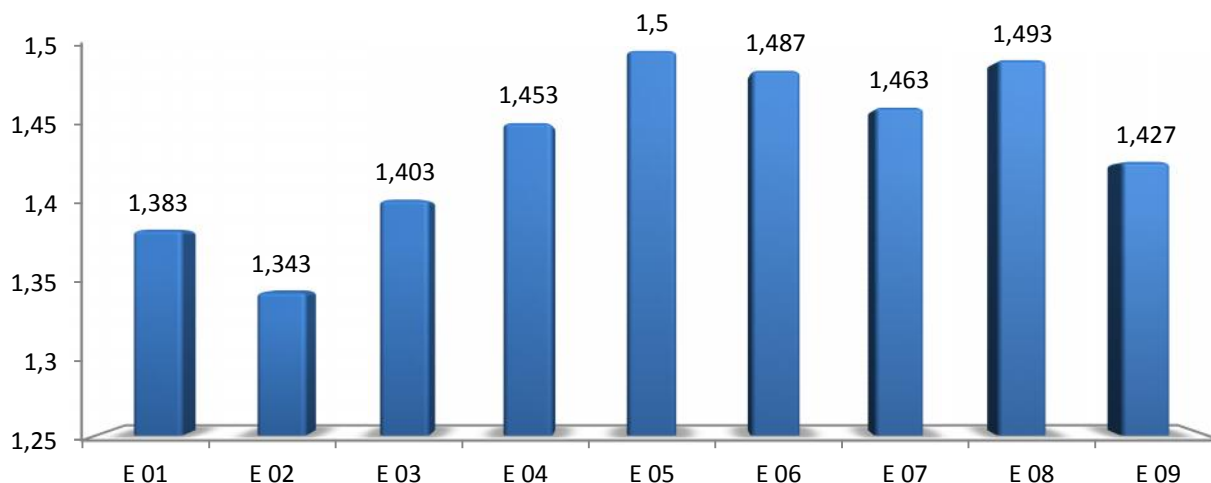


Figure 37: La densité des échantillons

### 1.3. Le pH

Le pH de nos échantillons oscille entre 4,13 et 5,023 avec une moyenne de  $4,457 \pm 0,34$  (*figure 38*). Nos résultats sont en accord avec ceux donnés par [White et Louveaux \(1962\)](#), qui rapportent que le pH du miel varie de 3,42 à 6,10.

Toutefois, la variabilité du pH des miels serait due à la flore butinée, aux sécrétions salivaires de l'abeille et aux processus enzymatiques et fermentatifs pendant la transformation de la matière première (Louveaux, 1968a).

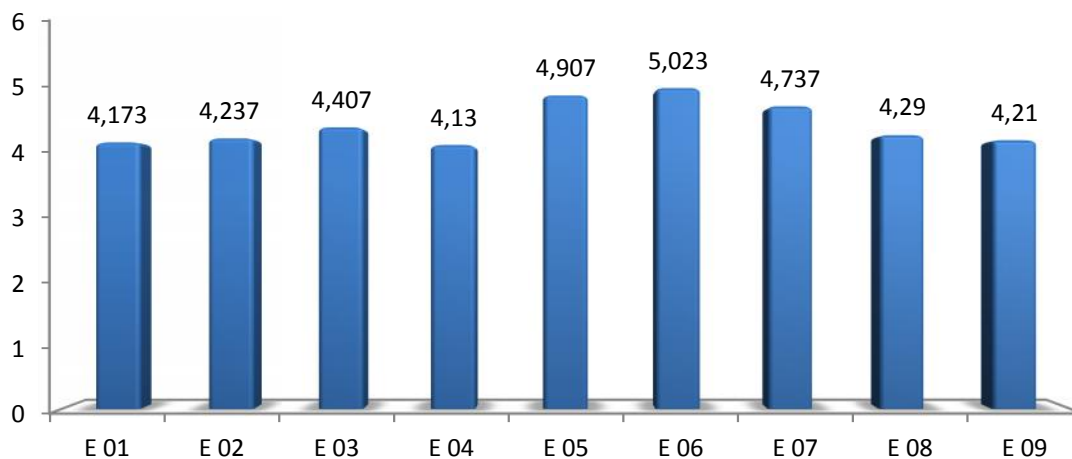


Figure 38: Le pH des échantillons.

Le pH est une mesure qui permet la détermination de l'origine florale du miel ; les miels issus de nectars ont un pH compris entre 3,5 et 4,5 par contre ceux provenant des miellats sont compris entre 5 et 5,5 (Gonnet, 1986). Les valeurs intermédiaires correspondent souvent à des mélanges de nectar et de miellat.

Nous remarquons que tous les échantillons ont un pH n'excédant pas 4,5 ; ce sont donc des miels issus de nectars, c'est-à-dire des fleurs. A l'exception des miels E05, E06 et E07 qui sont considérés alors comme des miels de miellat ou des mélanges de nectar et de miellat.

#### 1.4. La teneur en eau

La teneur en eau des miels étudiés varie de 14,067 à 17,867 % avec une moyenne de  $16,22 \pm 1,215$  (figure 39).

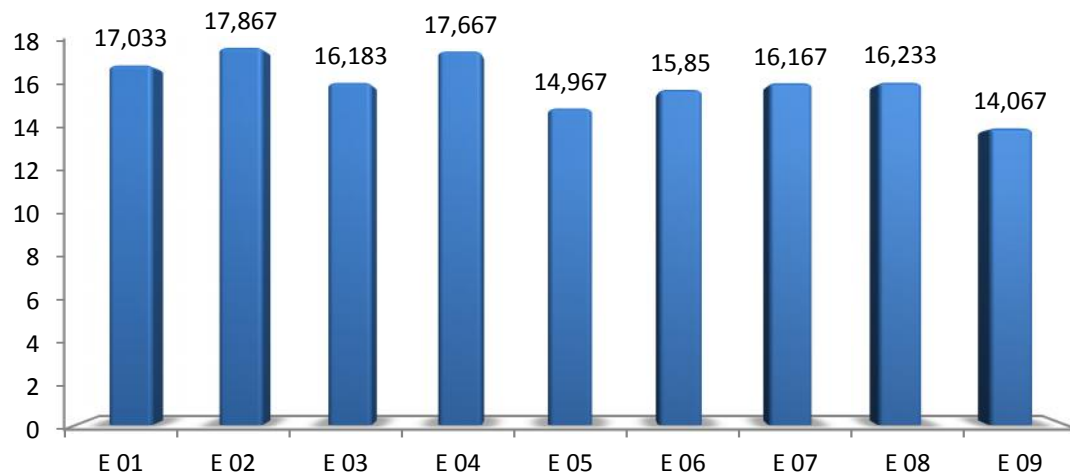


Figure 39: La teneur en eau (%) des échantillons.

Ces valeurs se situent bien dans l'intervalle préconisé par le *Codex Alimentarius*, 1993, et qui ne dépasse pas 21% en général.

La teneur en eau est une donnée très importante à connaître, car elle conditionne la qualité du miel. En effet, seuls les miels avec une teneur en eau inférieure à 17% sont stables lors de la conservation et ne risquent pas de fermenter (Bogdanov S. et al., 2006). Il faut noter que certains miels de Bruyères peuvent contenir jusqu'à 22-25% d'eau (Hoyet C., 2005).

Le miel est une solution aqueuse; or les microorganismes ont besoin d'eau pour se développer. Une teneur trop importante d'eau dans le miel constitue un environnement favorable à la prolifération de ces microorganismes: il se produit alors un phénomène de fermentation (Hoyet C., 2005).

Les valeurs enregistrées de nos miels n'excèdent pas les normes excepté les échantillons N°02 et N04, qui présentent des teneurs en eau légèrement élevées, soit 17,667 et 17,867 respectivement. Ceci pourra être expliqué par :

- Une récolte précoce de ce miel, c'est-à-dire avant sa maturation (Cailla, 1927 et Prost, 1972).

- Une extraction du miel dans un milieu assez humide, ce qui a entraîné une absorption d'humidité. Selon Bruneau (2005), le miel a la capacité d'absorber l'humidité de l'air lorsqu'elle est supérieure à 55%. Ce qui aboutira à une fermentation rapide et très souvent il subira une cristallisation défectueuse rendant le produit instable et entraînant des difficultés à la conservation (Gonnet, 1993).

➤ Des conditions dans les quelles ce miel est élaboré, récolté, transformé et entreposé dans la ruche par les abeilles. [Gonnet, \(1993\)](#), signale qu'une humidité relativement élevée pendant la récolte va conduire à une déshumidification difficile du nectar par l'abeille, donc production d'un miel riche en eau, instable sur le plan physique et biologique et susceptible de se dégrader rapidement.

### 1.5. L'acidité

L'acidité totale de nos échantillons se situe entre 9,5 et 38,5 meq/kg avec une moyenne de  $24,33 \pm 9,46$  (*figure 40*), ces valeurs sont dans les normes préconisées par [White et al. \(1962\)](#) et qui sont de 8,68 à 59,40 meq/kg.

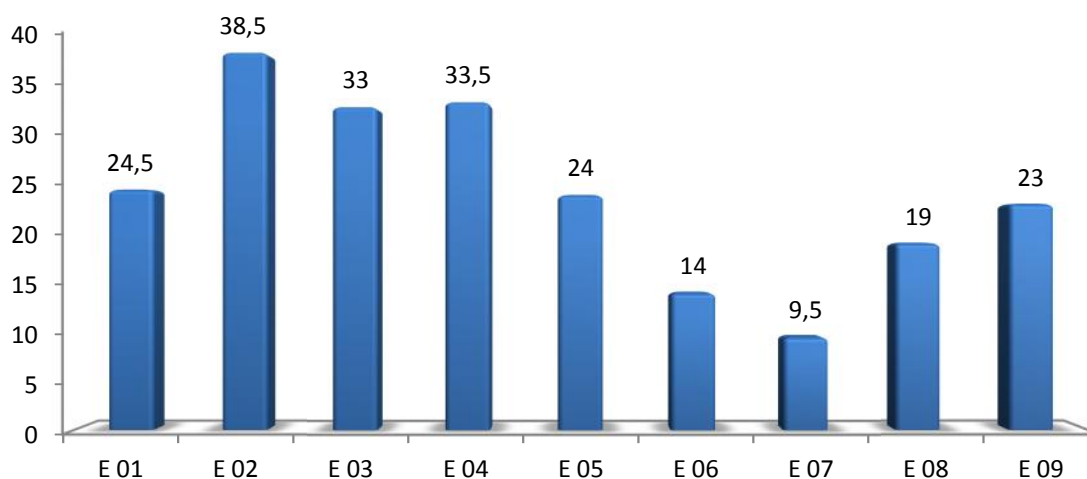


Figure 40: L'acidité des échantillons

L'acidité est un critère de qualité important, elle donne des indications fort importantes de l'état du miel ([Gonnet, 1992](#)).

Selon [Becker et Schweitzer \(2001\)](#), [Khenfer et Fattal \(2001\)](#), les miels sont naturellement des solutions acides, mais aussi la fermentation et le vieillissement augmente l'acidité.

La présence de certains acides dans ces miels est probablement due aux nectars ou miellats, mais leur origine principale est à rechercher dans les sécrétions salivaires de l'abeille et dans les processus enzymatiques et fermentatifs ([Louveaux, 1968a](#)).

### 1.6. L'HMF (hydroxyméthylfurfural)

L'HMF constitue un excellent « témoin de fraîcheur » du miel, c'est-à-dire témoin de son âge et de son antécédent technologique (Makhloufi, 2007). Parce qu'il est absent dans les miels frais et tend à augmenter au cours du traitement et/ou le vieillissement du produit. Plusieurs facteurs influent sur les niveaux de HMF, tels que la température et la durée du chauffage, les conditions de stockage, le pH et la source florale, ce qui fournit une indication de surchauffe et de stockage dans de mauvaises conditions (Fallico, B. *et al.*, 2006) et de ce point de vue la plupart des échantillons de miels analysés sont frais. L'analyse de HMF par HPLC de nos échantillons a révélé que tous avaient des niveaux inférieurs aux limites HMF (40 mg / kg) proposée par la Commission européenne du miel (Commission Internationale du Miel, 2009). On note des valeurs d'HMF varient entre 0,07 et 4,178 mg/kg avec une moyenne de  $1,359 \pm 1,544$  mg/kg (figure 41).

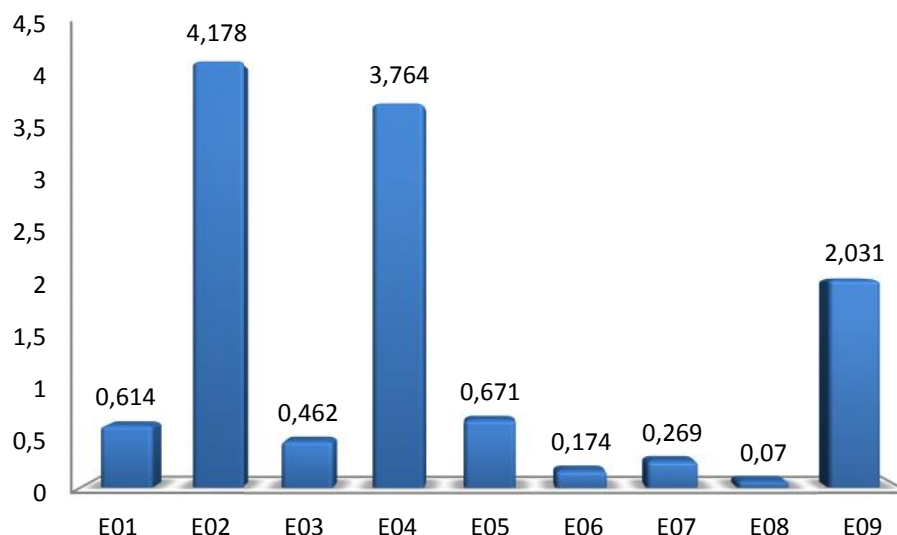


Figure 41: La teneur en HMF des échantillons.

Ce taux d'HMF toléré (40 mg/kg) peut être atteint ou dépassé Selon Gonnet (1992) dans trois cas :

1. Adjonction des sucres intervertis par voie chimique ;
2. Chauffage exagéré et prolongé du miel ;
3. Stockage de longue durée pratiqué sans précautions particulières à température ambiante.

Bogdanov S. *et al.* (2001) ajoute que la teneur en HMF d'un miel est pratiquement nulle au moment de la récolte et elle augmente progressivement, lentement tout d'abord pour

s'accélérer par la suite. Les problèmes de vieillissement du miel (naturel ou accéléré par chauffage) s'accompagnent inexorablement de la formation d'HMF. Donc plus il y a d'HMF dans un miel, plus sa qualité originale est dépréciée (Gonnet, 1991). La recherche et le dosage de l'HMF permettent de situer le niveau de fraîcheur de l'aliment. Le taux d'HMF doit rester très bas pour assurer une garantie de qualité et une preuve de bonne conservation du produit (Gonnet, 1993).

### 1.7. La teneur en cendres

La teneur en matières minérales des miels expérimentaux est faible, elle varie de 0,026 à 0,079% avec une moyenne de  $0,043 \pm 0,018$  (figure 42).

Selon White et Louveaux (1962), la teneur en sels minéraux du miel s'étend de 0,02 à 1,028%. Nos échantillons sont conformes à ces normes.

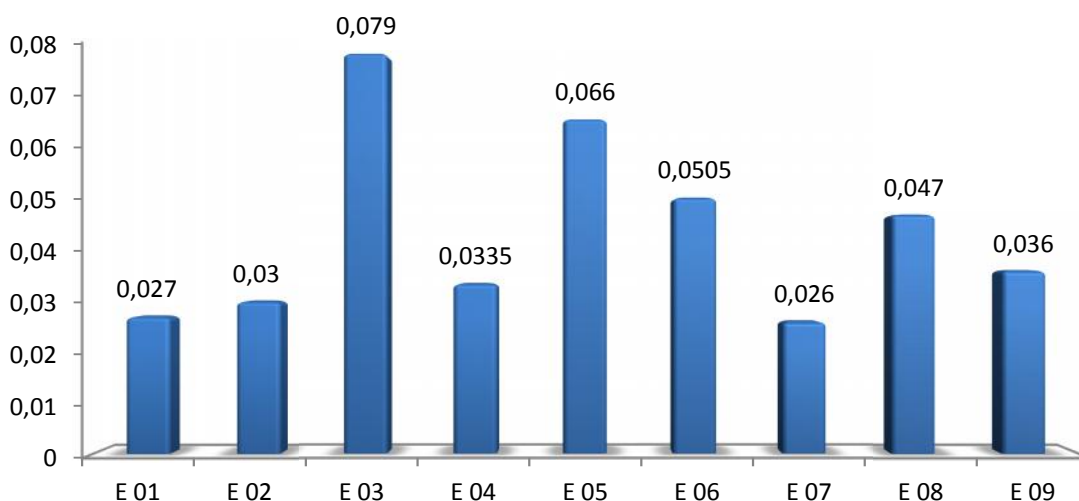


Figure 42: La teneur en cendre (en %) des échantillons.

D'après Bogdanov et al. (1997), la matière minérale détermine l'origine botanique du miel ; les miels issus des nectars ont une teneur en matière minérales ne dépassant pas 0,6%, ce qui correspond à la totalité des échantillons analysés (figure 42). Tandis que celles des miels des miellats ou mélanges de miel de nectar et de miellat doivent être inférieurs à 1,2%.

White et al. (1962) ont confirmé l'existence d'une relation entre la couleur des miels et leur teneur en cendres. D'une façon générale, les miels clairs sont nettement moins riches en cendres que les miels foncés (Louveaux, 1968a). L'échantillon N°3 visiblement le plus



foncé a la teneur en matières minérales la plus élevée (soit 0,079%). Tandis que l'échantillon N°07 qu'est le plus clair se montre le plus pauvre en matières minérales.

### 1.8. La matière sèche

La teneur en matière sèche des miels varie de 82,2 à 86% avec une moyenne de  $83,92 \pm 1,10$ . La (figure 43) montre que la variabilité de la teneur en matière sèche des échantillons étudiés dépend de la teneur en eau du miel.

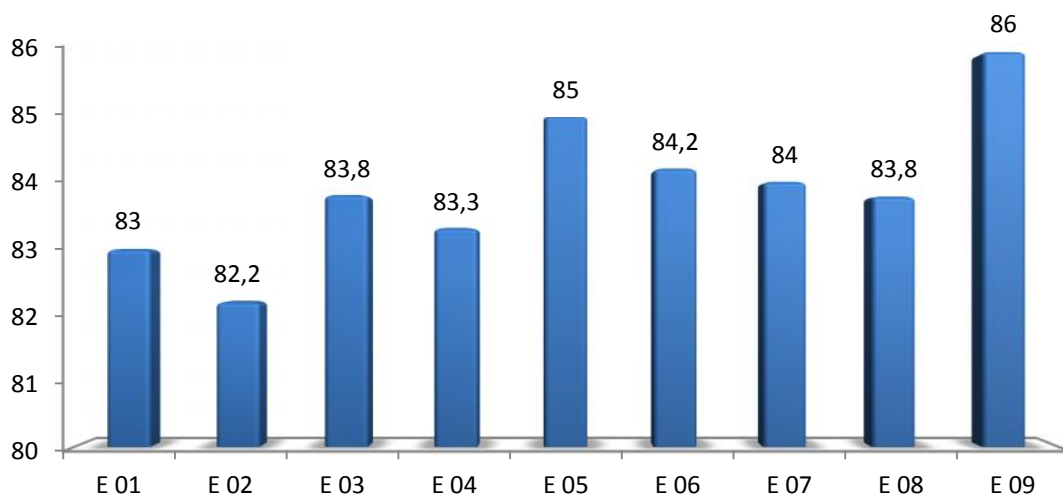


Figure 43: La teneur en matière sèche (en %) des échantillons.

Selon [Makhloufi et al. \(2010\)](#), la variation des paramètres (densité, indice de réfraction et le taux de matière sèche) est en relation directe avec la teneur en eau.

### 1.9. La teneur en sucres

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel. Il s'agit en grande partie de monosaccharides (glucose et fructose), du saccharose, du maltose, et d'autres sucres présents à l'état de traces (erlose, mélézitose, isornaltose, nigérose, turanose, maltulose...) La présence de glucose et de fructose est le résultat de l'action d'une enzyme sur le saccharose: l'invertase. La présence des autres sucres semble dépendre des plantes qui ont été butinées ([Hoyet C., 2005](#)).

Dans cette étude, quatre sucres sont identifiés et quantifiés, dont deux monosaccharides (fructose et glucose) et deux disaccharides (saccharose, maltose) (figure 44). Les résultats obtenus confirment que les deux sucres majeurs de miel (fructose et glucose) sont les principaux sucres dans tous les échantillons de miel. Le fructose est le principal sucre dans les échantillons de miel suivi par le glucose, puis le saccharose et le maltose avec des

valeurs inférieures. En réalité, la composition des sucres de miel dépend fortement de type de fleurs visitées par les abeilles, ainsi que la région de butinage et les conditions climatiques (Ouchemoukh S. et al., 2010). Le fructose est toujours le sucre le plus important quantitativement ; sa teneur varie de 26,533 à 40,212% avec une moyenne de  $31,59\% \pm 4,454$  suivi par le glucose avec une teneur variée de 20,025 à 25,98% des sucres de miel avec une moyenne de  $23,07\% \pm 1,834$ . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ouchemoukh S. et al., 2010; Makhloufi C. et al., 2010 sur des miels Algériens. Le contenu de la somme de ces deux sucres est en général supérieur à 60% ; une limite fixée pour les miels de nectar ce qui correspond aux échantillons T03 et T08 des miels analysés. Le reste des échantillons présente des valeurs proche mais inférieures à cette limite ; ces miels sont considérés alors comme des miels totalement ou partiellement dérivé de miellat. La quantité de saccharose dans tous les échantillons de miel varie entre 0,418 et 2,741% avec une moyenne de  $1,40\% \pm 0,75$ ; aucun des échantillons dépassaient la limite supérieure fixée pour le saccharose par la directive communautaire européenne (Conseil de l'Union européen, 2002). Ces résultats confirment que ces miels sont à un stade avancé de la maturation et sont authentiques parce que le saccharose est le sucre le plus important d'un point de vue législatif (Ouchemoukh S. et al., 2010). Le maltose est présent dans tous les échantillons de miel -sauf l'échantillon N°3-en petites quantités. Il varie entre 0 et 3,744% avec une moyenne de  $1,68\% \pm 1,226$ . Ces résultats sont les mêmes que ceux de (Makhloufi C. et al., 2010 et Ouchemoukh S. et al., 2010) qui ont montré que la teneur en maltose variait entre 0-5,4% et 0,47-3,30% (respectivement) pour les miels algériens multifloraux.

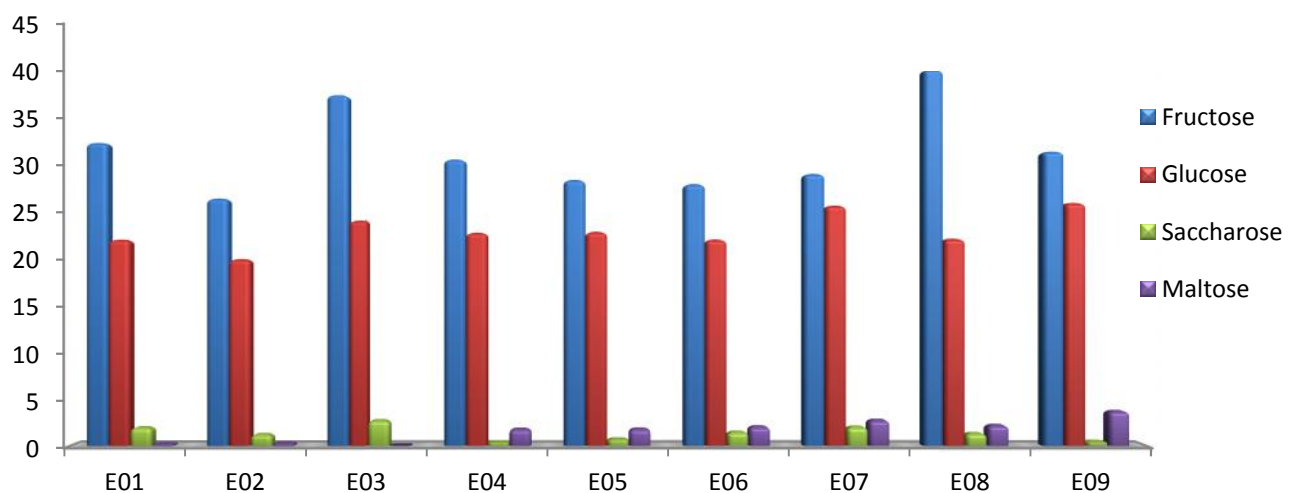


Figure 44: Le contenu en sucres des miels analysés par HPLC.

### 1.10. La teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des échantillons de miel a été déterminée par la méthode de *Folin- Ciocalteu*. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par 100g de miel. Les valeurs des teneurs des polyphénols totaux varient de 24,688 à 74,4 mg EAG/100g de miel. Les résultats sont illustrés au niveau de la figure 45.

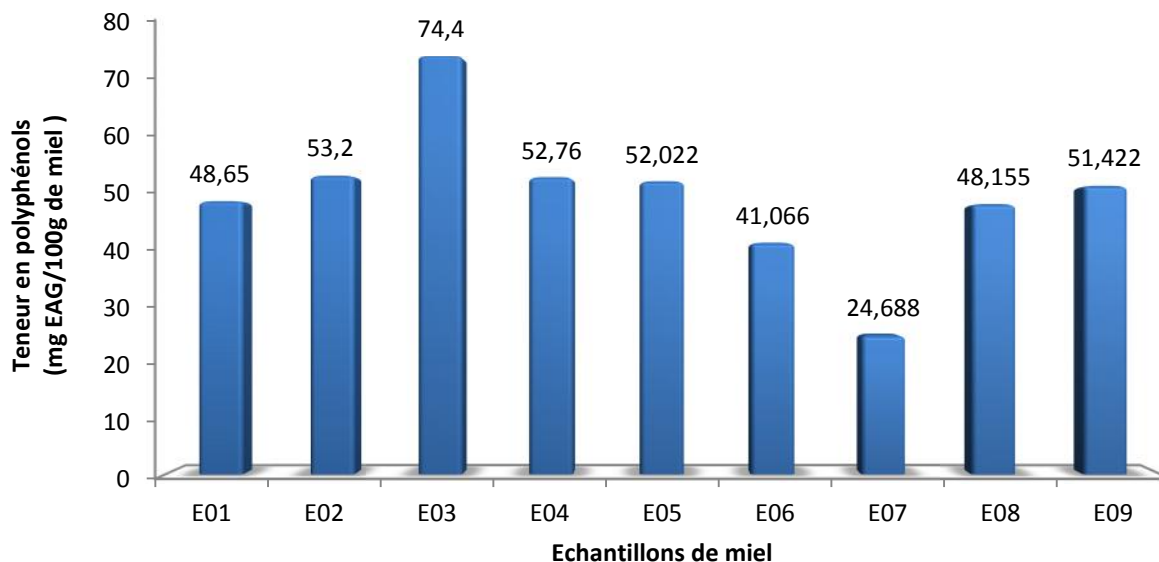


Figure 45: Teneur en polyphénols totaux des miels.

La moyenne de la teneur en polyphénols de nos échantillons est de  $49,60 \pm 12,57$  mg GAE/100 g de miel. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par [Ibrahim Khalil M.D. et al. \(2012\)](#), sur 14 échantillons de miel de Tualang en Malaisie où ils ont trouvé des teneurs en polyphénols varient de 22,83 à 47,25 mg GAE/100g). Et proches avec ceux obtenus par [Buba et al., 2013](#), sur 18 échantillons de miel obtenus de la sous-région au nord-est du Nigeria où la moyenne en polyphénols de ces miel est de  $65.31 \pm 19.50$  mg GAE/100 g de miel. De nombreux autres travaux antérieurs sur la composition de miel en polyphénols ont montré des teneurs variables selon la région et l'origine botanique de miel ;

Les travaux réalisés par [Ibrahim et al. \(2011\)](#) sur le miel des régions tropicales indiquent que la moyenne des composés phénoliques est de  $166,97 \pm 3,12$  mg GAE/Kg. Une autre étude réalisée par [Mohamed et al. \(2010\)](#) qui mentionnent que la moyenne des composés phénoliques totaux du miel de Tualang en Malaisie est de  $251,7 \pm 7,9$  mg GAE/Kg. Le miel de la région du nord-est du Brésil présente des teneurs en polyphénols totaux varient de 10.21 à 108.5 mg GAE/100 g de miel ([Tavares et al., 2011](#)). Aussi des miels de différentes origines florales de la Pologne enregistrent des valeurs en polyphénols allant de 21.7 à 75.3

mg GAE/100 g de miel (Socha et al., 2009), Cependant on assiste à quelques différences entre nos résultats et ceux observées dans le miel du Chili, avec une teneur en composés phénoliques totaux variant de 0.0 to 8.83 mg/100 g de miel (Muñoz and Copaja, 2007). Saric et al. (2012), ont révélé aussi la présence de polyphénols avec des teneurs inférieures avec une gamme de 6,971 à 11,257 mg GAE/ 100g du miel d'acacia. Ainsi que les travaux de Perna et al. en 2012 indiquent des valeurs faibles en polyphénols totaux variant de 10.82 à 14.67 mg GAE/100 g de miel pour 78 échantillons de l'Italie méridionale. Par ailleurs, une autre étude réalisée par Piljac-Zegarac et al. (2009) a montré des valeurs fortement supérieures à celles obtenues dans la région de l'ouest Algérien dont le contenu de polyphénols totaux pour le miel d'Arbousier est de 78,96 mg GAE/100 g et 114,75 mg GAE/100 g pour le miel de miellat. Ainsi l'étude faite par Sant'Ana et al. (2012) qu'ont quantifié le contenu en polyphénols totaux pour 21 miel monofloral de Rio de Janeiro et Minas Gerais en Brazil, et ils ont trouvé des valeurs supérieures entre 61.11 et 175.39 mg GAE/100 g. Une autre étude sur 5 échantillons de miel de Yemen montre des teneurs en polyphénols totaux variant de 56.32 à 246.21 mg EC/100g (Al-Mamary et al., 2002). Tandis que les échantillons de miel en provenance de Slovénie ont des teneurs varient entre 44.8 et 241 mg GAE/100 de miel (Bertoncelj et al., 2007).

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires des plantes. Ils existent sous la forme d'une importante diversité, ils appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, flavonoïdes, etc). Étant donné l'origine végétale de la plupart des miels, ces derniers accumulent de petites quantités de composés phénoliques (de 56 à 500 mg/kg de miel) (Al- Mamary et al., 2002). Les polyphénols présents dans le miel sont principalement des flavonoïdes (quercétine, lutéoline, kaempférol, apigénine, chrysin, galangine), des acides phénoliques et dérivés d'acides phénoliques (acide caféique, acide coumarique, acide ellagique, acide gallique). Les teneurs globales en composés phénoliques peuvent varier de façon appréciable selon l'origine, l'année et l'environnement des ruches, qui se traduisent par des différences marquées de leur couleur. En effet, la principale source de phénols apportés par l'abeille provient des nectars et des sécrétions végétales (Amiot M.J. et al., 1989).

### 1.11. La teneurs en flavonoïdes totaux

La teneur des flavonoïdes totaux des échantillons de miel a été déterminée par la méthode de Woisky et Salatino (1998). Les valeurs sont exprimées en milligramme d'équivalent de catéchines par 100 grammes de miel. Les teneurs en flavonoïdes varient de 11,576 à 15,884 mg EC/100g de miel. Les résultats sont illustrés ci-dessous dans la figure 46.

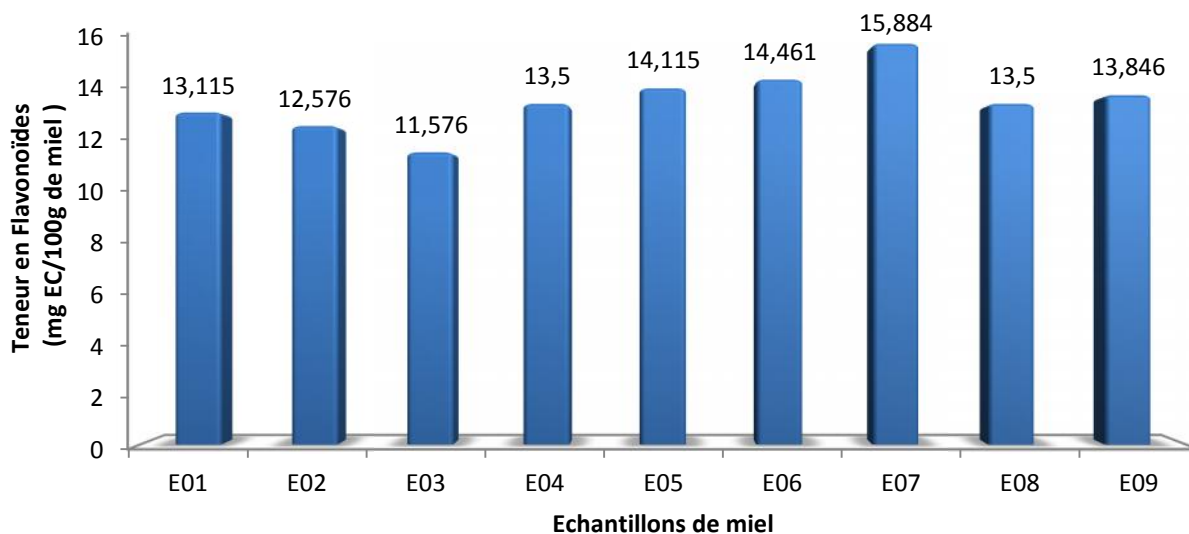


Figure 46 : Teneur en flavonoïdes totaux des miels.

Le contenu en flavonoïdes de neuf miels de la région de l'ouest Algérien est similaires à ceux obtenue par [Saric et al. en 2012](#). Ces derniers déterminent les valeurs initiales de la teneur en flavonoïdes totaux du miel d'Acacia, qui varient de 8,29 à 29,65 mg EQ/100 g. Ainsi que les travaux de [Perna et al. en 2012](#) indiquent des valeurs proches en flavonoïdes totaux variant de 5,09 et 14,05 mg EQ/100 g de miel pour 78 échantillons de l'Italie méridionale. Une étude ultérieure montre que le contenu en flavonoïdes des miels de Chili varie de 0.014 à 13.8 mg EQ/100 g de miel ([Muñoz et Copaja, 2007](#)). Cependant, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par [Ibrahim Khalil M.D. et al. \(2012\)](#), sur des miels de Tualang où les teneurs en flavonoïdes varient de 4,02 à 8,64 mg EQ/100 g de miel. Aussi le contenu en flavonoïdes des miels en Burkina Faso était de 0.17 à 8.35 mg EQ/100 g de miel, Tandis que celle de Rio de Janeiro et Minas Gerais en Brazil varient entre 2.94 et 10.91 mg EQ/100 g de miel ([Pérez-Pérez E. et al., 2013](#)).

Cette variation de la teneur en flavonoïdes dans le miel d'une région à l'autre dans le monde nous laisse supposer que l'environnement de la ruche est un facteur déterminant sur sa composition. Selon [Ibrahim Khalil M.D. et al. \(2012\)](#), les flavonoïdes sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire qui sont des éléments essentiels pour l'arôme et les propriétés antioxydantes du miel. Certains flavonoïdes présents dans le miel, tels que le kaempférol, la quercétine, la lutéoline se retrouvent dans la plupart des échantillons de miel, d'autres comme l'hésperétine et la naringénine ne se trouvent que dans quelques variétés de miel ([Bogdanov et al., 2008](#) ; [Erejuwa et al., 2012](#) ; [Tomás-Barberán et al., 2001](#)); le contenu

en flavonoïdes était plus élevée dans les échantillons produits au cours d'une saison sèche avec des températures élevées (Kenjeric D. et al., 2007) c'est le cas de l'échantillon N°07 de miel de *Jujubier* de la région d'El-Bayad qui enregistre une teneur élevée en flavonoïdes (soit 15,884 mg EC/100g de miel).

La composition du miel est aujourd'hui la plus documentée en particulier pour les composés phénoliques et les flavonoïdes. Ces études détaillent essentiellement des miels dont les caractéristiques florales sont connues. Les composés phénoliques et flavonoïdes contenus dans le miel sont responsables de son odeur. La majorité de ces molécules proviennent de la plante. Cependant, une partie est ajoutée au miel par l'abeille elle-même. Parmi ces molécules, on retrouve les grandes familles de polyphénols et de flavonoïdes. Il s'avère que les miels foncés ou bruns contiennent plus de phénols et moins de flavonoïdes que les miels clairs c'est le cas de l'échantillon N°3 le plus foncé qui représente une teneur élevée en polyphénols soit 74,4 mg EAG/100g de miel et faible en flavonoïdes (11,576 mg EC/100g de miel) par rapport au reste des échantillons. Ainsi, les substances phénoliques interviennent, plus ou moins directement, sur la couleur par l'intermédiaire des flavonoïdes susceptibles de contribuer à la coloration jaune (Harbone et Smith., 1978); parmi les miels étudiés, l'échantillon N°07 répondent à ce cas avec une couleur jaune et une teneur élevée en flavonoïdes soit 15,884 mg EC/100g de miel.

## **2. Etude *in vitro* de l'effet antioxydant de miel (Test de DPPH)**

Ces dernières années, l'intérêt est porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires comme le miel (Sanchez-Moreno C., 2002, Marc Fr. et al., 2004, Huang, D. et al., 2005).

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2\cdot$ ) (Popovici C. et al., 2009).

La valeur d'IC<sub>50</sub> représente la concentration d'inhibiteur (antioxydant) nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres. Afin de déterminer cette valeur pour chaque miel, les courbes de la variation du pouvoir d'inhibition (I%) en fonction de la concentration en miel sont établies dans la figure suivante :

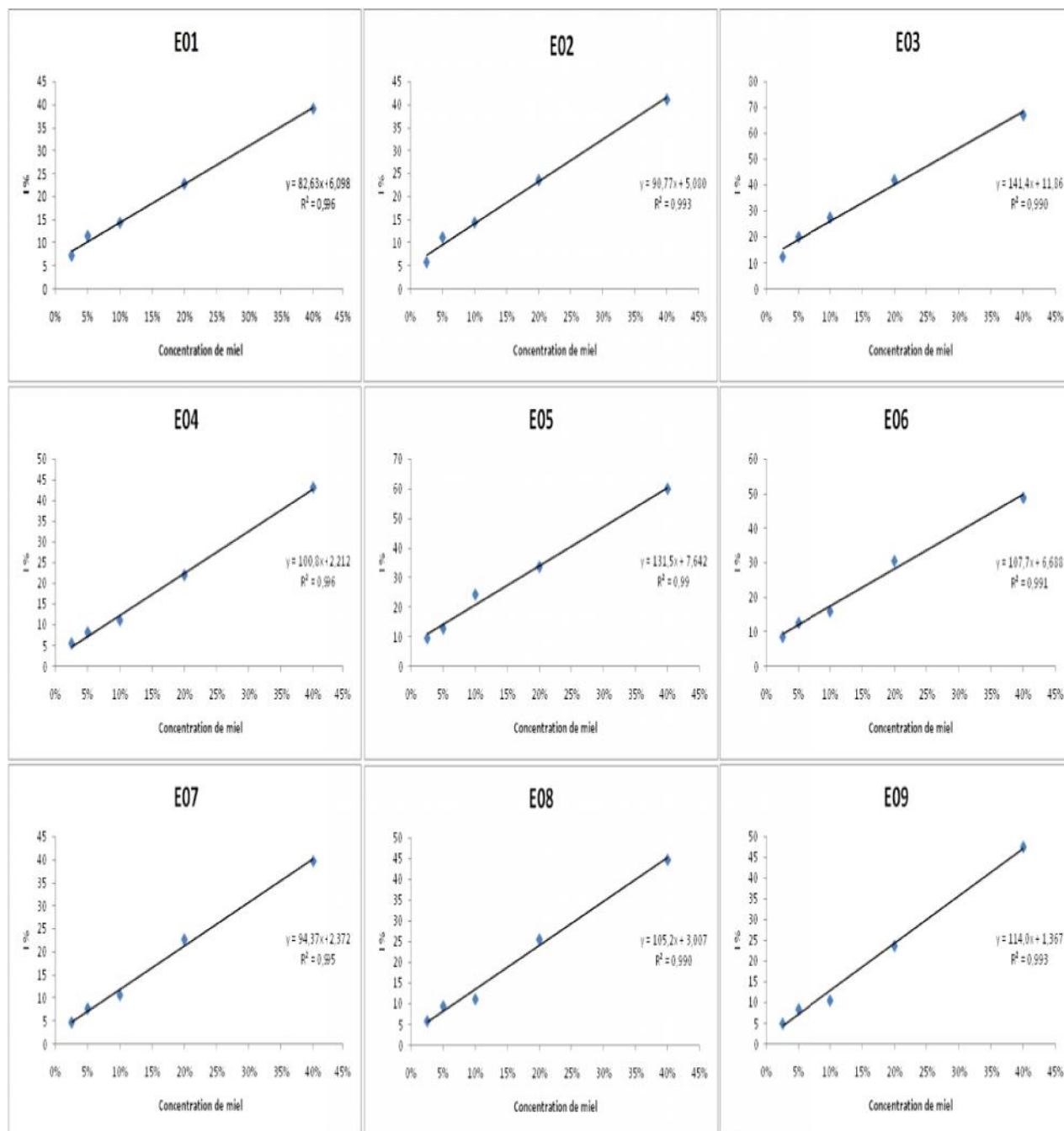


Figure 47 : Courbes représentant l'activité antioxydante des miels (Test DPPH)

La figure 48 regroupe les valeurs d'IC<sub>50</sub> de nos miels calculées à partir des courbes représentant l'activité antioxydante des miels (*Test DPPH*) (figure 47).



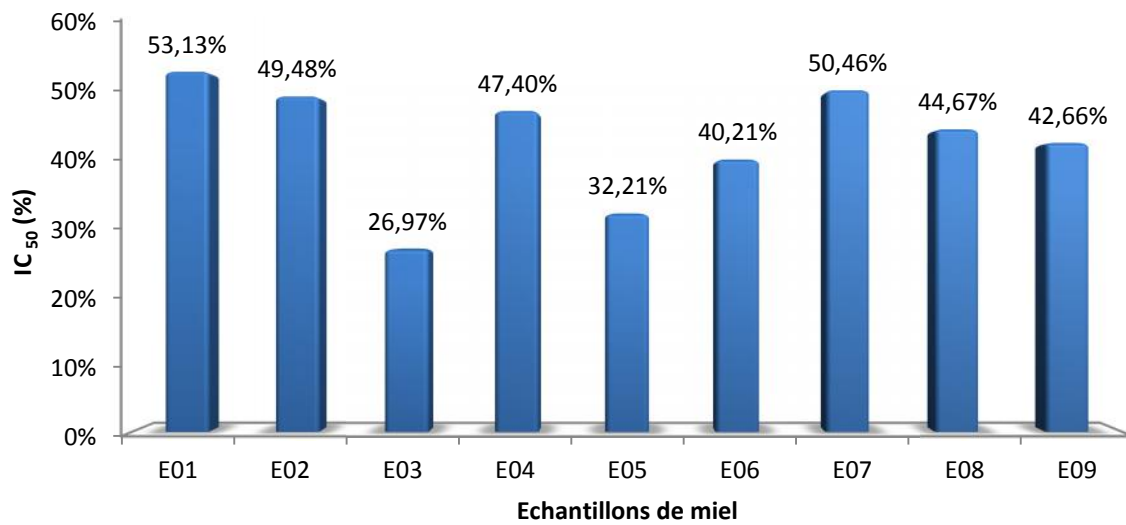


Figure 48 : Valeurs de l'IC<sub>50</sub> pour les différents miels étudiés (Test DPPH).

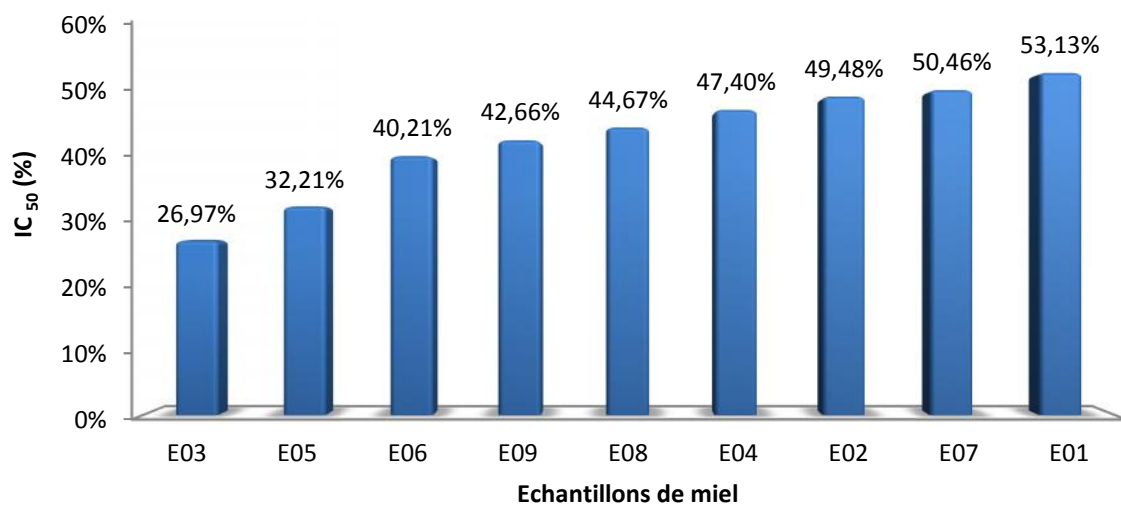


Figure 49 : Classement croissant des miels selon leur IC<sub>50</sub> Valeurs de l'IC<sub>50</sub> (Test DPPH).

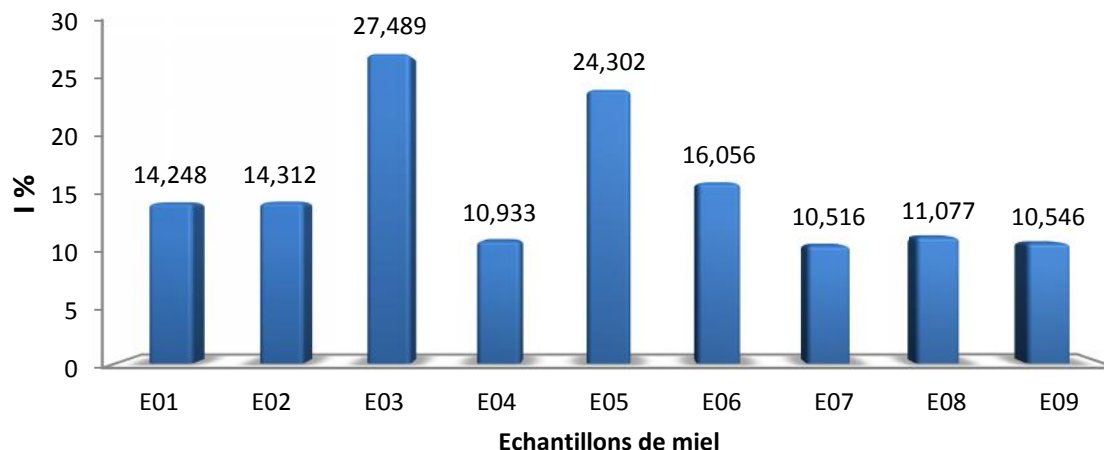
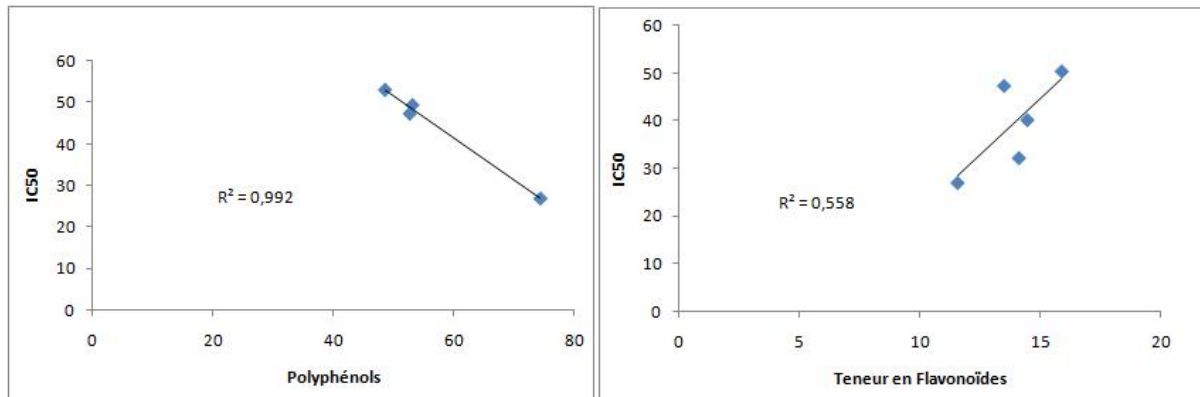


Figure 50: Pourcentage d'inhibition des échantillons de miel (Test DPPH).

D'après les résultats figurés ci-dessus on remarque que l'échantillon N°03 présente une activité antioxydante très élevée par rapport aux autres échantillons correspond à un pourcentage d'inhibition (I%) élevé égale de 27,489% et une valeur d'IC<sub>50</sub> très faible soit (26,97%) en comparaison avec l'acide ascorbique (22.763%) et trolox (36.14%) (Annexe). Alors que les échantillons N°01, N°02, N°04 et N°07 marquent des pourcentages d'inhibition plus bas (14,248%, 14,312%, 10,933% et 10,516% respectivement) avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> plus élevée (53,13%, 49,48%, 47,40% et 50,46% respectivement) ce qui indique qu'ils possèdent une activité antioxydante faible parmi le reste des échantillons de miel étudiés.

Des études menées par [Hodnick et al., \(1988\)](#) ont montré que les flavonoïdes avec plus de groupes hydroxyles ont été les plus facilement oxydés. La différence d'activités des antioxydants dépend principalement de la dissemblance structurelle, le degré d'hydroxylation et la méthylation des composés ([Mayer A.S. et al., 1998](#)). En outre, les données rapportées par [Gazzani et al. \(1998\)](#) indiquent que certains composés phénoliques, comme des antioxydants, peuvent réagir plus vite que d'autres dans les mêmes conditions. Ainsi, la présence de constituants autres que les composés phénoliques tels que les vitamines C, E et caroténoïdes peuvent influencer l'activité antioxydante totale ([Vinson J-A., Hontz B-A. \(1995\)](#) ; [Vinson J-A. et al., 1995](#)).

On a essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs d'IC<sub>50</sub> et les teneurs en polyphénols totaux et les teneurs en flavonoïdes pour le test de DPPH, les graphes avec les coefficients de corrélation sont présentés dans la figure ci-dessous :



**Figure 51 : Corrélation entre les valeurs d'IC<sub>50</sub> (DPPH) des miels et les Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes.**

D'après ces résultats, on remarque qu'il existe une bonne corrélation entre les valeurs d'IC<sub>50</sub> du test DPPH et les teneurs en polyphénols totaux ( $R^2 = 0,992$ ) et même plus importante que celle avec les teneurs en flavonoïdes ( $R^2 = 0,558$ ), ceci peut être expliqué par la présence des molécules antioxydantes actives qui appartiennent aux polyphénols totaux mais autres que les flavonoïdes.

L'activité antioxydante de nos échantillons de miel a été prouvée et elle est en corrélation avec la teneur en polyphénols (*figure 51*). La présence des antioxydants dans le miel y compris à la fois les substances enzymatiques et non enzymatiques a été confirmée ; plus de 150 composés polyphénoliques y compris les flavonoïdes, flavonols, acides phénoliques, catéchines et les dérivés d'acide cinnamique sont identifiés dans le miel. Ce produit contient aussi d'autres substances en quantités faibles comme les minéraux, protéines, vitamines, acides organiques et autres phytochimiques qui contribuent à l'activité antioxydante de miel ([Ibrahim Khalil M.D. et al., 2012](#)). En réalité, les composés dans le miel responsables de son effet antioxydant sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, l'acide ascorbique, catalase, peroxydase, caroténoïdes et les produits de réaction de Maillard ([Gheldof N. et al., 2002](#); [Al-Mamary M. et al., 2002](#) ; [Aljadi A.M. et al., 2004](#)). La quantité de ces composés varie en fonction de l'origine florale et géographique de miel. Cependant, les processus de manipulation et de conservation de miel peuvent influencer sa composition.

Les flavonoïdes sont reconnus par leurs hautes activités pharmacologiques comme piègeurs de radicaux ([Ibrahim Khalil M.D. et al., 2012](#)). Par conséquent, les composés phénoliques présents dans le miel à savoir les flavonoïdes peuvent le rendre une bonne source d'antioxydants à côté de leur effet antibactérien augmentant ainsi le potentiel de son activité thérapeutique. En outre, l'estimation du nombre total de contenus phénoliques et les

activités antioxydantes des miels peuvent également être utilisés comme de bons paramètres pour l'évaluation de leur qualité (Al-Mamary M. *et al.*, 2002).

L'intérêt récent pour ces substances a été stimulé par les avantages potentiels pour la santé découlant de leurs activités antioxydantes et anti-radicalaires contre les maladies coronariennes et le cancer (Saba *et al.*, 2011). Le miel de la région de l'ouest Algérien est caractérisé par des taux élevés en composés phénoliques et en flavonoïdes, ce qui explique leur capacité antioxydante. Il existe une relation étroite entre la concentration en composés phénoliques du miel et l'origine des espèces végétales visitées par l'abeille.

### 3. Recherche des contaminants dans le miel

#### 3.1. Résultats d'analyses des éléments traces métalliques (ETM)

Le miel est un aliment qui apporte de nombreux oligo-éléments qui sont indispensables à la santé de l'homme. Suivant leurs origines florales, les miels présentent des concentrations variables en oligo-éléments ca dépend aussi de différentes saisons et de différentes origines géographiques; ainsi une consommation variée tout au long de l'année assure des apports intéressants en oligo-éléments ; potassium, phosphore, calcium, soufre, magnésium, manganèse, silicium, bore, fer, zinc, cuivre et baryum qui sont retrouvés en plus ou moins grande quantité dans le miel. Ces substances participent au bon fonctionnement de notre organisme (Hoyet C., 2005).

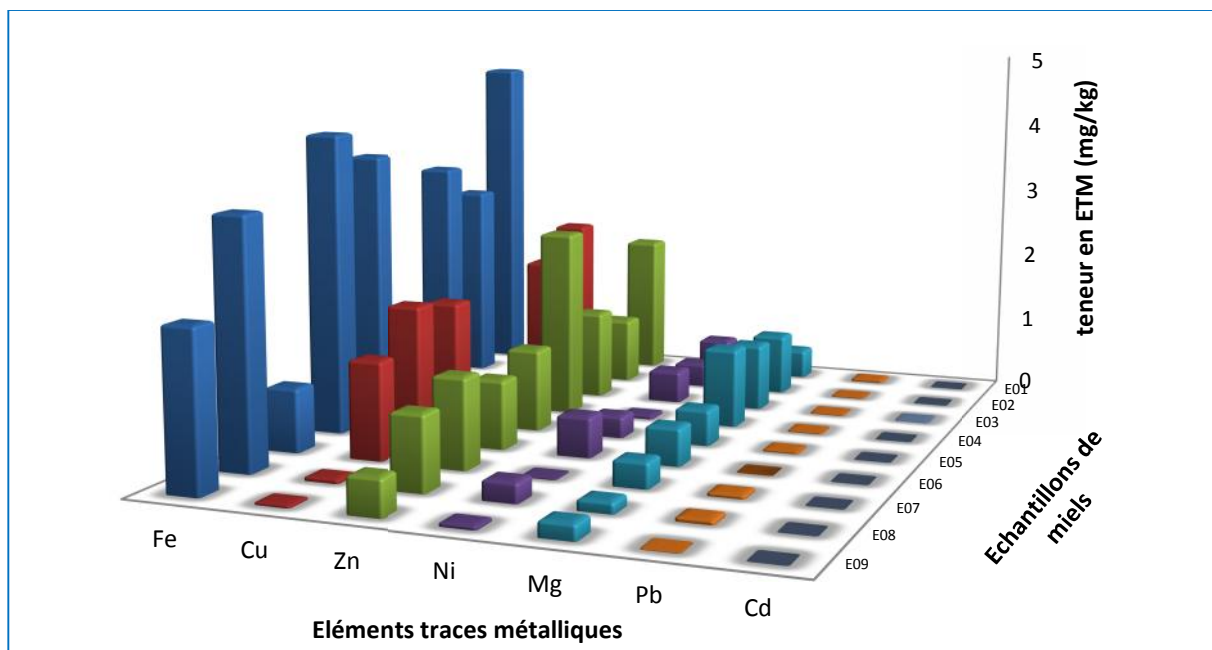


Figure 52: Résultats de dosage des éléments traces métalliques (ETM) par la SAA (mg/kg).

Les teneurs en **fer** dans les miels analysés varient de 0,811 à 4,713 mg/kg avec une moyenne de  $2,888 \pm 1,328$  mg/kg. Les échantillons N°01 et N°06 enregistrent les valeurs les

plus élevées (4,713 mg/kg et 4,16 mg/kg respectivement) suivis par les échantillons N°03, N°05 et N°08 (3,331 mg/kg, 3,743 mg/kg et 3,369 mg/kg respectivement). Ces résultats sont inférieurs à la limite maximale permise dans le miel (15 mg/kg de fer) fixée par le *Codex Alimentarius* et sont proches avec ceux obtenus par [Yaiche Achour H. et Khali M. \(2014\)](#) dans une étude sur cinq échantillons de miel collectés de différentes régions mellifères algériennes où ils ont trouvé des teneurs en fer allant de 1,95 mg/kg à 6,37 mg/kg.

Pour le **cuivre** les résultats trouvés montrent des teneurs minimales de 0,014 mg/kg et maximales de 2,207 mg/kg avec une moyenne de  $1,009 \pm 0,917$  mg/kg. Ces résultats sont en accord avec la norme du *Codex Alimentarius* qui fixe une limite maximale permise dans le miel de 5 mg/kg de cuivre. Ces résultats sont aussi similaires de ceux trouvés par [Yaiche Achour H. et Khali M. \(2014\)](#) avec des valeurs observés pour le cuivre de 2,72 mg/Kg à 3,22 mg/Kg et supérieures par rapport à ceux obtenus avec Différents miels marocains qui enregistrent des teneurs faibles en cuivre soient 0,05 à 1,84 mg/Kg ([Chakir A., 2011](#)).

Les teneurs minimale et maximale en **Zinc** sont respectivement 0,503 mg/kg et 2,608 mg/kg avec une moyenne de  $1,294 \pm 0,614$  mg/kg de miel, se sont inférieures à la limite maximale pour le zinc et qu'est de 5 mg/Kg de miel. Cependant l'étude réalisée par [Yaiche Achour H. et Khali M. \(2014\)](#) indique que les miels étudiés se caractérisent par une richesse en zinc qu'est l'élément prédominant dans les variétés étudiées. Les auteurs attribuaient ce fait à la présence aléatoire de cet élément dans l'environnement, soit en tant que polluants ou comme constituants naturels des fleurs ([Leita L., 1996](#)). De même, le stockage du miel dans des conteneurs galvanisés peut être considéré comme une source de contamination par le zinc ([Bogdanov S., 2003](#)).

Le **nickel** est présent en quantité faible allant de 0,021 à 0,56 mg/Kg avec une moyenne de  $0,285 \pm 0,197$  mg/kg pour l'ensemble des variétés de miels de différentes régions avec une moyenne de 0,285 mg/Kg. L'étude réalisée par [Yaiche Achour H. et Khali M. \(2014\)](#) montre des teneurs similaires faible en nickel avec une moyenne de 0,320 mg/Kg. En général, les concentrations de nickel dans les miels se situent entre 0,3 et 1,3 mg / kg. Ces concentrations peuvent être accidentelle ou la plupart du temps naturel ([Bogdanov S., 2004](#)).

Pour le **magnésium** les résultats trouvés montrent des teneurs minimales de 0,16 mg/kg et maximales de 1,10 mg/kg avec une moyenne de  $0,564 \pm 0,319$  mg/kg. Ces résultats sont très loin de la norme du *Codex Alimentarius* qui fixe une valeur maximale de 25 mg/kg de magnésium dans le miel.

Le **plomb** présent dans les miels analysés en traces allant de 0,00 mg/kg à 0,06 mg/kg avec une moyenne de  $0,028 \pm 0,019$  mg/kg. Tandis que la valeur moyenne du plomb contenue dans les miels algériens analysés par [Yaiche Achour H. et Khali M. \(2014\)](#) est de 0,22 mg/Kg. Nos résultats sont inférieurs à cette valeur. Cependant, Des concentrations largement supérieures ont été trouvées par [Rashed M.N. et Soltan M.E. \(2004\)](#) pour des miels égyptiens: 14; 15,5 et 19 mg/Kg pour le miel d'orange, sesame et trèfle, respectivement. En effet, Il n'existe pas de limites maximales résiduelles spécifiques des éléments toxiques pour le miel, mais des valeurs de 0,1 et 1 mg/Kg ont été proposée par le *Codex Alimentarius* et l'Union Européenne ([Bogdanov S., 2006](#)). En effet, les teneurs en plomb trouvées pour toutes les variétés de miels étudiées sont largement inférieures à la valeur proposée par l'union Européenne.

Législation Européenne et le *Codex Alimentarius* fixe des limites maximales en **cadmium** dans le miel à 0,05 et 0,1 respectivement. Nos résultats montrent une absence totale du cadmium dans les miels analysés à l'exception de l'échantillon N°03 qui présente des traces faibles par rapport aux normes soit 0,019 mg/kg. Cette valeur est la même que celle trouvé par [Yaiche Achour H. et Khali M. \(2014\)](#) où les valeurs de cadmium enregistrés étaient faibles à l'état de trace dans tous les variétés de miels, ils ont varié entre 0,018 et 0,019 mg/kg. Ainsi celles de [Chakiret al. \(2011\)](#), alors que [Rashed et Soltan \(2004\)](#) ont détecté des valeurs de cadmium plus élevées de l'ordre de 0,5 mg/kg pour le miel égyptien.

Les deux principaux métaux lourds sont issus de l'industrie et du trafic routier. Le plomb peut contaminer le nectar ou le miellat par voie aérienne. Tandis que le cadmium peut être transporté par la plante (une infime partie) et atteindre le compartiment nectarifère ([Bogdanov S., 2006](#)). Dans la plupart des miels, on trouve du calcium, du cuivre, du fer, du manganèse, du magnésium, du phosphore, du potassium, du silicium et du sodium. Il y a aussi du chlore et du soufre. Ces matières minérales dépendent du type de sol. Elles sont plus abondantes dans les miels foncés. Le potassium et le calcium représentent les deux plus importants minéraux du miel. Les autres sont présents à l'état de traces ([Laurent O., 2005](#) ; [Domerego et al., 2007](#)). Les taux sont généralement peu élevés, mais ils sont variables selon la région de production du miel. Tandis que la présence de certains métaux comme le Pb et le Cd soulève le problème de la pollution du miel et de l'environnement où sont situés les ruchers. Nos échantillons de miels sont conformes aux normes internationales de miel concernant les éléments traces métalliques et les métaux toxiques comme le Pb et le Cd (*figure 52et Annexe*).

Depuis plusieurs années, des études sont entreprises pour établir un lien entre les différents polluants et le miel, le pollen et les abeilles comme marqueurs de pollution. Un des indicateurs est le plomb. Le Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes (CVFSE/ONIRIS) des Pays de la Loire analyse plusieurs miels provenant de milieux urbains ou ruraux. Il est observé une plus grande contamination en plomb pour les ruchers urbains. Cependant, il est encore difficile de corréliser des concentrations limites avec un seuil de pollution (Nicolay J., 2014).

### 3.2. Recherche de résidus d'antibiotiques « chloramphénicol »

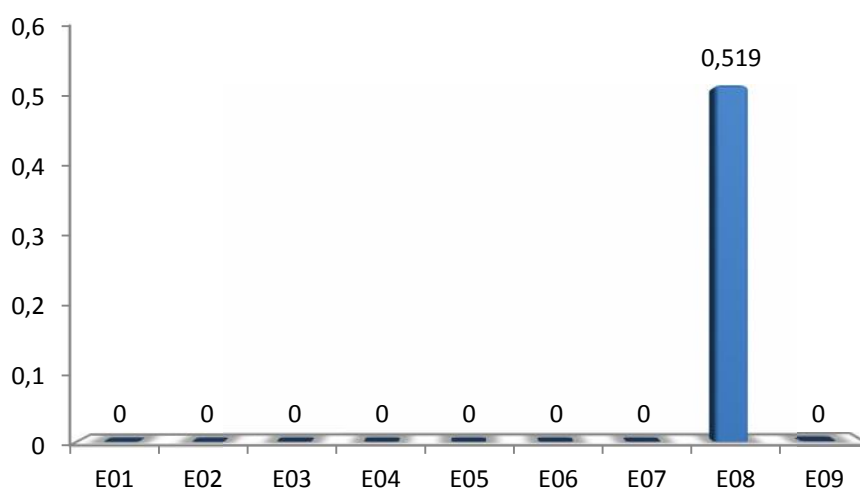


Figure 53: Concentration de résidus de chloramphénicol (ng/mL) dans les neuf échantillons de miel analysés par LC/MS/MS

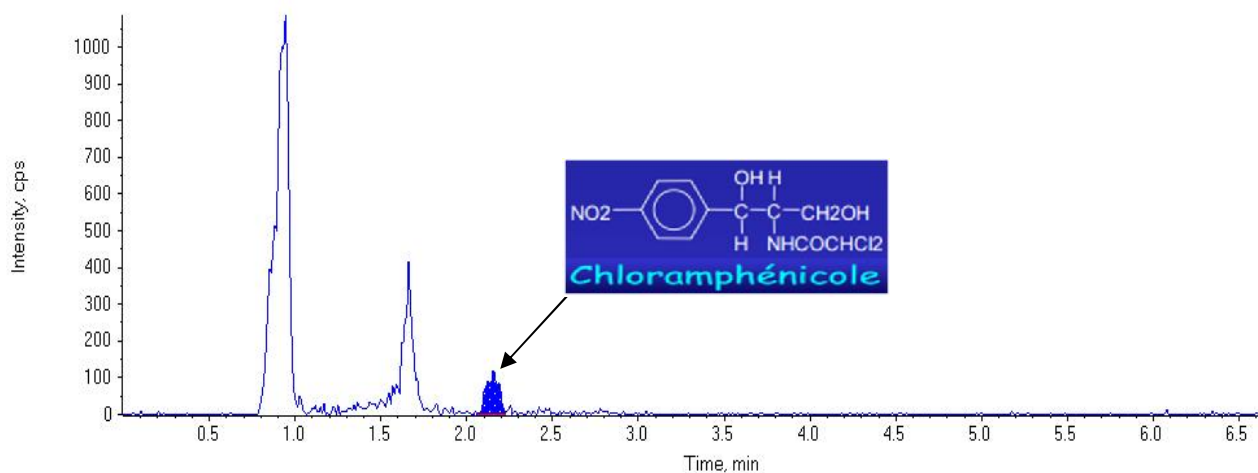


Figure 54: Chromatogramme de dosage de résidus de chloramphénicol dans l'échantillon N°08 par LC/MS/MS



Il est clair à partir de résultats de dosage de chloramphénicol par la chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie de masse (*LC/MS/MS*) qu'un seul échantillon (N°08) parmi neuf miels analysés était non conforme à la norme internationale pour le miel à exporter concernant les antibiotiques, car il est contaminé par des résidus de chloramphénicol. Aucune trace de résidus de cet antibiotique n'a été détectée dans le reste des échantillons de miel. Une raison à cela pourrait être la pratique répandue selon laquelle le miel est collecté à partir de différentes sources, puis mis en commun avant d'être emballé et distribué à la vente.

En générale la concentration de chloramphénicol détectées est faible, mais il peut provoquer un effet cancérigène; Le chloramphénicol a été trouvé pour être potentiellement cancérigène, ce qui en fait une substance inacceptable pour l'utilisation avec les aliments produits par animaux, y compris le miel des abeilles (Sapna Johnson et al., 2010). Il est nécessaire de réglementer et de surveiller le niveau d'antibiotiques dans le miel. Où l'exposition continue à long terme à de faibles concentrations d'antibiotiques pourrait, en temps conduit à la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes ce qui rend leur traitement difficile.

Certains antibiotiques peuvent être légalement utilisés pour traiter les ruches mais de façon restreinte dans l'Union Européenne et plus encore en France. Cependant, de nombreux pays tiers les utilisent couramment et sans limite.

Le chloramphénicol est un médicament antibiotique de large spectre qui a été largement utilisé dans l'agriculture et l'élevage et pour traiter les abeilles infectées par les maladies bactériennes (Botoglou N.A. et Fletouris D.J., 2001). En raison d'un grand nombre d'effets secondaires graves (Par exemple l'anémie aplasique mortelle, syndrome gris, la dépression de la moelle osseuse sévère), l'utilisation de chloramphénicol pour traiter les animaux producteurs de denrées alimentaires a été interdite par la Communauté Européen (CE) en 1994 et qu'a mis en place une «limite de résidus de zéro tolérance» pour le chloramphénicol dans les aliments d'origine animale, y compris le miel (Pan C. et al., 2006). Par conséquent, en 2003, les autorités européennes de Bruxelles avaient dû fermer provisoirement les frontières de l'Europe au miel chinois après plusieurs cas de contamination par le chloramphénicol, un antibiotique hautement toxique, interdit depuis 1994 (Rigal M.L., 2012). Cependant, certains pays, comme la Suisse, Royaume-Uni et la Belgique, ont établi des limites d'action pour des antibiotiques dans le miel, ce qui est généralement comprise entre 0,01 et 0,05 mg / kg pour chaque groupe d'antibiotiques (Johnson S. et Jadon N., 2010).

---



## 4. Etude palynologique de miel « *Mélisso-palynologie* »

### 4.1. Analyse pollinique quantitative

L'analyse quantitative permet de connaître la variation de la richesse en pollen des miels. Il est possible de classer les miels, d'après [Louveaux \(1968b\)](#), en cinq classes :

Les résultats sont classiquement exprimés en donnant le nombre de grains de pollen pour 10 g de miel. Et il est possible de classer les miels en 5 catégories :

- **Classe I** : moins de 2 000 pollens pour 1 g de miel → Pauvre
  - **Classe II** : 2 000 à 10 000 pollens/g → Moyenne
  - **Classe III** : 10 000 à 50 000 pollens/g
  - **Classe IV** : 50 000 à 1 00 000 pollens/g
  - **Classe V** : plus de 1 00 000 pollens/g
- } Riches

**Tableau 08: Classification des différents échantillons étudiés selon leurs richesses en pollens.**

Echantillons	GP/ g	Classes	Interprétation
E01	94034	IV	Riche
E02	279711	V	Riche
E03	697452	V	Riche
E04	15478	III	Riche
E05	420765	V	Riche
E06	110544	V	Riche
E07	13578	III	Riche
E08	42635	III	Riche
E09	54107	IV	Riche

En basant sur ce qui est déjà cité dans le *tableau 08*, on constate que tous les échantillons des miels analysés appartiennent aux classes : III, IV et V, sont alors des miels riches en pollen. C'est l'échantillon N°03 qui enregistre la valeur la plus élevée soit 697452 grains/g de miel suivi par l'échantillon N°05 avec une teneur en pollen de 420765 grains/g, en revanche l'échantillon N°07 marque la plus faible valeur parmi le reste des échantillons soit 13578 grains/g.

Cette variation du nombre des grains de pollen d'un échantillon à un autre est influencée en premier lieu par la teneur en pollen dans le nectar dont le miel provient ; cette teneur varie en fonction de la plante principale qui l'a fourni et en second lieu par le mode d'extraction ; les miels d'extracteur centrifuge contiennent peu de sédiment (Louveaux et al., 1970).

En générale, la situation géographique, la variation des conditions climatiques et de la flore d'une saison à une autre et d'une région à une autre ainsi que le mode d'extraction explique donc les différentes teneurs en pollen obtenus dans les miels analysés.

#### 4.2. Analyse pollinique qualitative

La méliissopalynologie est l'étude des pollens présents dans le miel. Elle permet d'identifier les origines botaniques et géographiques et aussi de détecter les fraudes (contrôle des appellations florales).

Les pollens sont caractérisés par les scientifiques selon divers critères :

- **La symétrie** : selon deux plans (polaire ou équatorial) on distingue des symétries isopolaire ou hétéropolaire ;
- **La forme** : circulaire, triangulaire, hexagonale ;
- **La taille** : de 2.5 à 300 microns toutes les tailles existent ;
- **Les ouvertures** : pore ou sillon ou association des deux ou encore absence d'ouvertures comme le mélèze par exemple ;
- **L'ornementation de l'exine** : lisse, ornementée en creux (dépressions isolées, sillons parallèles, réseau) ou en relief (épines, clou, crêts, verrues, ballonnets).

Les taxons identifiés étant regroupés en 4 classes :

- Pollen dominant : figurent à plus de 45% du pollen dénombrés ;
- Pollen d'accompagnement : présente de 16 à 45% du pollen dénombrés ;
- Pollen isolé important : de 3 à 15% du pollen dénombrés ;
- Pollen isolé rare : moins de 3% du pollen dénombrés ;

La présence d'un pollen dominant dans un miel permet dans la plupart des cas de le considérer comme miel « unifloral ». S'il n'y a pas de pollen dominant, le miel est considéré comme « toutes fleurs » (Louveaux et al., 1978 ; Parent et al., 1989).

Les résultats d'analyse palynologique des miels sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 09: Résultats d'analyse pollinique qualitative des miels.

Miel	Pollens dominants (>45%)	Pollens d'accompagnement (16 à 45%)	Pollens isolés importants (3 à 15)	Pollens isolés importants (<3)
E01	<i>Foeniculum vulgare</i> : 46%	/	<i>Daucus carota</i> : 14% <i>Hedysarum coronarium</i> : 9% <i>Chenopodiacee gr.</i> : 9% <i>Eucalyptus sp.</i> : 3% <i>Brassica napus</i> : 3%	<i>Matricaria recutita</i> : 2,5% <i>Echium vulgare</i> : 2,42% <i>Borrago officinalis</i> : 0,5% <i>Mimosa gr.</i> : 0,5% <i>Raphanus raphanistrum</i> : 1,5% <i>Oxalis</i> : 1% <i>Helianthus annuus</i> : 0,5% <i>Galactites tomentosa</i> : 0,5% <i>Citrus sp</i> : 0,5% <i>Taraxacum officinale</i> : 1% <i>Echium vulgare</i> : 2,42% <i>Pollen indéterminé</i> : 1% <i>Papaver rhoeas</i> : 1,5% <i>Convolvulus gr.</i> : 1,58% <i>Matricaria recutita</i> : 2,5% <i>Genista gr.</i> : 0,5% <i>Olea europea</i> : 0,5%
E02	/	<i>Genista f.</i> : 20,82% <i>Eucalyptus sp.</i> : 28,53%	<i>Citrus sp</i> : 8,31% <i>Pollen indéterminé</i> : 3,23% <i>Convolvulus gr.</i> : 4,75% <i>Vicia gr.</i> : 13% <i>Matricaria recutita</i> : 4% <i>Daucus carota</i> : 3,8% <i>Olea europea</i> : 9,6%	<i>Mimosa gr.</i> : 0,53% <i>Calendula officinalis</i> : 1% <i>Brassica napus</i> : 2,3% <i>Ziziphus jujuba</i> : 0,13%
E03	/	<i>Daucus carota</i> : 18,13% <i>Hedysarum coronarium</i> : 29,2%	<i>Papaver rhoeas</i> : 6,3% <i>Cistus albidus</i> : 8,74% <i>Chenopodiacee</i> : 9,75% <i>Brassica napus</i> : 9,71% <i>Foeniculum vulgare</i> : 5,3%	<i>Lavandula stoechas</i> : 0,44% <i>Rosmarinus officinalis</i> : 0,74% <i>Allium cepa</i> : 0,43% <i>Oxalis gr.</i> : 0,11% <i>Helianthus annuus</i> : 1,77% <i>Galactites tomentosa</i> : 0,44% <i>Reseda Alba</i> : 0,05% <i>Citrus sp</i> : 0,71% <i>Quercus robur</i> : 0,89% <i>Taraxacum officinale</i> : 0,86% <i>Echium vulgare</i> : 0,14% <i>Pollen indéterminé</i> : 1,6% <i>Vicia gr.</i> : 1,4% <i>Matricaria recutita</i> : 2,46% <i>Eucalyptus sp.</i> : 1,19%
E04	<i>Hedysarum coronarium</i> : 45,12%		<i>Adonis Estivalis</i> : 3% <i>Papaver rhoeas</i> : 3% <i>Brassica napus</i> : 5,54%	<i>Rosmarinus officinalis</i> : 0,66% <i>Borrago officinalis</i> : 1% <i>Mimosa gr.</i> : 0,33%

		/	<p><i>Daucus carota</i>: 7%  <i>Eucalyptus sp.</i> : 6%  <i>Foeniculum vulgare</i>: 6,33%</p>	<p><i>Raphanus raphanistrum</i>: 0,33%  <i>Oxalis gr.</i>: 2,78%  <i>Helianthus annuus</i>: 0,33%  <i>Calendula officinalis</i>: 1,5%  <i>Plantago gr.</i>: 1,66%  <i>Galactites tomentosa</i>: 0,66%  <i>Reseda Alba</i>: 1,3%  <i>Citrus sp</i>: 0,33%  <i>Taraxacum officinale</i>: 0,66%  <i>Pollen indéterminé</i>: 1%  <i>Convolvulus gr.</i> : 1%  <i>Vicia gr.</i> : 1,66%  <i>Matricaria recutita</i>: 2%  <i>Genista gr.</i> : 0,66%  <i>Chenopodiaceé gr.</i>: 1,66%  <i>Pinus gr.</i> : 0,5%  <i>Olea europea</i>: 2,33%  <i>Ziziphus jujuba</i>: 1,66%</p>
<b>E05</b>		<p><i>Pinus gr.</i>: 30,8%  <i>Eucalyptus sp.</i>: 24%</p>	<p><i>Genista gr.</i>: 4,4%  <i>Chenopodiaceé gr.</i>: 8%  <i>Brassica napus</i>: 6,8%  <i>Hedysarum coronarium</i>: 4%  <i>Foeniculum vulgare</i>: 3,2%</p>	<p><i>Prunus gr.</i> : 1,6%  <i>Cichorium</i>: 0,4%  <i>Borrago officinalis</i>: 0,8%  <i>Helianthus annuus</i>: 0,4%  <i>Reseda Alba</i>: 2%  <i>Adonis Estivalis</i>: 2,4%  <i>Citrus sp</i>: 0,8%  <i>Quercus robur</i>: 1,2%  <i>Taraxacum officinale</i>: 0,4%  <i>Echium vulgare</i>: 1,2%  <i>Pollen indéterminé</i>: 0,4%  <i>Papaver rhoeas</i>: 0,4%  <i>Convolvulus gr.</i> : 1,2%  <i>Vicia gr.</i> : 0,4%  <i>Matricaria recutita</i>: 2%  <i>Daucus carota</i>: 2%  <i>Ziziphus jujuba</i>: 1,2%</p>
<b>E06</b>	<i>Olea europea</i> : 52,4%	/	<p><i>Echium vulgare</i>: 4,8%  <i>Chenopodiaceé</i>: 3,2%  <i>Brassica napus</i>: 3,2%  <i>Daucus carota</i>: 6%  <i>Ziziphus jujuba</i>: 4,8%  <i>Eucalyptus sp.</i>: 13,6%</p>	<p><i>Raphanus raphanistrum</i>: 2%  <i>Galactites tomentosa</i>: 2,8%  <i>Adonis Estivalis</i>: 0,8%  <i>Taraxacum officinale</i>: 0,8%  <i>Pollen indéterminé</i>: 0,8%  <i>Papaver rhoeas</i>: 1,2%  <i>Convolvulus gr.</i> : 1,2%  <i>Matricaria recutita</i>: 0,4%  <i>Foeniculum vulgare</i>: 2%</p>
<b>E07</b>	<i>Ziziphus jujuba</i> : 73%	/	<p><i>Plantago gr.</i>: 3%  <i>Taraxacum officinale</i>: 3%  <i>Daucus carota</i>: 3,5%  <i>Eucalyptus sp.</i>: 3,5%</p>	<p><i>Cichorium gr.</i>: 1%  <i>Mimosa gr.</i>: 1%  <i>Galactites tomentosa</i>: 1%  <i>Reseda Alba</i>: 2%  <i>Pollen indéterminé</i>: 0,5%  <i>Convolvulus gr.</i> : 2%</p>

				<i>Chenopodiaceé</i> : 2% <i>Brassica napus</i> : 2,5% <i>Olea europea</i> : 0,5% <i>Foeniculum vulgare</i> : 1,5%
<b>E08</b>	/	<i>Eucalyptus sp.</i> : 18,49% <i>Foeniculum vulgare</i> : 23,41%	<i>Quercus robur</i> : 8,49% <i>Taraxacum officinale</i> : 4,93% <i>Cistus albidus</i> : 13% <i>Daucus carota</i> : 12,63% <i>Ziziphus jujuba</i> : 9%	<i>Mimosa gr.</i> : 0,15% <i>Plantago gr.</i> : 2,17% <i>Galactites tomentosa</i> : 0,58% <i>Echium vulgare</i> : 0,44% Pollen indéterminé: 1,19% <i>Papaver rhoeas</i> : 0,01% <i>Matricaria recutita</i> : 2,42% <i>Pinus gr.</i> : 0,13% <i>Brassica napus</i> : 1,51% <i>Hedysarum coronarium</i> : 1,45%
<b>E09</b>	<i>Foeniculum vulgare</i> : 55%	/	<i>Calendula officinalis</i> : 3,5% <i>Reseda Alba</i> : 4% <i>Adonis Estivalis</i> : 4% <i>Convolvulus gr.</i> : 4,5% <i>Daucus carota</i> : 9,5%	<i>Cichorium gr.</i> : 0,5% <i>Allium cepa</i> : 2% <i>Oxalis gr.</i> : 1% <i>Helianthus annuus</i> : 2,5% <i>Galactites tomentosa</i> : 1,5% <i>Echium vulgare</i> : 3% Pollen indéterminé: 0,5% <i>Vicia gr.</i> : 2,5% <i>Matricaria recutita</i> : 1,5% <i>Chenopodiaceé</i> : 2% <i>Brassica napus</i> : 0,5% <i>Olea europea</i> : 2%

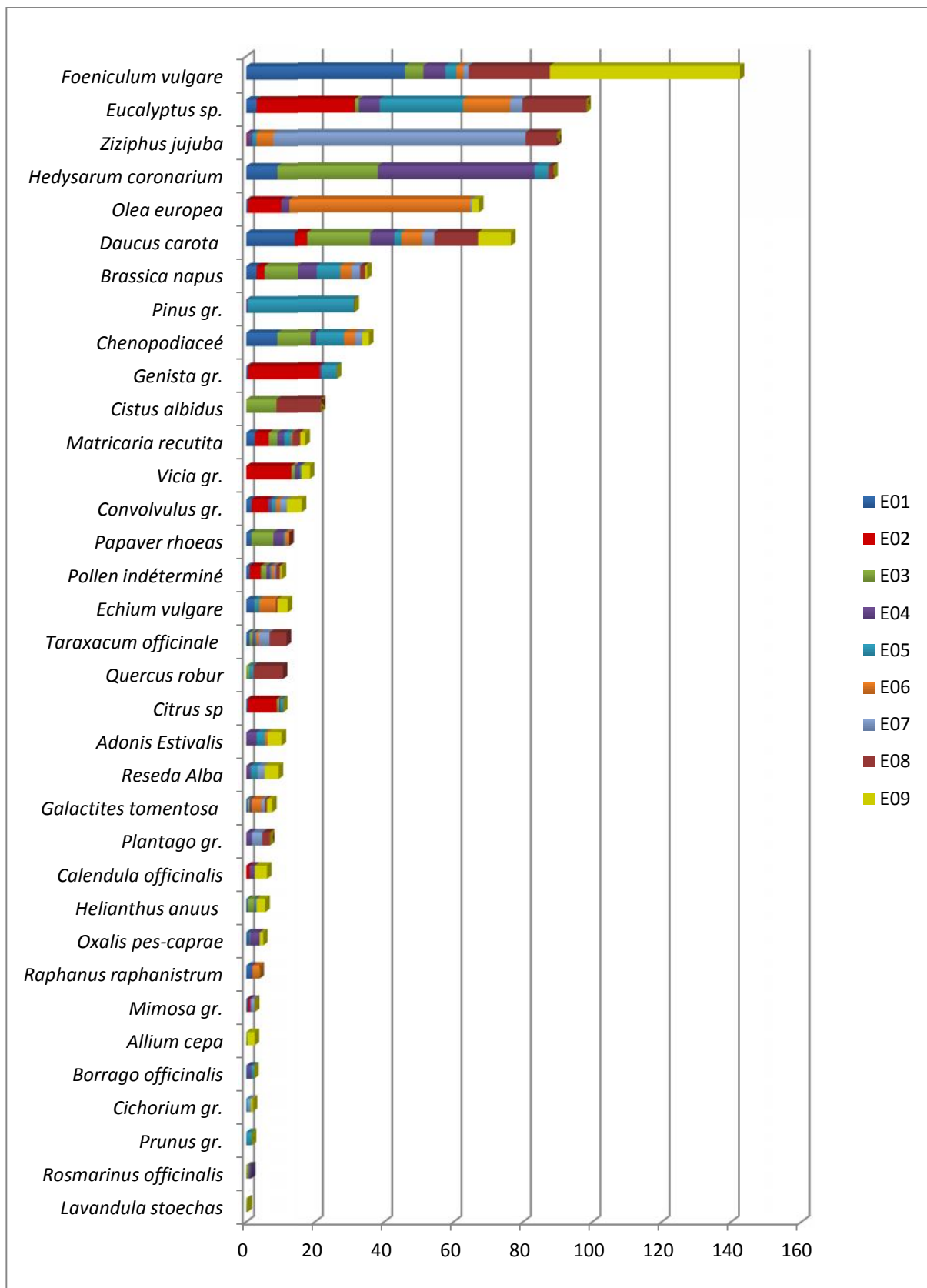


Figure 55: Spectres polliniques de différents miels analysés.

Les résultats montrés dans le tableau 09 et la figure 55 nous donnent une image claire sur la flore mellifère dans la région de l'ouest Algérien. Ainsi l'origine botanique des miels de cette région ; l'étude méliissopalynologique nous a permis de déterminer les principale espèces botaniques origines des appellations florale de différents miels étudiés à savoir : *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba* qui sont présents en pollen dominants dans les miels N°01, N°04, N°06, N°07 et N°09 respectivement avec des pourcentage supérieures de 45% soient 46% 45,12% 52,4% 73% et 55% respectivement. De ce fait, quelques miels ont confirmé leurs appellations florales présumés ; se sont les miels N°02, N°03 et N°08 qui sont des miels multifloraux et l'échantillon N°07 présumé miel de « Jujubier ». Cependant le reste des miels n'ont pas confirmé leurs origines botaniques présumées par les apiculteurs ; certaines espèces peuvent être surreprésentées car, très pollinifères, leur pollen est abondant mais secrètent peu de nectar, au contraire, d'autre espèces peuvent être sous représentées c'est-à-dire qu'elles produisent peu de pollen même si elles sont très nectarifères, ceci explique les résultats d'analyse de miel dont la dominance végétale mentionné par l'apiculteur n'apparaît pas dans l'analyse palynologique. De même, malgré la dominance d'une espèce donnée, en présence de variabilité florale, les abeilles manifestent une préférence d'espèces par rapport à d'autres et les visitent plus fréquemment grâce à sa concentration en sucres la plus élevée.

D'autres espèces et genres botaniques sont classés sous forme de pollen d'accompagnement tel que l'*Eucalyptus sp.* (Miels N°02, N°05 et N°08), *Daucus carota* (Miel N°03), *Pinus gr.* (Miel N°05) et genre *Genista gr.* (Miel N°02) avec des pourcentages compris entre 16 et 45%. Les espèces comme *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, *Papaver rhoeas*, *Adonis Estivalis*, *Echium vulgare*, *Quercus robur*, *Calendula officinalis*, *Reseda Alba* et *Adonis Estivalis* et les genres comme *Vicia gr.*, *Chenopodiacee gr.*, *Citrus gr.*, *Convolvulus gr.* et *Plantago gr.* sont classés dans la catégorie de pollen isolé important avec des pourcentages varient entre 3 et 15%. Quelques espèces sont rarement trouvées dans les échantillons de miels étudiés comme : *Allium cepa*, *Galactites tomentosa*, *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, *Helianthus anuus*, *Borrago officinalis*, *Raphanus raphanistrum* et les genres *Cichorium gr.*, *Mimosa gr.* et *Oxalis gr.*; Leurs pourcentages calculés sont inférieures à 3%. Tandis que le pollen indéterminé représente des valeurs faibles allant de 0,4% à 3,23% dans les miels analysés; il correspond à quelques grains de pollen qui n'ont pas été identifiés, mais leur nombre est très faible, et n'influence pas l'appellation donnée aux miels.

Vue les résultats trouvés on peut noter la prédominance des espèces et genres suivants : *Eucalyptus sp.*, *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba*, *Daucus carota*, *Genista gr.*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, *Chenopodiaceae gr.* et *Papaver rhoeas*. Se sont des espèces et genres omniprésents dans les miels de la région de l'ouest Algérien puisque sont abondants et présentent dans la totalité des miels analysés. C'est résultats sont similaires à ceux trouvés par plusieurs travaux sur les miels Algériens (Ouchemoukh et al., 2005 ; Makhloufi et al., 2010 ; Nair et al., 2013, Draiaia R. et al., 2014). La prédominance de ces espèces et genres dans les échantillons étudiés reflète l'importante miellée sur ces essences et leur abondance dans la région de l'ouest Algérien ; certain espèces comme d'*Eucalyptus* fournit un nectar très aromatique et très apprécié par les abeilles. Cette ressource mellifère joue dans de nombreuses régions un rôle important comme plante mellifère d'été. Hooper (1980) cité par Makhloufi (2007) ajoute que lors des étés suffisamment chauds, l'*Eucalyptus* produit une grande quantité de nectar et de pollen. La récolte des miels en Algérie commence en générale à partir du mois de juin, c'est au cours de la période de floraison d'*Eucalyptus* qui s'étale de mai jusqu'à septembre.

En effet, cette diversité de la flore mellifère dans les miels analysés est l'origine d'une diversité des espèces botaniques dans la région. D'autre facteurs influences les spectres florales identifiés dans chaque miel comme le climat, le mode et l'intensité de butinage des abeilles qui varie d'une plante à une autre ; certaines plantes sont préférées par les abeilles et constitue une ressource mellifère importante dans les périodes de miellés. De plus, ces insectes ont besoin d'une source protéique représentée par le pollen, alors que les plantes fournissant beaucoup de pollen sont préférées aussi par les abeilles. Nos résultats montrent la présence de plusieurs espèces considérés comme des sources de pollen pour les abeilles ; Louveaux (1968b) rapporte que différents facteurs sont susceptibles d'intervenir pour déterminer le choix des butineuses.

- Les plantes qui fournissent le pollen et le nectar à la fois sont préférées aux autres.
- Les plantes communes existant en peuplements denses sont également préférées.
- La localisation ainsi que divers facteur écologiques peuvent aussi jouer un rôle.

En outre, certaines espèces sont appréciées à cause de leurs couleurs vives, des chercheurs ont remarqué que les abeilles visitent plus fréquemment les fleurs de couleur bleue et jaune, nous avons rencontré ce cas avec les deux espèces *Rosmarinus officinalis* « Romarin » et *Lavandula stoechas* « Lavande maritime » très visitées malgré leur faible



densité de répartition puisqu'ils offrent un très bon nectar dont les abeilles sont très friandes. Leurs nectars sont très aromatiques et très appréciés par les abeilles.

Le colza « *Brassica napus* » est ainsi une plante très mellifère mais également pollinifère ; il donne un miel très riche en glucose elle est donc très attractif pour les abeilles ; le butinage intense de ces espèces peut être expliqué par l'abondance de ces essences dans la région de l'ouest Algérien où les échantillons de miel ont été récoltés.

L'*Hedysarum coronarium* est une autre plante fourragère qui présente une grande importance par la qualité de son pollen autant que par sa quantité (Louveaux, 1968b), c'est également une espèce réputée très néctarifère (Biri, 1981). Louveaux (1968b) rapporte que les abeilles sélectionnent les pollens en fonction d'un certain nombre de caractères qui sont liés à leur valeur alimentaire et à leur valeur biologique et ce peut expliquer le choix d'*Hedysarum coronarium* qui est l'un des essences les plus riches en azote. L'abondance de cette essence est due d'une part à sa forte représentation dans cette région et aux facteurs relatifs à son pollen. Cependant, les espèces comme *Malva sylvestris* ne sont pas identifiées dans nos échantillons de miel malgré qu'elles fournissent presque toutes pollen et nectar en grande quantité. C'est à cause de son pollen très volumineux ; selon Louveaux (1968b), la qualité et la taille sont des facteurs de choix du pollen chez les abeilles. Les pollens de petites tailles sont plus recherchés que les gros. Rabiet (1984), ajoute que les abeilles ne choisissent pas le pollen qu'elles recueillent seulement d'après sa qualité ; la récolte de cette matière est généralement subordonnée à celle du nectar dont le critère de choix est sa teneur en sucres et son abondance.

Aucune cellule de levure n'a été révélée dans les échantillons de miel étudiés ce qui signifie que ces miels sont bien conservés. Quant à l'absence totale des champignons a été signalée dans les sédiments de ces échantillons de miel. Cependant, certains miels marquent la présence des impuretés, ce qui indique une mauvaise épuration lors de l'extraction qui est faite traditionnellement de façon manuelle c'est le cas des échantillons N°07 et N08.

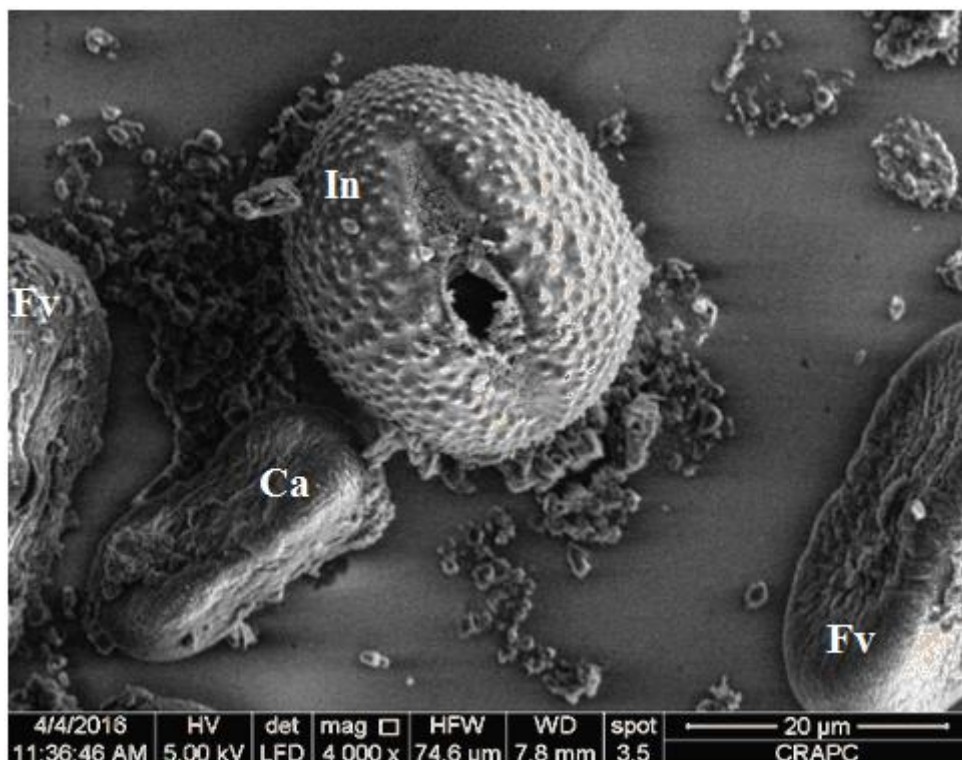
La participation des Apiculteurs est très importante par le biais de leurs connaissances et leurs suivis de par leur présence sur le terrain. L'observation permanente nous permettra de collecter d'autres informations telles que la préférence et la fréquence de butinage. Enfin, cette étude devrait s'élargir à d'autres régions en Algérie afin de connaître les caractéristiques de chaque zone mellifère.

Les observations microscopiques par le microscope optique et électronique de différents miels étudiés sont représentées dans les figures ci-dessous :



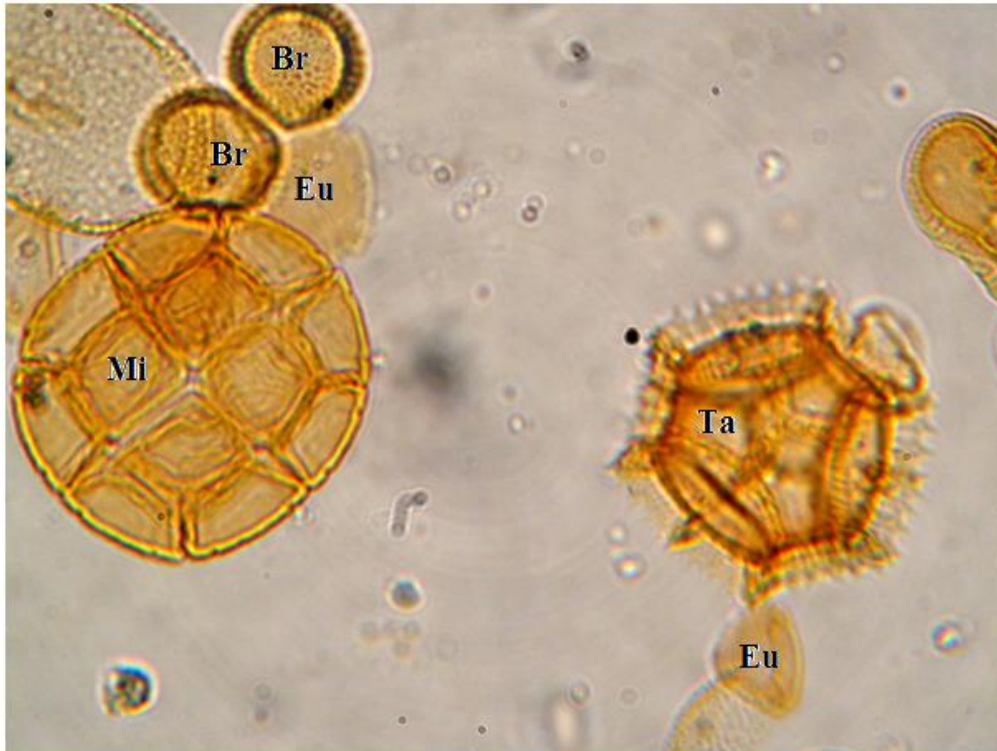
*Fv* : *Foeniculum vulgare*    *Ca* : *Daucus carota*

**Figure 56: Observation de l'échantillon N°01 par Microscope optique (400X)**



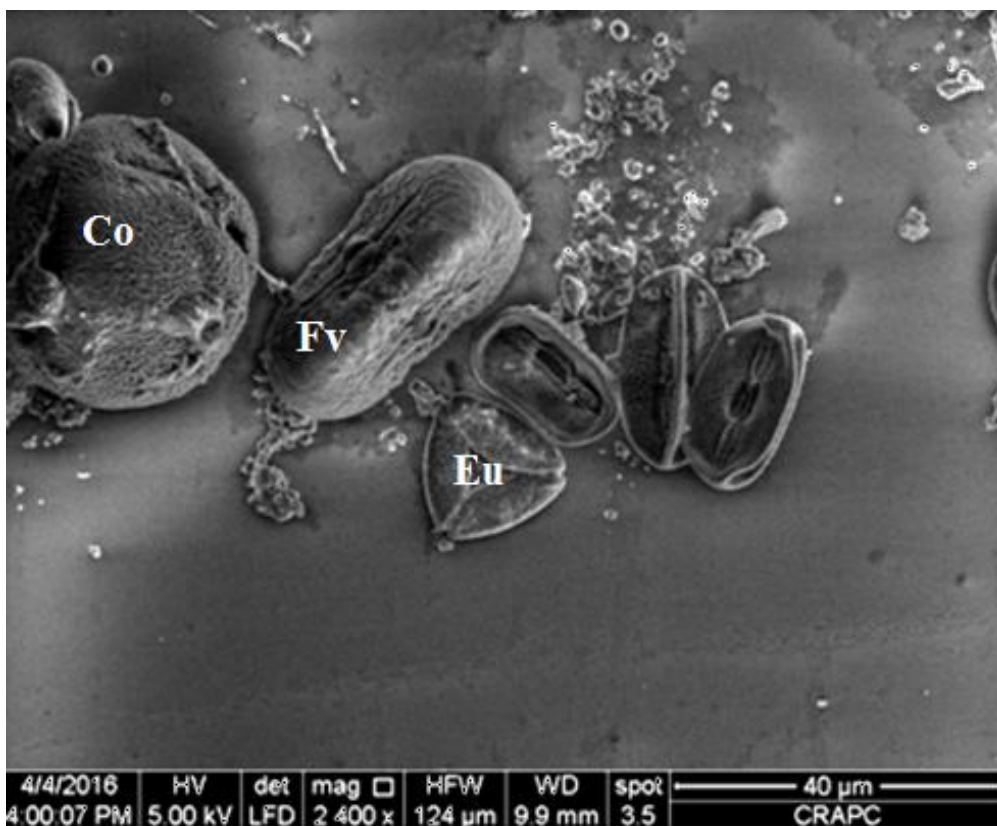
*Fv* : *Foeniculum vulgare*    *Ca* : *Daucus carota*    *In* : Pollen indéterminé

**Figure 57: Observation de l'échantillon N°01 par Microscope électronique à balayage (4000X)**



Br : *Brassica napus* Eu : *Eucalyptus sp.* Mi : *Mimosa gr.* Ta : *Taraxacum officinale* Ca: *Daucus carota*

Figure 58: Observation de l'échantillon N°02 par Microscope optique (400X)



Co: *Convolvulus gr.* Fv: *Foeniculum vulgare* Eucalyptus sp.

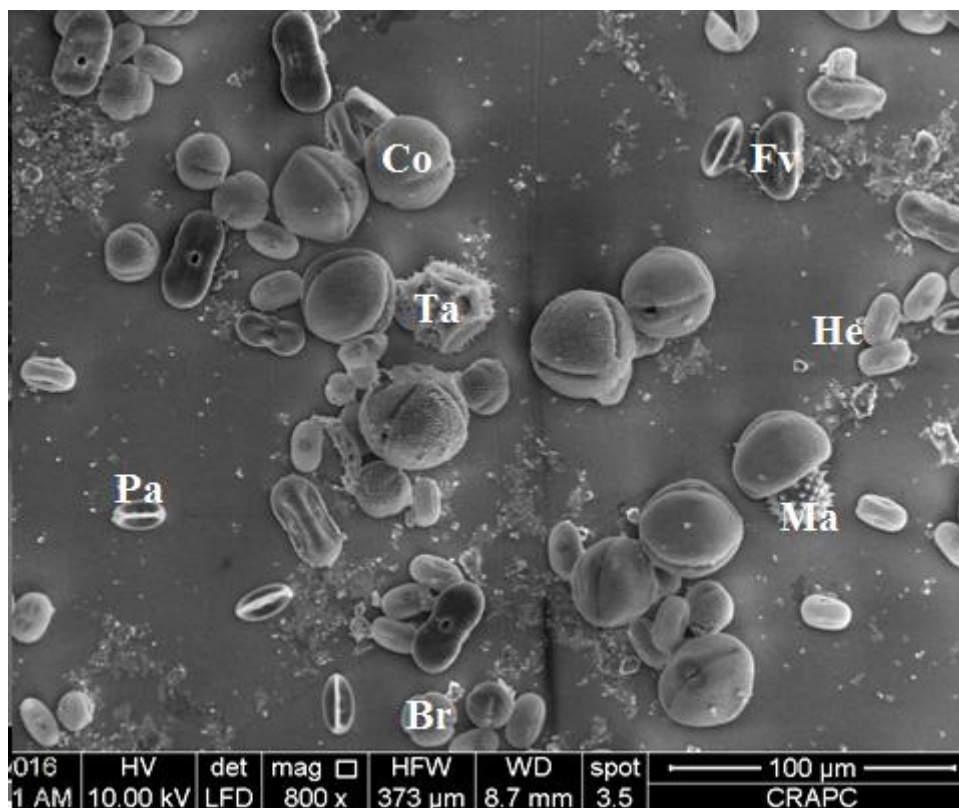
Figure 59: Observation de l'échantillon N°02 par Microscope électronique à balayage (800X)





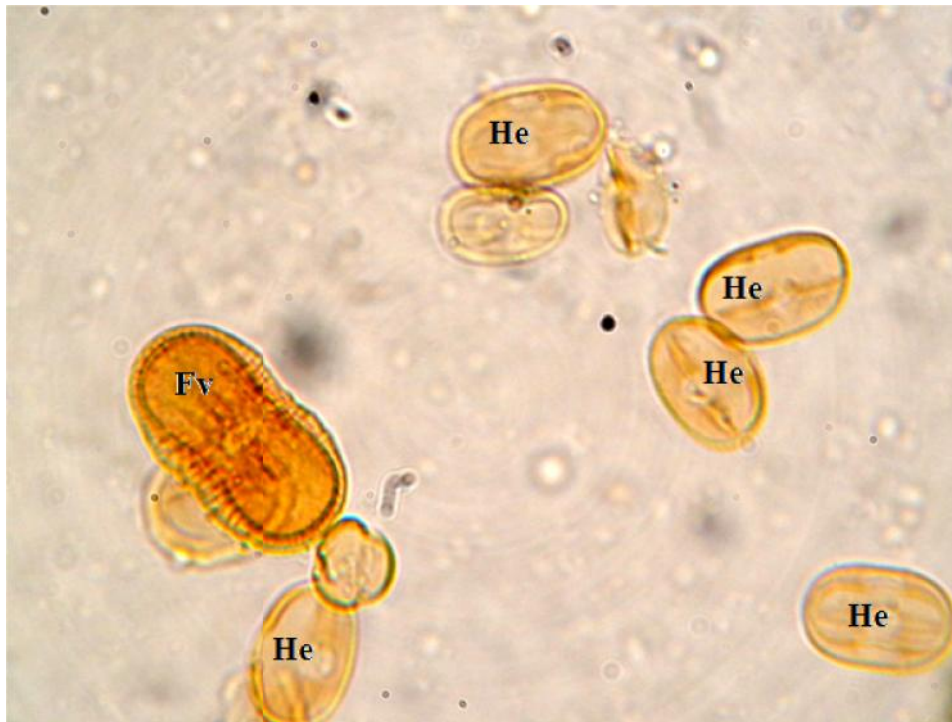
He: *Hedysarum coronarium* Fv: *Foeniculum vulgare* Br: *Brassica napus*

Figure 60: Observation de l'échantillon N°03 par Microscope optique (400X)



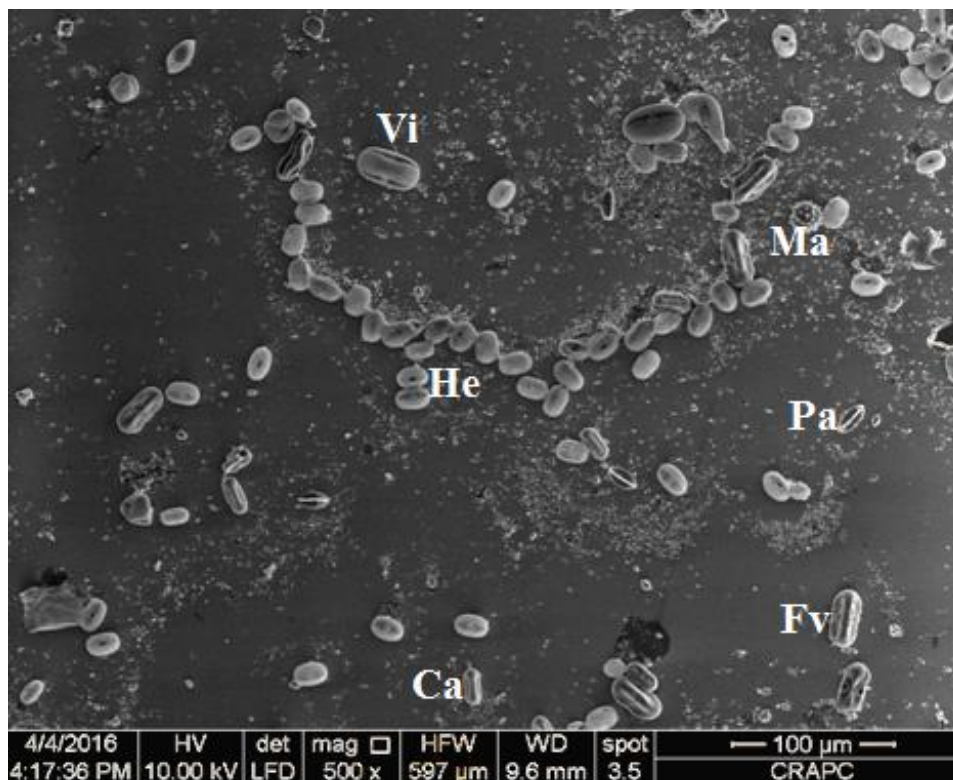
Co: *Convolvulus gr.* Ta: *Taraxacum officinale* Fv: *Foeniculum vulgare* Br: *Brassica napus*  
He: *Hedysarum coronarium* Pa: *Papaver rhoeas* Ma: *Matricaria recutita*

Figure 61: Observation de l'échantillon N°03 par Microscope électronique à balayage (800X)



Fv: *Foeniculum vulgare* He: *Hedysarum coronarium*

Figure 62: Observation de l'échantillon N°04 par Microscope optique (400X)



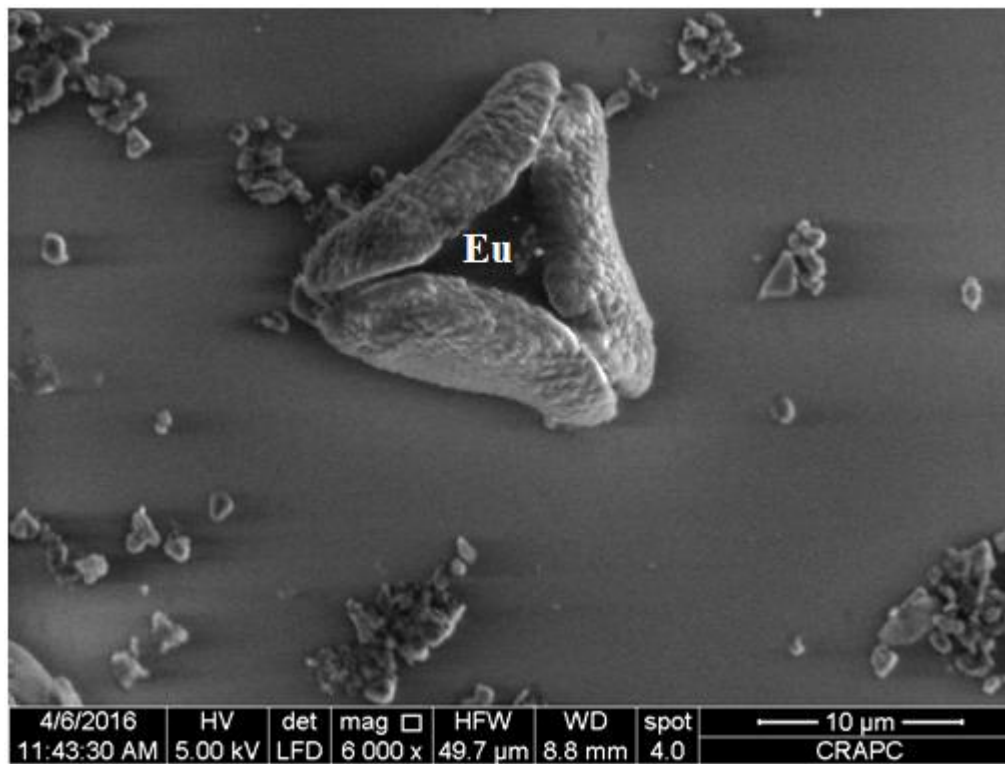
Vicia gr. Ma: *Matricaria recutita* He: *Hedysarum coronarium* Pa: *Papaver rhoeas* Fv: *Foeniculum vulgare* Ca: *Daucus carota*

Figure 63: Observation de l'échantillon N°04 par Microscope électronique à balayage (500X)



Ca: *Daucus carota* Eucalyptus sp.

Figure 64: Observation de l'échantillon N°05 par Microscope optique (400X)



*Eucalyptus* sp.

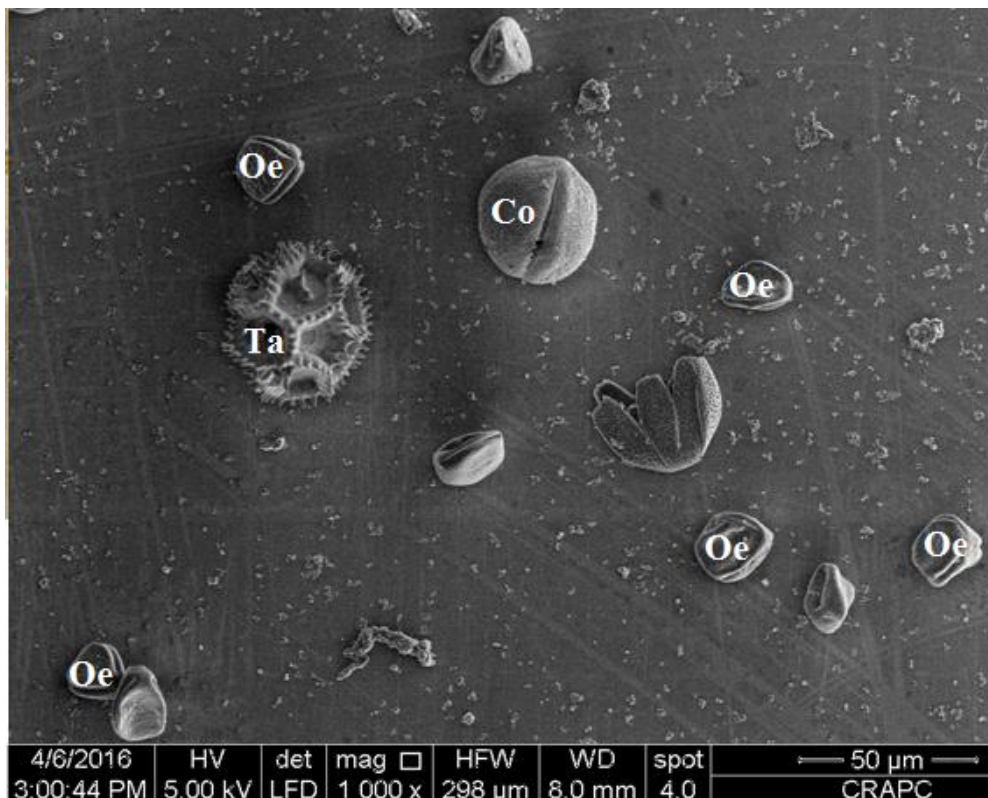
Figure 65: Observation de l'échantillon N°05 par Microscope électronique à balayage (3000X)





Ca: *Daucus carota* Eucalyptus sp. Oe : *Olea europea*

Figure 66: Observation de l'échantillon N°06 par Microscope optique (400X)



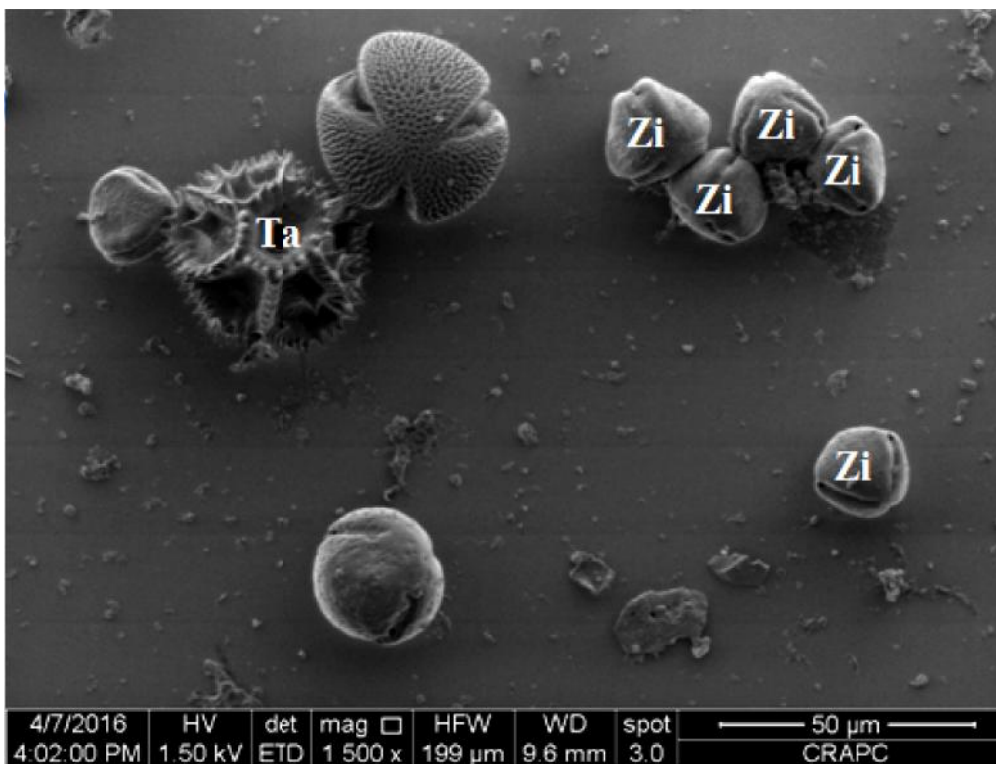
Oe : *Olea europea* Ta: *Taraxacum officinale*

Figure 67: Observation de l'échantillon N°06 par Microscope électronique à balayage (1000X)



Zi: *Ziziphus jujuba* In : Pollen indéterminé

Figure 68: Observation de l'échantillon N°07 par Microscope optique (400X)



Zi : *Ziziphus jujuba* Ta: *Taraxacum officinale*

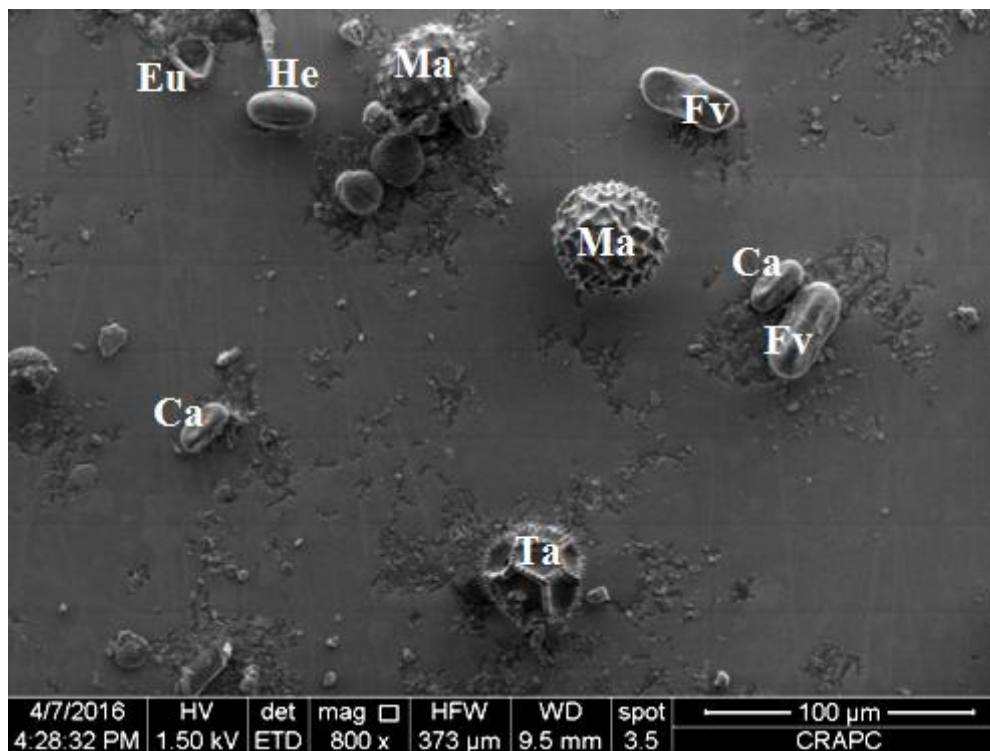
Figure 69: Observation de l'échantillon N°07 par Microscope électronique à balayage (1500X)





Br : *Brassica napus* Eu : *Eucalyptus* sp. He: *Hedysarum coronarium* Fv: *Foeniculum vulgare*

Figure 70: Observation de l'échantillon N°08 par Microscope optique (400X)



He: *Hedysarum coronarium* Fv: *Foeniculum vulgare* Ta: *Taraxacum officinale* Eu: *Eucalyptus* sp.

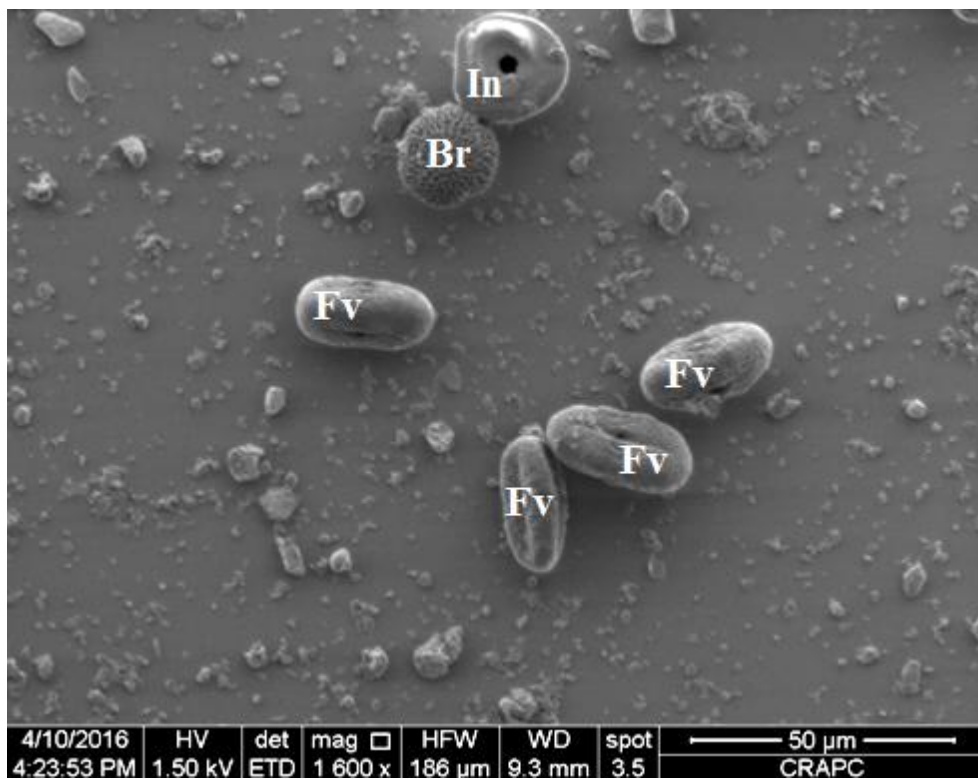
Ca: *Daucus carota* Ma: *Matricaria recutita*

Figure 71: Observation de l'échantillon N°08 par Microscope électronique à balayage (800X)



*Fv*: *Foeniculum vulgare* *Ch*: *Chenopodiaceae* gr.

Figure 72: Observation de l'échantillon N°09 par Microscope optique (400X)



*Fv*: *Foeniculum vulgare* *Br*: *Brassica napus* *In*: Pollen indéterminé

Figure 73: Observation de l'échantillon N°09 par Microscope électronique à balayage (800X)

## 5. Étude in vivo de l'effet immunomodulateur du miel

### 5.1. Application du test ELISA pour l'étude de l'effet immunomodulateur du miel chez les souris Balb/c

La première étape d'optimisation des différents paramètres du test ELISA a permis de déterminer les dilutions optimales pour le dosage des anticorps IgG de souris anti-OVA ; la concentration de l'OVA a été fixée à **5µg/ml** lorsque les dilutions en immunosérums (IS) de souris anti-OVA et en conjugué sont respectivement de **1/300** et **1/2000**.

Afin d'étudier l'effet immunomodulateur de miel chez les souris Balb/c, l'échantillon N°03 a été retenu pour sa meilleure qualité physicochimiques ; sa teneur haute en polyphénol et de son activité antioxydante élevée ainsi sa richesse en plantes médicinales.

Un test ELISA a été adopté pour évaluer cette activité immunomodulatrice chez différents groupes de souris à la suite de l'administration de 100 µl du miel à différents intervalles de temps : 24 h, 6 h avant, 0 h (en même temps) et 24 h, 6 h après immunisation avec l'OVA.

Les résultats présentés dans la *figure 74* montrent que la réponse des anticorps IgG anti-OVA est significativement supprimée ( $p < 0,01$ ) à la suite d'administration du miel 6 h avant et 06 h après l'injection d'OVA.

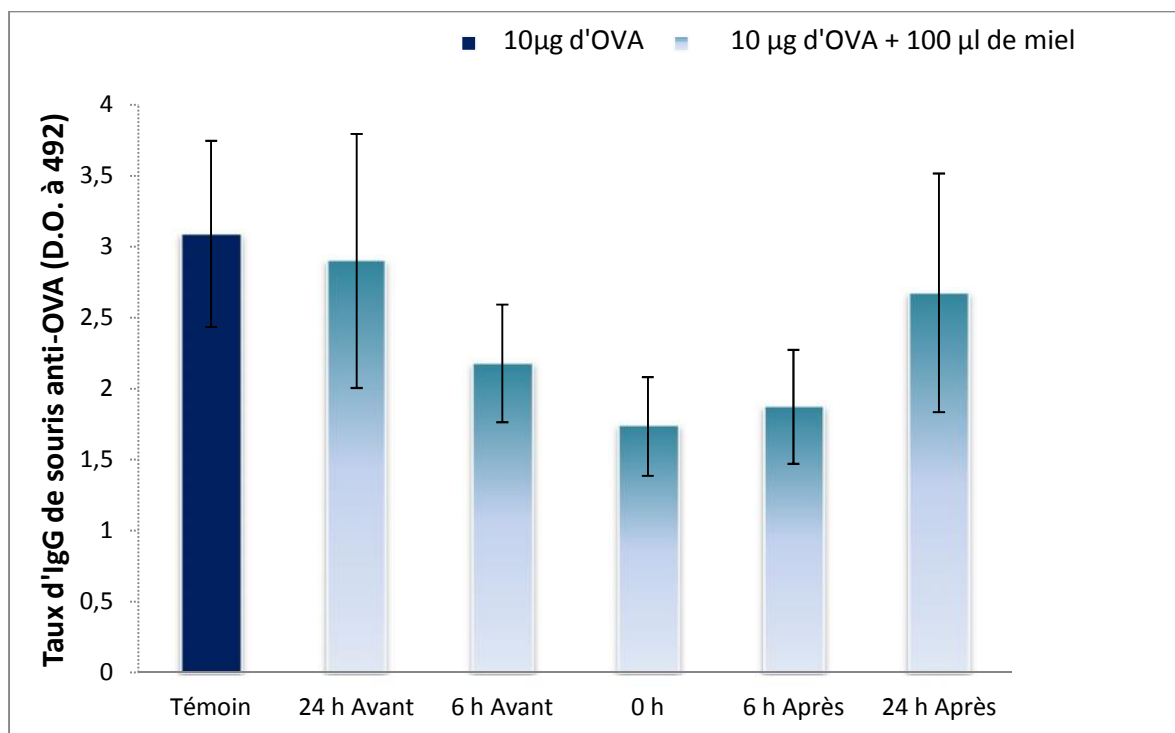


Figure 74: Influence du miel sur le taux d'IgG de souris anti-OVA en fonction du temps d'injection.

D'après la figure N°73, le test ELISA donne des valeurs de densité optique (D.O.) de :  $2,901 \pm 0,894$  et  $2,677 \pm 0,84$  pour les groupes de souris recevant 100  $\mu$ l de miel 24h avant et 24h après l'immunisation avec l'OVA respectivement. Ces résultats ne sont pas significativement diminués quand ils sont comparés à ceux du groupe témoin qui a montré une D.O. de  $3,092 \pm 0,655$  ( $P < 0,05$ ).

Les autres groupes de souris qui ont reçus la même dose de miel 6h avant et 6h après l'immunisation par l'OVA montrent des valeurs de D.O. de  $2,179 \pm 0,414$  et  $1,873 \pm 0,401$  respectivement. Ces résultats sont nettement diminués de manière très significative en comparaison avec le témoin ( $P < 0,01$ ).

Le dernier groupe de souris qui a reçu une dose de 100  $\mu$ l de miel en même temps que l'injection de 10  $\mu$ g d'OVA montre des effets similaires par le test ELISA avec des valeurs de D.O. de  $1,734 \pm 0,348$ , valeur hautement significative ( $p = 0,001$ ) par rapport au groupe témoin.

## 5.2. Discussion

Une grande sensibilité du test ELISA indirecte non compétitif en phase hétérogène optimisé est révélée au cours du dosage des IgG de souris anti-OVA. Les résultats obtenus montrent une diminution des taux des IgG de souris anti-OVA cette diminution est nettement significative ( $P < 0,01$ ) par rapport au groupe témoin pour les groupes de souris immunisés avec 10  $\mu$ g d'OVA plus 100  $\mu$ l du miel à différents intervalles du temps à savoir 6 h avant, 0 h et 6 h après immunisation par l'OVA.

Cette étude a démontré que la réponse humorale des anticorps IgG anti-OVA est supprimée après l'administration par voie Intra péritonéale de 100  $\mu$ l de miel à différents intervalles de temps à la suite d'une immunisation par l'OVA. Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux dans le même axe de recherche à savoir ceux de [Duddukuri et al., 2001](#) qui ont étudié l'effet immunosuppresseur du miel de *Manuka* sur les différentes classes d'IgG chez des souris Balb/c et ont montré que la sous classe IgG<sub>1</sub> est significativement supprimée par le miel ( $P < 0,01$ ). En revanche, le miel n'a pas montré un effet immunosuppresseur sur la réponse des anticorps appartenant à d'autres sous classes des IgG telles que IgG<sub>2a</sub> et les IgG<sub>3</sub>. De plus selon ces mêmes auteurs, la réponse humorale des IgG totales est significativement supprimée par l'administration de miel 12 h avant et après l'immunisation par l'OVA. Aussi, ces mêmes auteurs en [1997](#) ont démontré que le miel exerce une activité immunosuppressive sur la réponse des anticorps d'isotype IgE anti-OVA. Ces derniers résultats sont en contradiction avec la médecine chinoise Hochu-ekki-to qui montre que le miel supprime la réponse des anticorps IgE sans affecter le taux des IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> ([Masahiro et al., 1997](#)).

Le dexaméthasone, un corticostéroïde puissant inhibe sélectivement les IgE et les IgA mais n'influence pas les taux d'IgG et d'IgG<sub>1</sub> (Puignerb *et al.*, 1995).

À la lumière de ces résultats on peut conclure que le miel induit une immunosuppression de la réponse des anticorps anti-OVA et par conséquent peut être utilisé comme agent antiallergique, après investigations complémentaires.

Plusieurs expérimentations animales mettent en évidence une activité immunosuppressive du miel. L'origine de cette activité immunosuppressive n'est pas encore connue, quelques recherches d'actualité essayent de purifier les immunosuppresseurs présents dans le miel et d'identifier leur nature chimique (Duddukuri *et al.*, 2001).

Ces immunosuppresseurs jouent un rôle similaire à celui des médicaments utilisés pour bloquer à un certain niveau la réponse immunitaire lors de la transplantation des organes ou les maladies auto-immunes par exemple.

Dans une étude sur des leucocytes isolés, le miel a inhibé l'activité enzymatique de la myéloperoxydase phagocytaire. Ces résultats sont en concordance avec la certitude commune que l'ingestion de miel peut soulager l'hypersensibilité au pollen. Cette même immunosuppression jouerait également un rôle positif dans les maladies auto-immunes (Bogdanov, 2009). Ces immunosuppresseurs du miel peuvent provenir des plantes médicinales dont les abeilles récoltent le pollen et le nectar. Par conséquent le miel possède quelques propriétés thérapeutiques des plantes médicinales visitées par les abeilles et dont les pollens présents dans le miel confèrent à ce dernier les effets anti-inflammatoires et antiallergiques comme ceux de la camomille (*Camomille allemande*) et l'oignon (*Allium cepa*) (Bogdanov, 2009). Une étude a concerné l'utilisation d'une plante médicinale Hochu-ekki (HOT) en médecine chinoise traditionnelle et a montré qu'elle diminue le taux des IgE et suggère un effet antiallergique par l'inhibition de la réponse des cellules T<sub>h2</sub> qui représentent la clef pour le déclenchement de la réponse immunitaire (Kaneko *et al.*, en 1999).

Ce type de recherche peut contribuer au traitement des maladies auto-immunes et de l'hypersensibilité sous ses différentes formes.



## 6. Étude de l'effet antibactérien des miels

L'étude *in vitro* de neuf échantillons de miel récoltés de l'ouest Algérien a montré l'efficacité des miels testés sur les six souches bactériennes: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus hominis*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*).

### 6.1. Résultats d'antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de différents antibiotiques. Nous avons testé l'activité de 14 antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition sont rapportées dans le tableau ci-dessous.

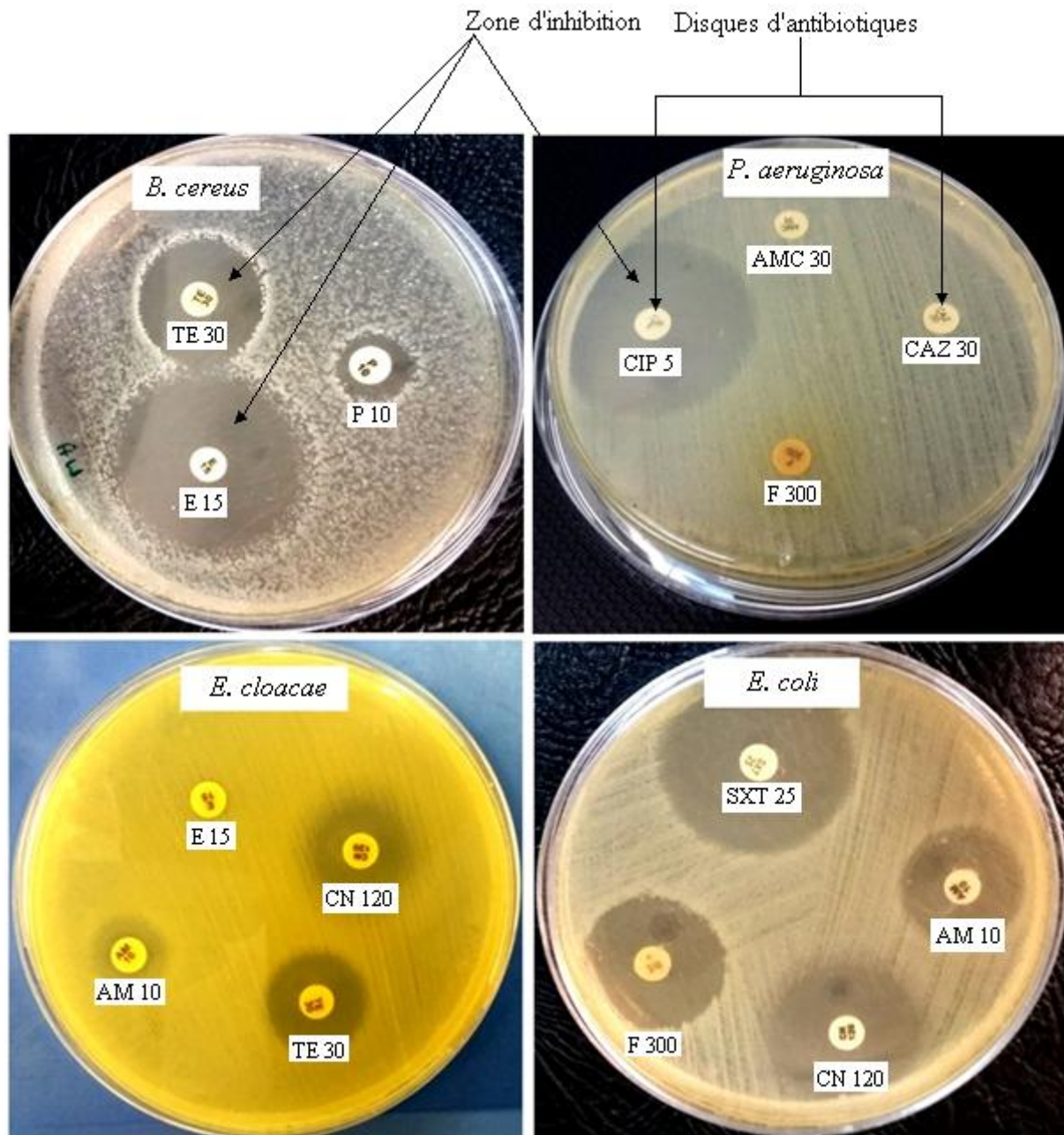
Tableau 10 : Résultats de l'antibiogramme (Diamètre de la zone d'inhibition en mm, R : Bactérie résistante).

Antibiotiques	<i>E.coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. hominis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>F 300</b>	23	23	18	27	24	(-) <sup>R</sup>
<b>FA 10</b>	(-) <sup>R</sup>	18	(-) <sup>R</sup>	17	15	(-) <sup>R</sup>
<b>CIP 5</b>	41	34	26	30	25	35
<b>B 10</b>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	20	19	(-) <sup>R</sup>
<b>CAZ 30</b>	09	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>
<b>AK 30</b>	20	29	14	35	32	24
<b>NA 30</b>	27	24	23	26	20	(-) <sup>R</sup>
<b>SXT 25</b>	31	22	20	(-) <sup>R</sup>	9	(-) <sup>R</sup>
<b>AMC 30</b>	09	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>
<b>TE 30</b>	29	22	20	35	27	12
<b>CN 120</b>	28	32	18	35	25	30
<b>P 10</b>	9	12	(-) <sup>R</sup>	22	18	(-) <sup>R</sup>
<b>AM 10</b>	21	(-) <sup>R</sup>	(-) <sup>R</sup>	24	22	(-) <sup>R</sup>
<b>E 15</b>	18	35	(-) <sup>R</sup>	30	16	08

**F 300** : Nitrofurantoin, **FA 10** : Fusidic acid, **CIP 5** : Ciprofloxacine, **B 10** : Bacitracin, **CAZ 30** : Ceftazidime, **AK 30** : Amikacin, **NA 30** : Nalidixic acid, **SXT 25** : Triméthoprim/sulphaméthoxazole, **AMC 30** : Amoxicilline/clavulanate acid, **TE 30** : Tétracycline, **CN 120** : Gentamicine, **P 10** : Pénicilline, **AM 10** : Ampicilline, **E 15** : Erythromycine.

Les résultats du tableau 10 montrent que les différents antibiotiques possèdent des effets presque similaires sur les bactéries étudiées et parmi lesquelles les souches les plus résistantes aux antibiotiques sont *E. cloacae* et *P. aeruginosa*. Alors que le reste des souches bactériennes, *E. coli*, *B. cereus*, *S. hominis* et *P. mirabilis* sont sensibles à la plupart des antibiotiques avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 35 mm. Il est évident de conclure que

la majorité des souches bactériennes utilisées dans cette étude présentent des phénomènes de résistances aux antibiotiques. Les antibiotiques CN120, TE30, AK30 et CIP5 sont les plus efficaces vis-à-vis des souches testées (figure 75). Tandis que le reste des antibiotiques montre un effet moindre où les différentes souches présentent une résistance variable d'un antibiotique à un autre.



**Figure 75 : Sensibilité des souches bactériennes aux différents antibiotiques**

**F300:** Nitrofurantoin, **CIP5:** Ciprofloxacine, **CAZ30:** Ceftazidime, **SXT 25:** Triméthoprime/sulfaméthoxazole, **AMC 30 :** Amoxicilline/clavulanate, **TE 30 :** Tétracycline, **CN 120 :** Gentamicine, **P 10 :** Pénicilline, **AM 10 :** Ampicilline, **E 15 :** Érythromycine.



## 6.2. Méthode de diffusion sur gélose

Les différentes bactéries testées sont classées en fonction du diamètre de leur destruction: *Sensibles* si la zone d'inhibition est supérieure à 12 mm, *Modérément Sensibles* si la zone d'inhibition est comprise entre 6 et 11 mm, *Résistantes* si la zone d'inhibition est égale à 6 mm (figure 76 et tableau11).

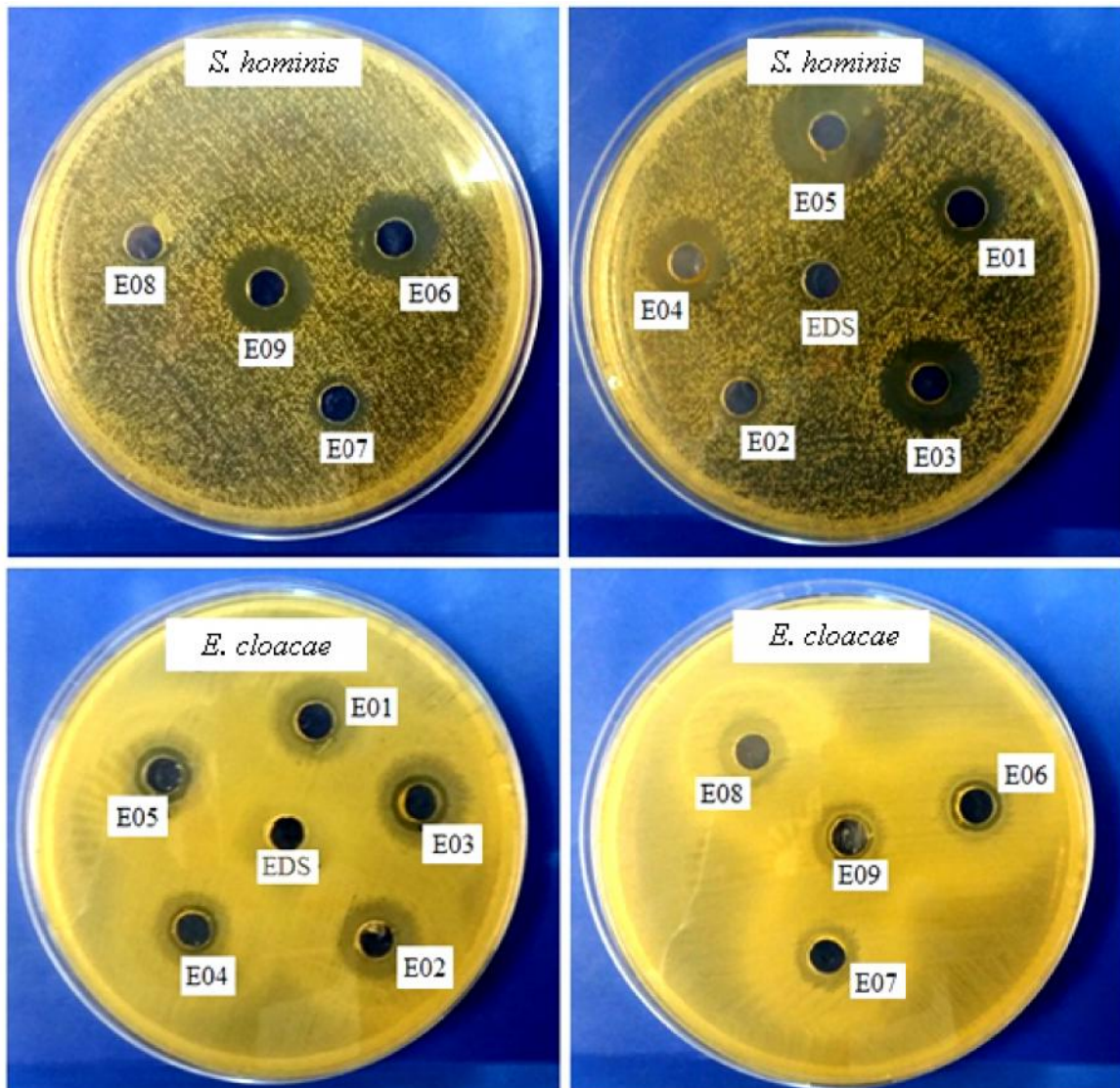


Figure 76 : Résultats de l'activité antibactérienne des miels contre les six souches étudiées [T-: Témoin négatif (EDS: Eau Distillée Stérile); E01, ... E09: Echantillons Miel].

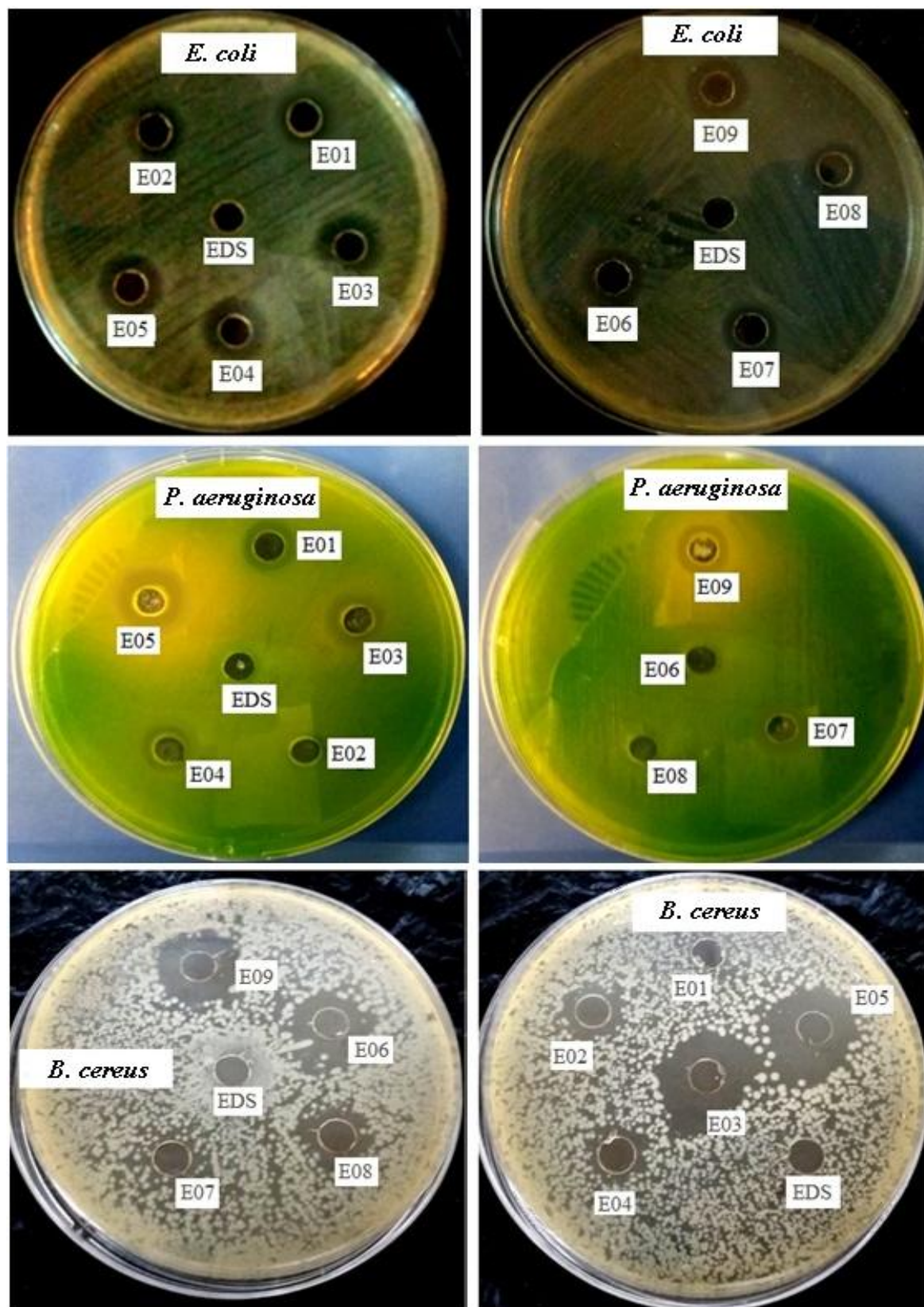


Figure 76 (Suite A) : Activité antibactérienne des miels contre des six souches testées.



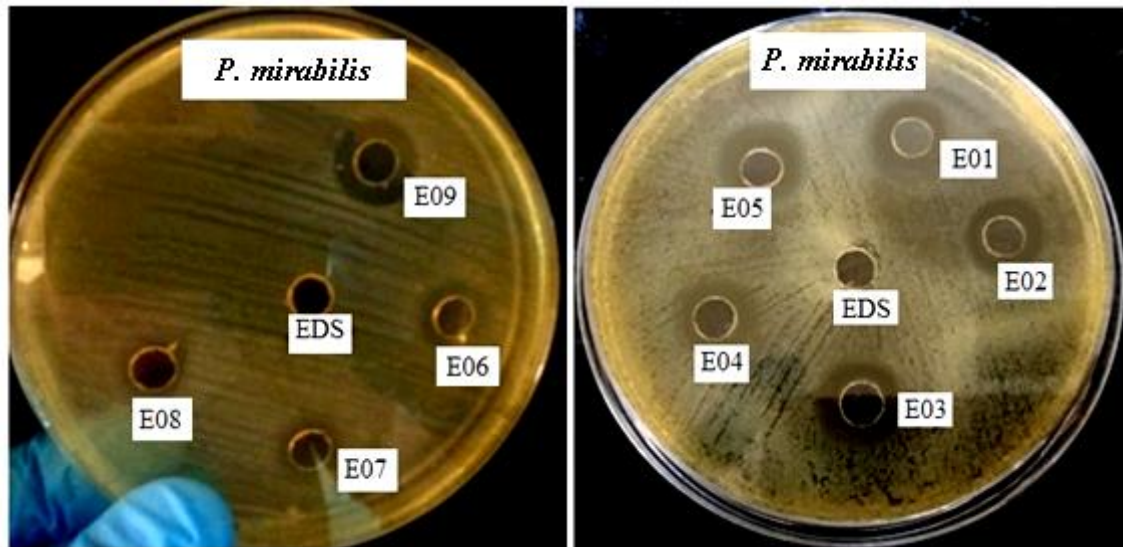


Figure 76 (Suite B) : Activité antibactérienne des miels sur les six souches expérimentées

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents échantillons de miel testés vis-à-vis des six souches bactériennes montre que la totalité des miels présente une activité antibactérienne (figure 76). Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes sont représentées dans le tableau 11.

Tableau 11: Valeurs des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes par les différents miels (en mm).

Miels	Souches bactériennes					
	<i>E. coli</i>	<i>S. hominis</i>	<i>E. Cloacae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
E01	10	10	8	8	12	11
E02	12	9	8	12	13	(-)
E03	15	18	10	18	14	12
E04	13	12	9	12	11	10
E05	13	20	10	18	14	13
E06	12	14	10	13	12	(-)
E07	12	9	(-)	10	10	11
E08	12	8	(-)	13	10	(-)
E09	14	14	9	15	14	11
Moyenne±ET	12,56±1,38	12,67±4,09	09,14±0,86	13,22±3,25	12,22±1,59	11,33±0,98

Au vu des résultats, les quatre bactéries testées sont toutes sensibles ou modérément sensibles aux différents miels testés avec des diamètres de zones d'inhibition allant de  $9,14 \pm 0,86$  mm pour *E. Cloacae* jusqu'à  $13,22 \pm 3,25$  mm pour *B. cereus*.

### 6.3. Micro-méthode en milieu liquide

Les travaux sur microplaque permettent d'étudier différentes concentrations de miel sur différentes souches de bactéries afin de déterminer la concentration minimale efficace nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne aussi la CMB peut être déterminé par ensemencement sur gélose à partir des concentrations inhibitrice (figure 77).

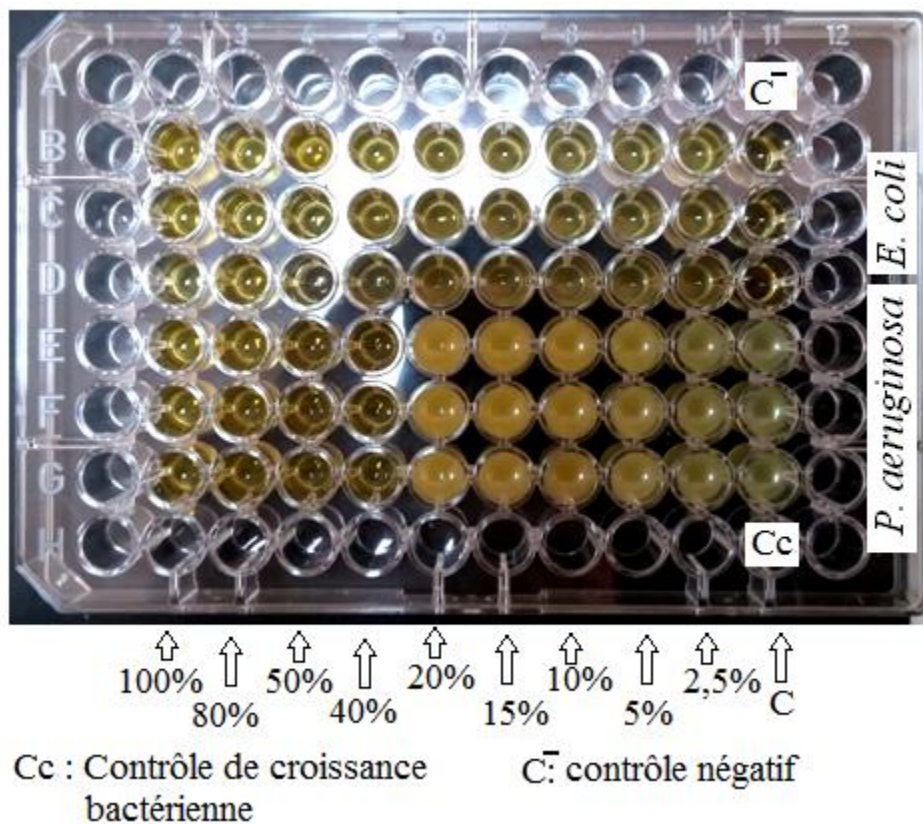


Figure 77: Effet antibactérien de miel N°01 à différentes concentrations sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant une plaque de microtitration.

Les résultats obtenus avec les différents échantillons de miel après 24h d'incubation à 37°C et utilisant 50 µl de suspension bactérienne à une concentration de  $10^8$  bactéries par ml ajoutés à 150 µl de BHI à des concentrations finales de miel de 2,5 à 100% sont rapportés dans les figures 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 et 89 ci-dessous.

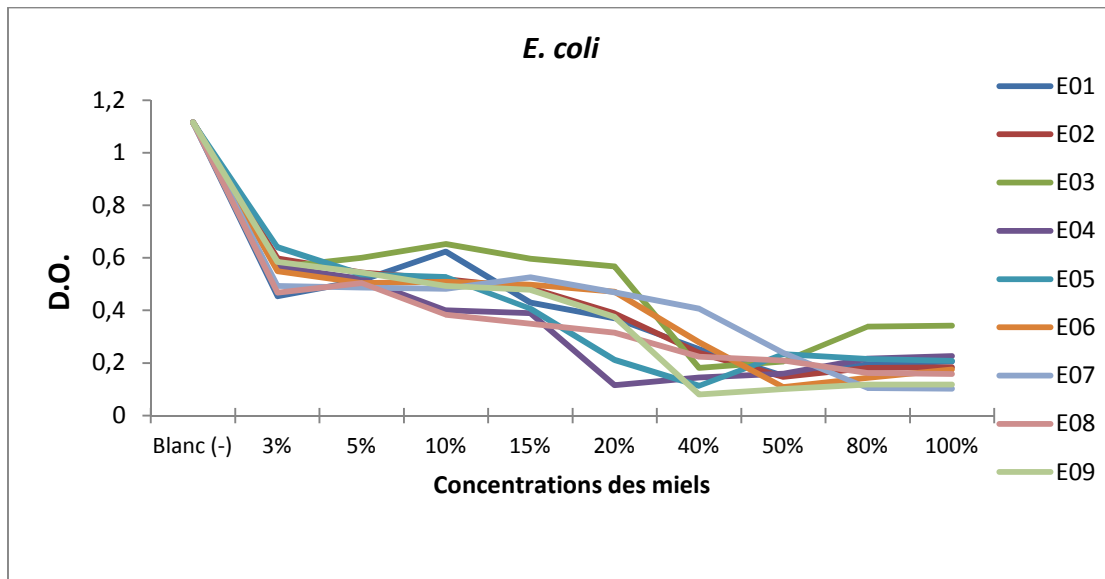


Figure 78: Activité de différents miels à différentes concentrations sur *Escherichia coli*

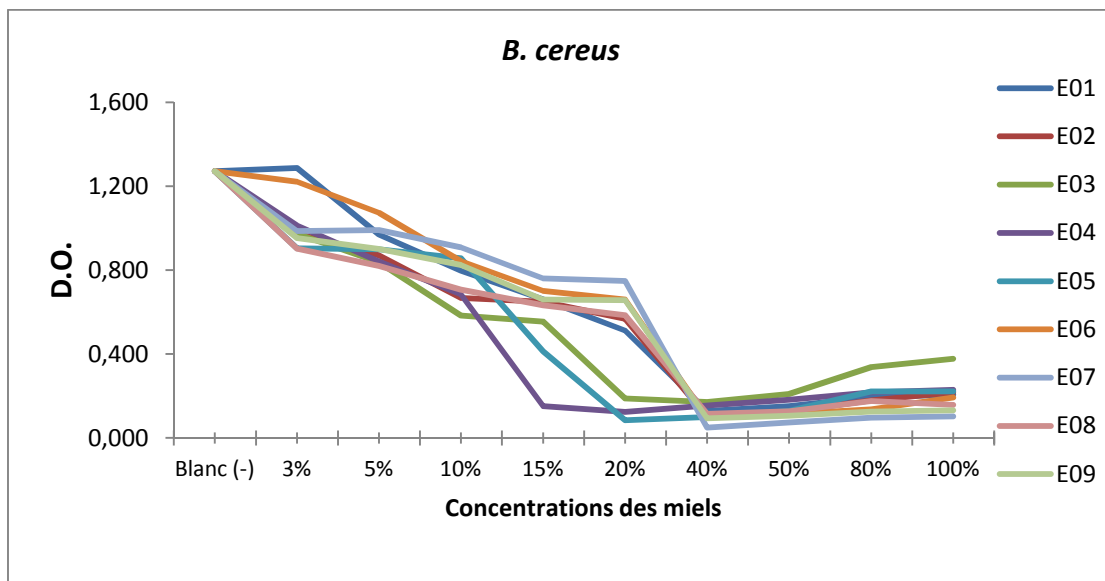


Figure 79: Activité de différents miels à différentes concentrations sur *Bacillus cereus*.

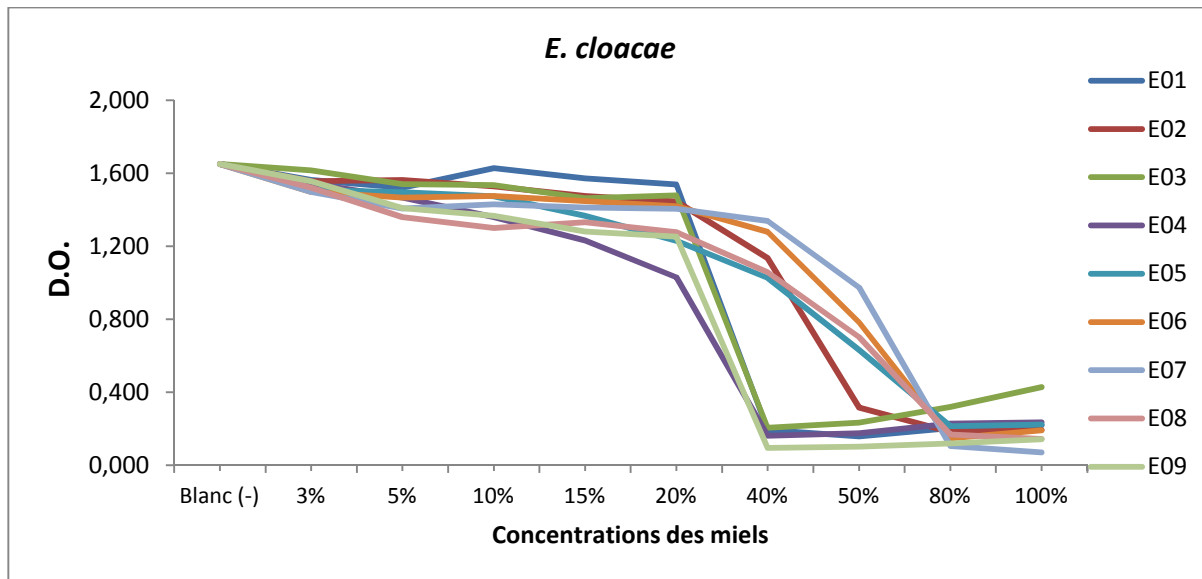


Figure 80: Activité de différents miels à différentes concentrations sur *Enterobacter cloacae*

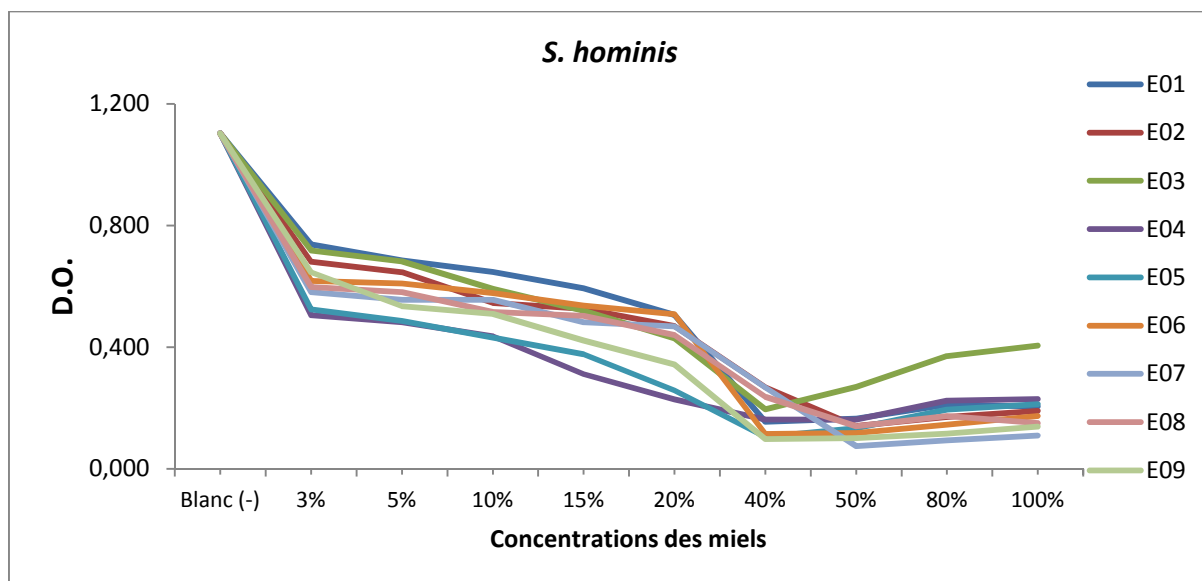


Figure 81: Activité de différents miels à différentes concentrations sur *Staphylococcus hominis*

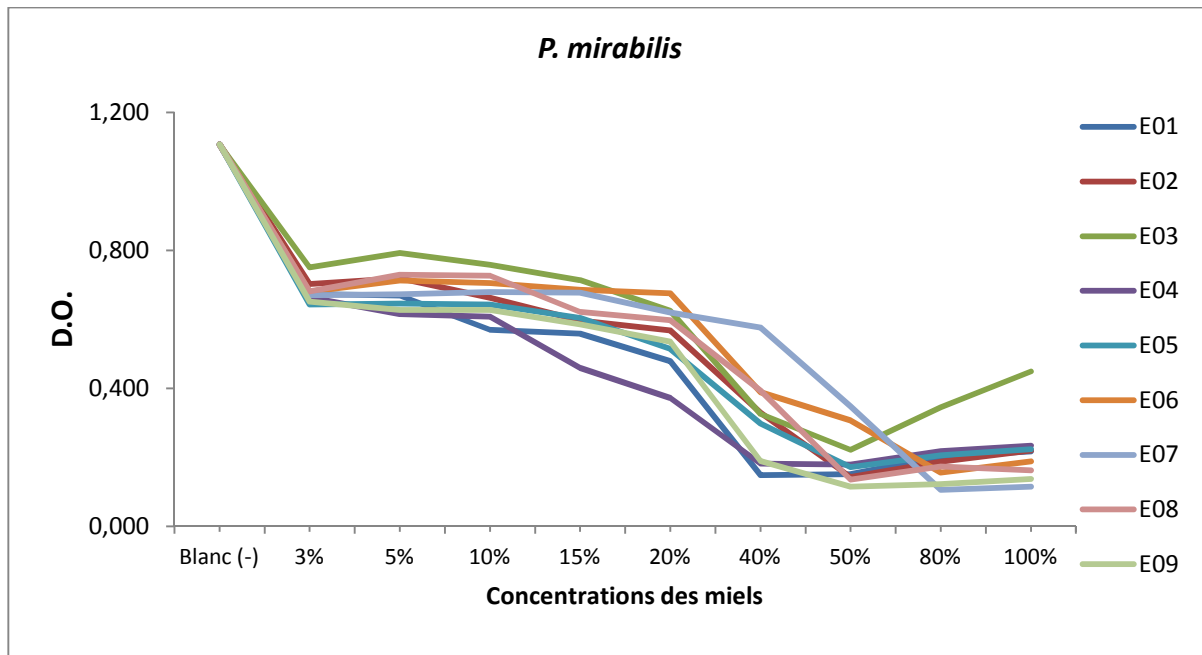


Figure 82: Activité de différents miels à différentes concentrations sur *Proteus mirabilis*.

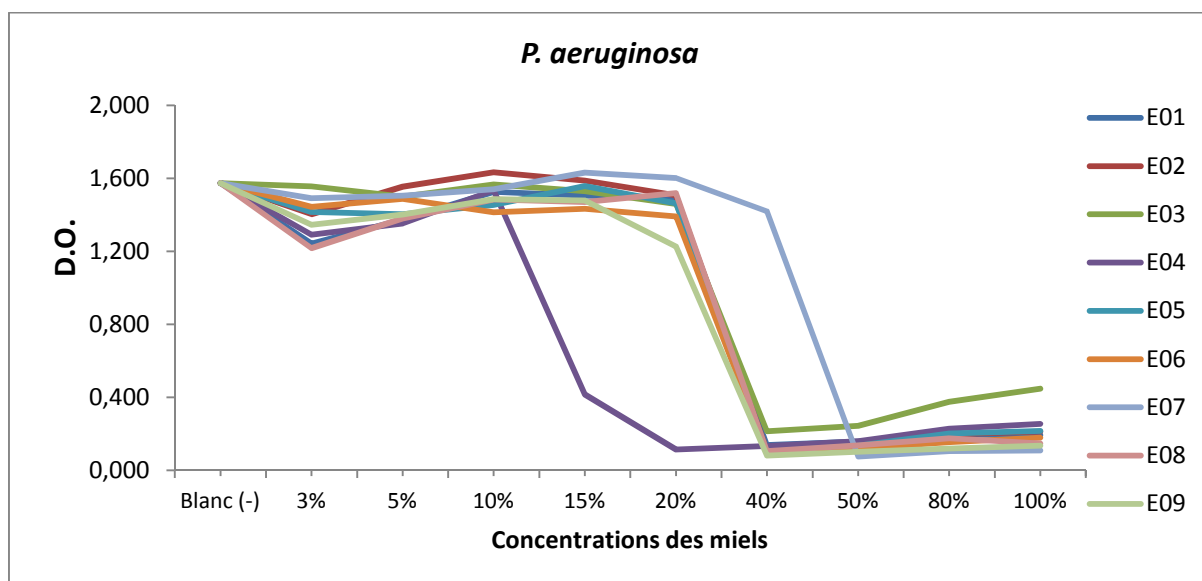


Figure 83: Activité de différents miels à différentes concentrations sur *Pseudomonas aeruginosa*.



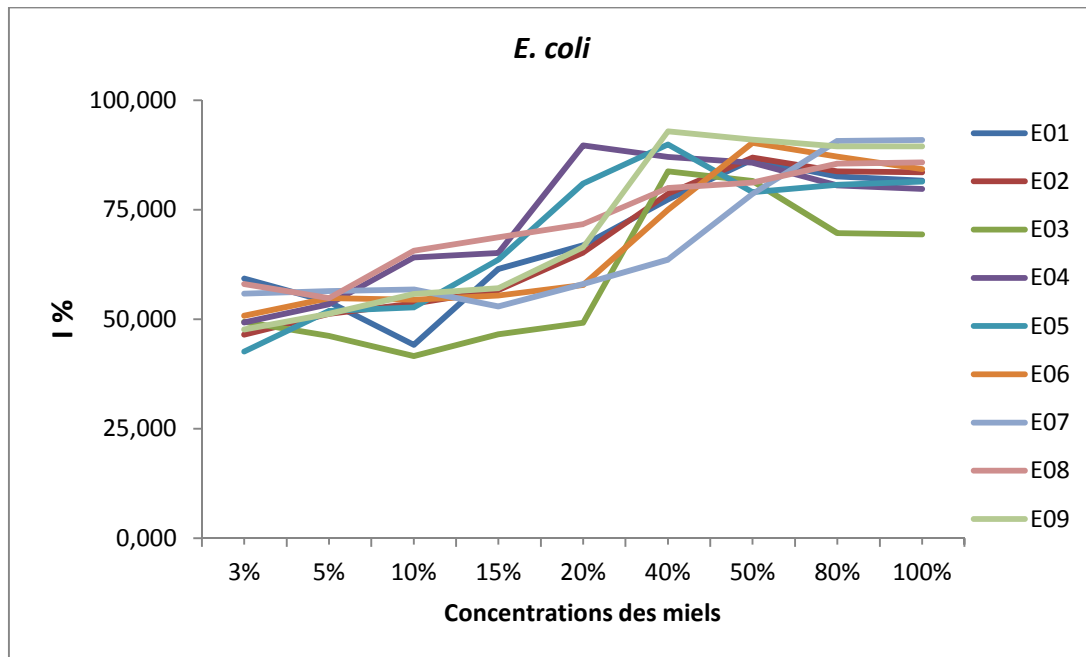


Figure 84: Variation du pourcentage d'inhibition (I%) d'*E. coli* en fonction des concentrations des différents miels.

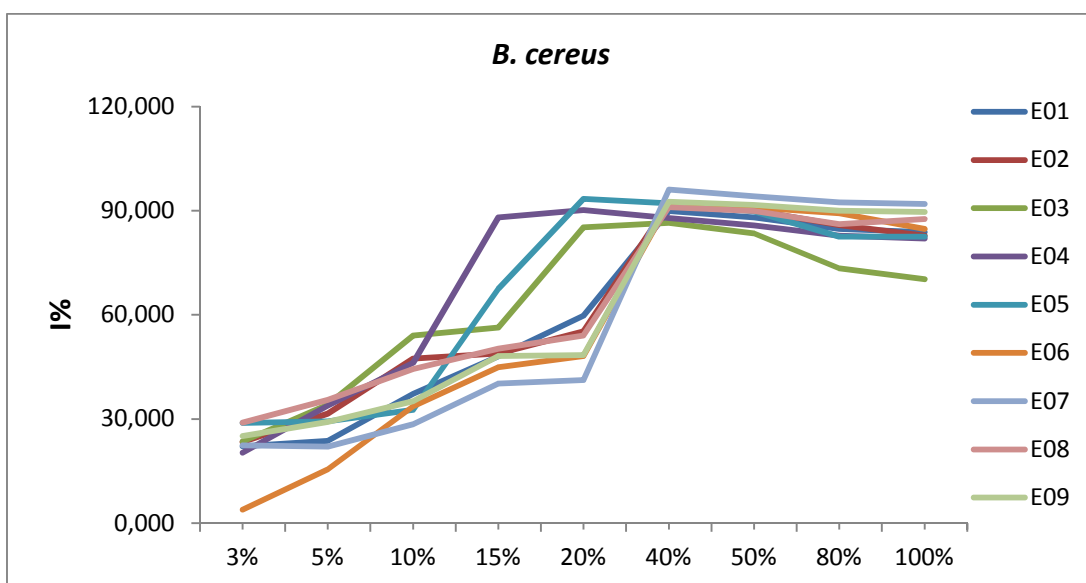


Figure 85: Variation du I % de *Bacillus cereus* en fonction des concentrations des différents miels.

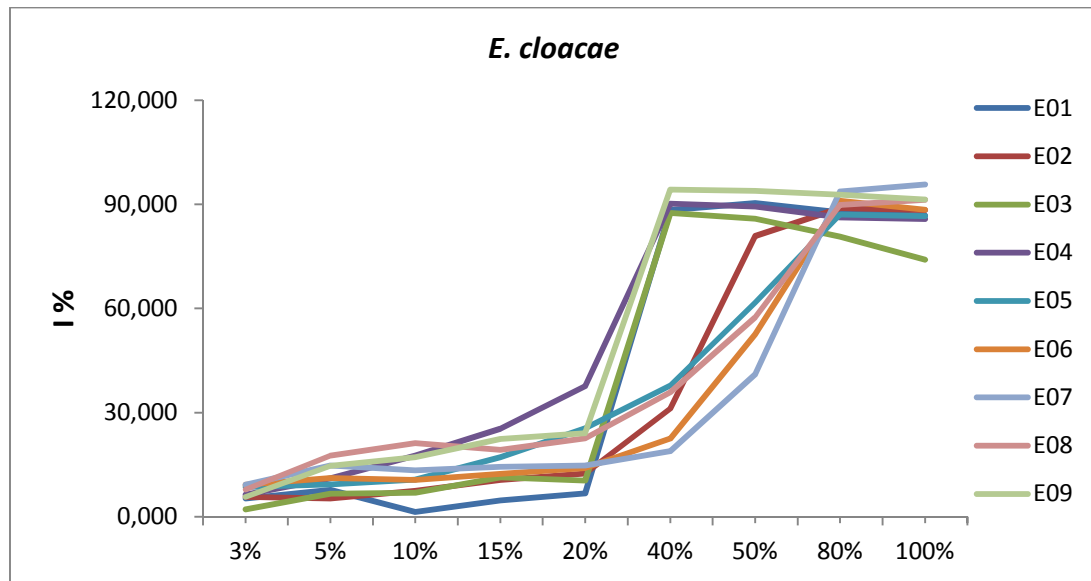


Figure 86: Variation de I% d'*Enterobacter cloacae* en fonction des concentrations des différents miels.

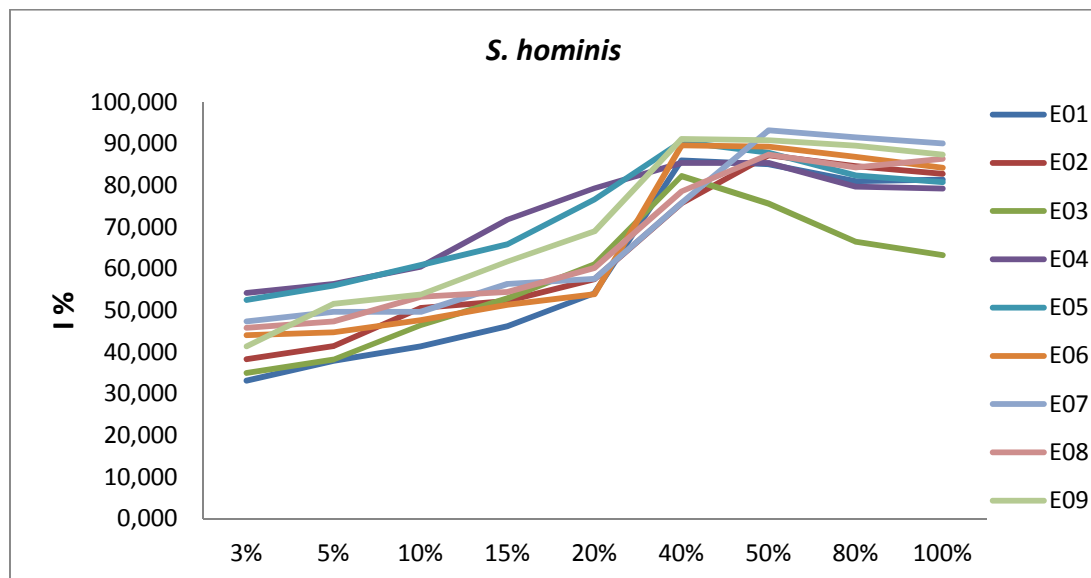


Figure 87: Variation de I% de *Staphylococcus hominis* en fonction des concentrations des différents miels.

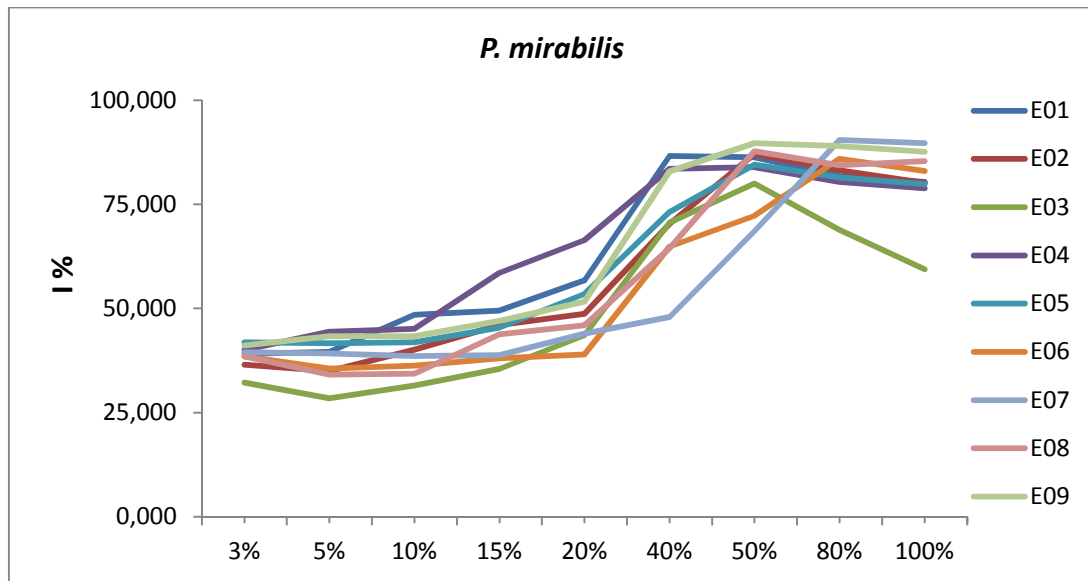


Figure 88: Variation de % d'inhibition de *Proteus mirabilis* en fonction des concentrations des différents miels.

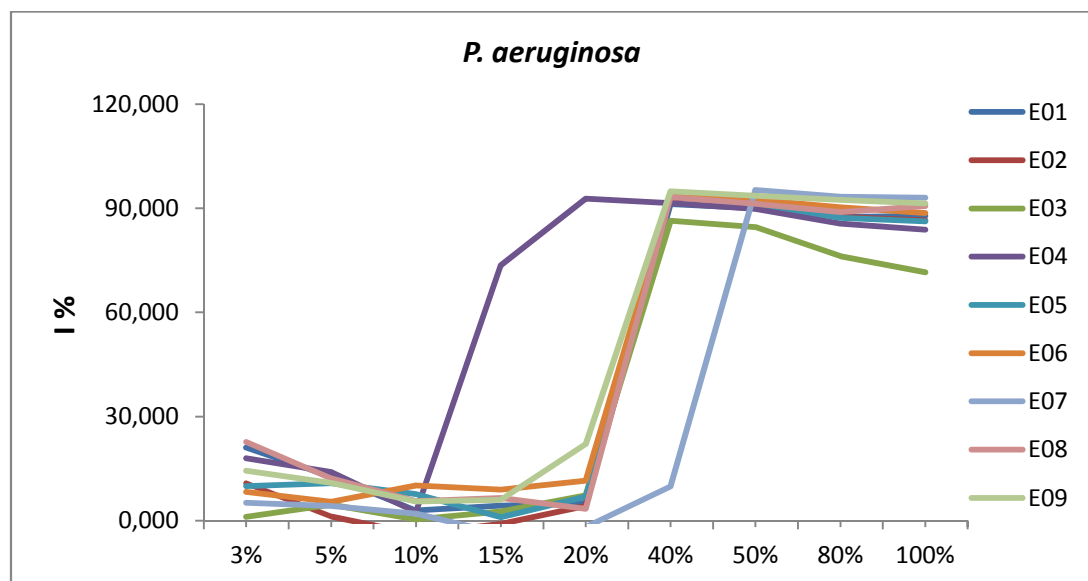


Figure 89: Variation de % de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction des concentrations des différents miels.

Les figures 77, 78, 79, 80, 81 et 82 précédentes montrent la variation des valeurs de la densité optique (DO) ou l'absorbance pour chaque souche en fonction de la concentration des miels étudiés. En général les valeurs de la DO diminuent avec l'augmentation de la concentration en miel de 2,5 à 100%. Une chute des valeurs de la DO est observée à partir de la concentration de 20% de miel. La même constatation est faite pour tous les miels testés contre les différentes souches bactériennes. Il y a donc une diminution de la croissance bactérienne qui se traduit par une diminution de la turbidité du milieu de culture. Cependant, une légère augmentation des valeurs de la DO est constatée pour certains miels à partir de la concentration de 80%. Cette augmentation est très remarquable pour l'échantillon N°03 qui présente une couleur très foncée ce qui explique l'augmentation des valeurs de la DO. Les résultats de la détermination des valeurs de la CMI et la de la CMB confirment cette explication puisque les souches bactériennes sont inhibées à partir de la concentration de 40% pour la plupart des miels testés (*tableau12 et figure 90*).

Les pourcentages d'inhibition des souches bactériennes sont calculés à partir des valeurs de la DO obtenues. Les résultats de ces calculs sont indiqués dans les figures 83, 84, 85, 86, 87 et 88 précédentes. Contrairement aux valeurs de la DO, une augmentation des pourcentages d'inhibition (I%) est constatée avec un accroissement de la concentration en miel de 2,5% à 100%. Les résultats montrent des pourcentages d'inhibition très élevés à partir de la concentration de 20% pour tous les miels vis-à-vis les différentes souches bactériennes. Cela montre l'effet inhibiteur des miels devant les souches bactériennes pathogènes testées et confirme ainsi les activités antibactériennes réalisées en milieu liquide sur une plaque de microtitration (*figure 76*).

#### **6.4. Détermination de la CMI et CMB**

Les données relatives à la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des miels vis à vis de chaque souche bactérienne sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales bactéricides (CMB) des miels vis-à-vis de chaque souche bactérienne (%)

		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus.</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. hominis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
E01	<b>CMI</b>	40%	40%	40%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	> 100%	> 100%	100%	> 100%	100%	40%
E02	<b>CMI</b>	40%	40%	50%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	80%	> 100%	> 100%	100%	100%	40%
E03	<b>CMI</b>	40%	20%	40%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	50%	> 100%	100%	> 100%	100%	40%
E04	<b>CMI</b>	15%	15%	40%	15%	40%	15%
	<b>CMB</b>	50%	> 100%	100%	> 100%	> 100%	20%
E05	<b>CMI</b>	15%	15%	80%	40%	40%	20%
	<b>CMB</b>	50%	100%	100%	100%	80%	40%
E06	<b>CMI</b>	40%	40%	40%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	50%	80%	100%	50%	80%	50%
E07	<b>CMI</b>	40%	40%	40%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	80%	> 100%	100%	> 100%	> 100%	80%
E08	<b>CMI</b>	40%	40%	80%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	100%	> 100%	> 100%	> 100%	100%	80%
E09	<b>CMI</b>	40%	15%	40%	40%	40%	40%
	<b>CMB</b>	40%	> 100%	50%	> 100%	50%	40%

Les données présentées dans le tableau indiquent que les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des miels varient de 15 à 80% soit 0,15 à 0,8 g/ml. Après l'ensemencement sur milieu gélosé, les valeurs des CMB obtenues à l'encontre des bactéries Gram positif et Gram négatif varient de 20% à des concentrations supérieures à 100% de miel soit 0,2 à plus de 1g/ml (Tableau 12 et figure 90). Il en résulte que toutes les souches sont affectées par les miels et que le degré d'inhibition de leur croissance varie en fonction de la souche bactérienne considérée et le type de miel.

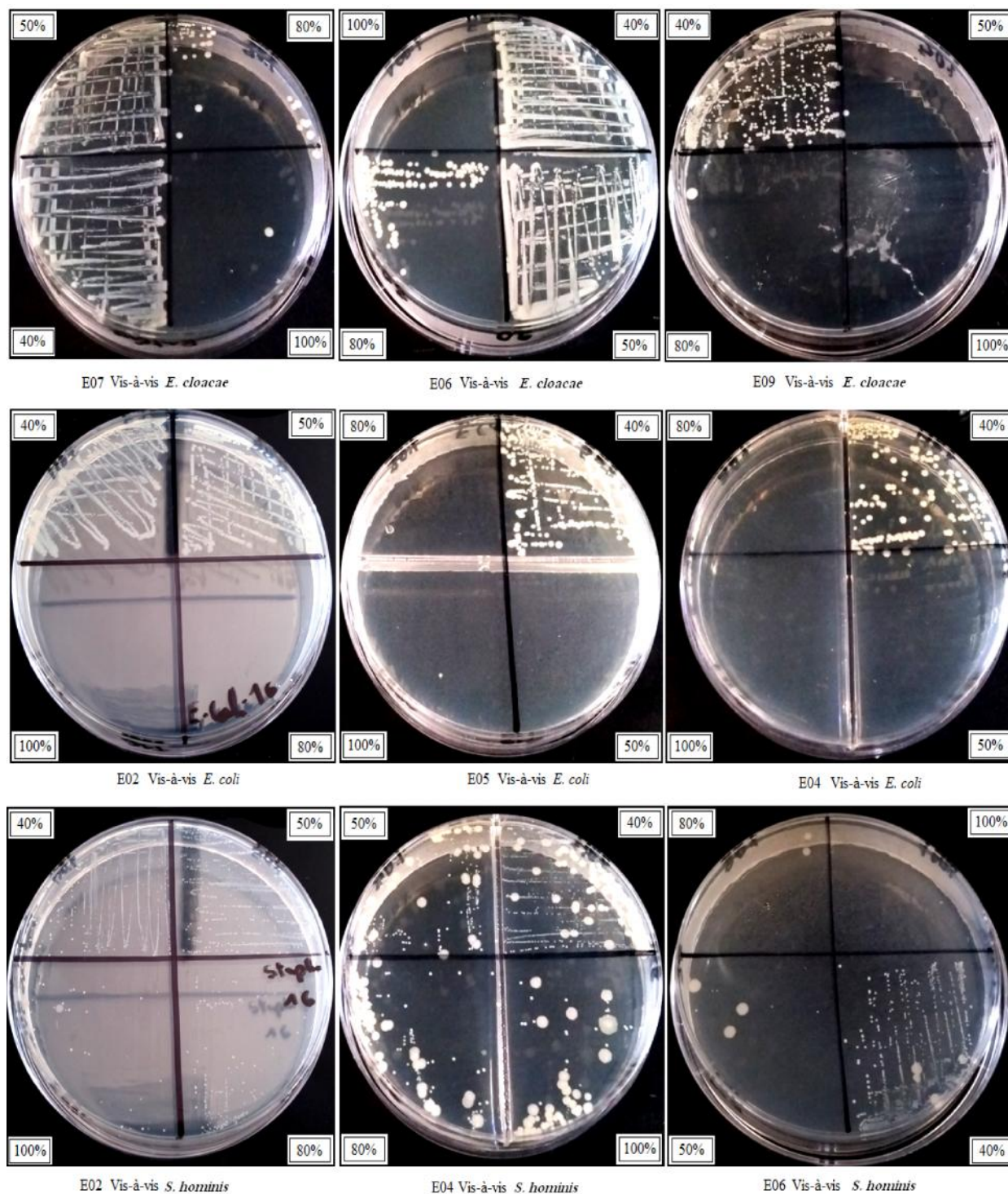


Figure 90: Détermination des valeurs de CMB



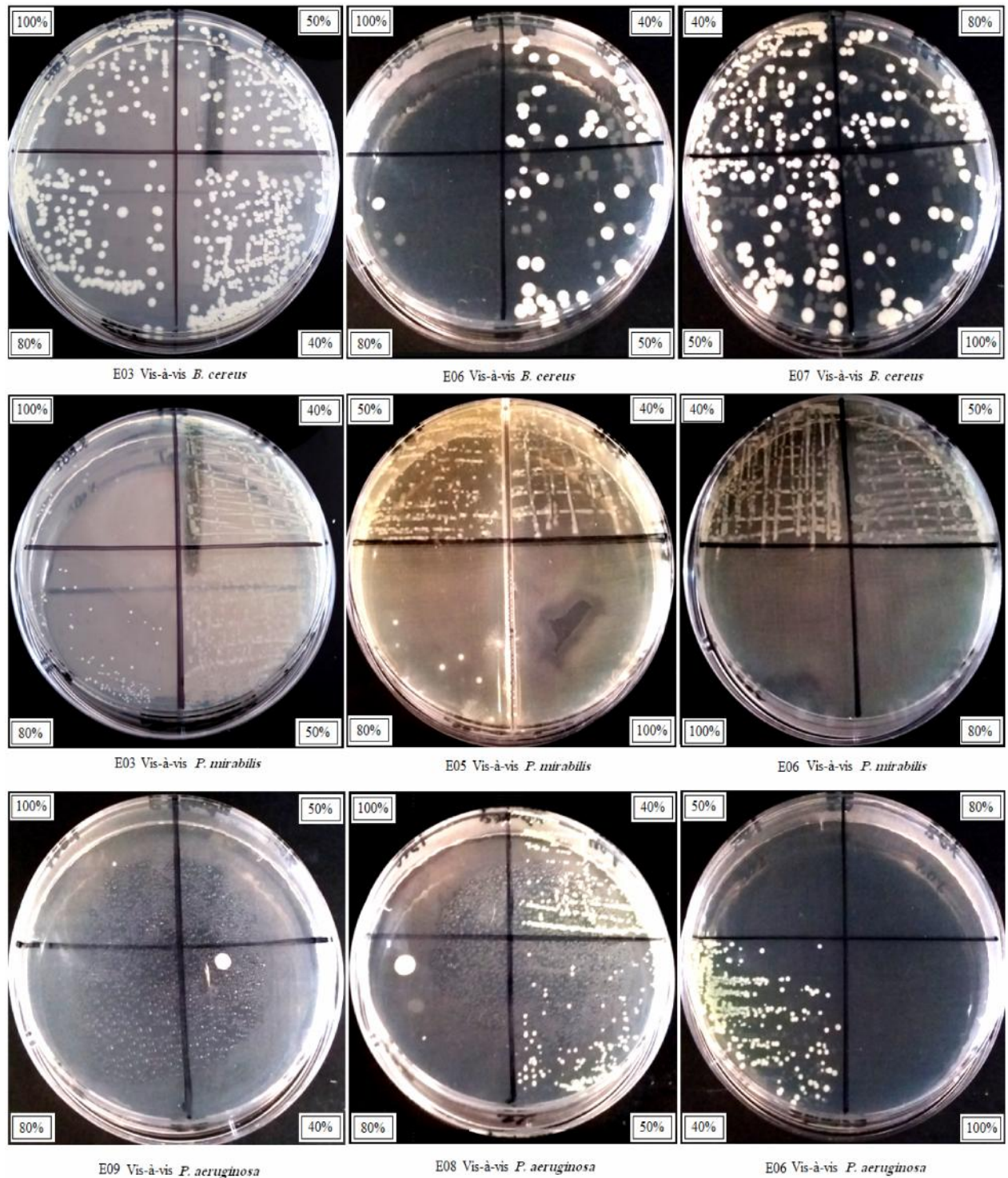


Figure 90: Déterminations de valeurs de CMB (Suite)

Nos résultats montrent que les différentes variétés de miel semblent avoir une activité antibactérienne sur les six souches testées à partir d'une concentration faibles de 2,5% et 5%. La concentration minimale inhibitrice pour la plupart des miels est proche ou égale à 40%.



Alors que la concentration minimale bactéricide (*figure 90*) est établie avec des concentrations fortes en miel soient 80%, 100% et plus.

### 6.5. Discussion

La résistance des bactéries pathogènes représente un problème critique pour la médecine moderne dans le monde entier (WHO, 2014) et par conséquent, les efforts scientifiques se développent pour lutter contre les infections bactériennes avec la médecine alternative utilisant le miel comme thérapie antibiotique classique (Molan, 1997). Le spectre d'activité du miel est large et couvre en particulier tous les germes mis en cause dans les infections cutanées : *Proteus mirabilis*, *Proteus species*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcesens*, ...etc. (Balas F. (2015).

Les résultats de notre étude indiquent que la sensibilité des souches Gram-positives (*Staphylococcus hominis*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*) aux différents miels est beaucoup plus élevée que celle des Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae*) qui montrent une résistance devant les miels étudiés. Bien que les deux souches bactériennes Gram-positif et Gram-négatif sont sensibles au miel, certaines bactéries Gram-négatives (*Salmonella dublin* et *Shigella dysenteriae*) sont plus sensibles que les souches Gram positif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) (Bogdanov, 1984). Cette activité antibiotique s'explique par plusieurs facteurs : Un effet osmotique, dû à la forte teneur en sucre, un pH acide constituant un milieu défavorable pour les bactéries, des substances antibiotiques d'origine animale avec la glucose-oxydase qui permet une libération continue et prolongée de faibles doses de peroxyde d'hydrogène et des substances antibiotiques d'origine végétale dont le rôle peut être important (Benoit, 2004).

L'effet antibactérien du miel est principalement manifeste contre les bactéries à Gram positif (Marcucci *et al.*, 2001). Cet effet est très complexe en raison de l'implication de plusieurs composés et en raison de la grande variation des concentrations de ces composés dans les miels. Plusieurs études sur des miels algériens (Moussa *et al.*, 2012 ; Bourabah *et al.*, 2014 ; Nedji et Loucif-Ayad, 2014) et différents miels dans le monde (Dustmann, 1979; Molan, 1992 ; Bogdanov, 1997; Taormina *et al.*, 2001 ; Mundo *et al.*, 2004 ; Tumini *et al.*, 2005 ; Sesta, 2006; Baltrusaityte *et al.*. 2007; Rindt *et al.*, 2007; Hyungjae *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2008; Mavric *et al.*, 2008 ; Adetuyi *et al.*, 2009; Tajik et Jalali, 2009; Osho et Bello, 2010; Sherlock *et al.*, 2010 ; Halawani et Shohayeb, 2011), ont prouvé l'effet antibactérien de ce produit alimentaire précieux sur différentes bactéries pathogènes.

Les travaux de [Molan, 1992](#) et [1997](#) offrent un aperçu complet des substances antibactériennes et des effets du miel.

- *Effet du pH* : le pH du miel est relativement acide, il varie entre 3.2 et 4.5, cette acidité est principalement due à sa teneur en acide gluconique et en gluconolactone. Le pH du miel semble être suffisamment bas pour ralentir ou éviter la croissance de nombreuses espèces pathogènes ([Bogdanov et Blumer, 2001](#)).

- *Osmolarité* : [Yatsunami et Echigo, 1984](#) suggèrent que cette activité du miel est associée à une haute concentration en sucre, à de basses valeurs du pH et à l'accumulation du dioxyde d'hydrogène. La teneur en eau du miel est comprise entre 15 et 18%. Il agit ainsi de la manière osmotique qui absorbe l'eau des agents pathogènes.

- *Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$*  : l'activité antibactérienne de certains miels dépend de leur contenu en peroxyde d'hydrogène endogène ([Brudzynski, 2006](#)). L'eau oxygénée aussi appelée peroxyde d'hydrogène est considérée comme la principale inhibitive du miel ([Bogdanov et Blumer, 2001](#)).

- *Le Methylglyoxal* : Plusieurs recherches ont attribué l'effet antibactérien élevé du miel de Manuka en New Zealand au methylglyoxal qui est présent avec une concentration de 800 mg/kg dans le miel de Manuka mais inférieure dans les miels classiques avec des concentrations allant de 1 à 10 mg/kg. Cela explique son effet antibactérien élevé. Cette activité non-peroxydique reste stable sous l'effet du chauffage et de la lumière ([Adams et al., 2009](#)).

- *Autres substances antibactériennes* : en plus que l' $H_2O_2$  qui est produit dans les miels conventionnels par la glucose oxydase, plusieurs autres facteurs non-peroxydique se trouvent pour être responsable de cette activité antibactérienne unique du miel ([Simon et al., 2008](#)). Ces substances antibactériennes sont surtout des lysozymes, des flavonoïdes, des acides aromatiques, des substances volatiles et autres composants indéterminés ([Russell et al., 1988](#) ; [Bogdanov et Blumer, 2001](#) ; [Allen et al., 1991](#)).

On peut expliquer aussi la différence des degrés d'inhibition entre les différents échantillons par les différentes origines florales possédant des activités inhibitrices différentes sur diverses souches bactériennes. ([Lalomiteanu et Daghie, 1973](#) ; [Bogdanov, 1979](#) ; [Molan et al., 1988](#) ont rapporté une relation entre l'activité antibactérienne et la source florale du miel. Ils ont utilisé le miel de Manuka qui possède une activité antibactérienne significativement plus élevée que celle d'autres sources florales. Ces résultats sont corroborés par l'étude réalisée par [Je-Ruei Liu et al., 2013](#) qui montre une activité antibactérienne de six

échantillons de miel de différentes origines florales connues. Ces auteurs ont rapporté que l'effet inhibiteur de ces miels est variable devant des bactéries pathogènes Gram négatives et Gram positives et que cette variation de l'effet antibactérien d'un miel à l'autre est due à leurs teneurs variables en polyphénols et en flavonoïdes.

En général, l'action antibactérienne de nos échantillons de miels a été prouvée, Il faut noter aussi, qu'en fonction de sa concentration et de son origine botanique, un miel peut être bactéricide (c'est-à-dire qu'il peut totalement tuer les bactéries) ou être bactériostatique (les bactéries ne sont pas tuées, mais leur développement est stoppé) (Hoyet C., 2005) ;

Des différences importantes de sensibilité des bactéries à différents miels sont observées et doivent être prises en compte dans la sélection de miels à usage médical (Assie Benoit, 2004). En outre, L'importance de l'action anti-inflammatoire et anti-oxydante de certains composants du miel est établie, mais seule l'action antibactérienne est mesurable et standardisable. Il est par conséquent important d'identifier la nature de chacun de ces composants et de poursuivre des recherches afin de sélectionner un miel donnant les meilleurs résultats thérapeutiques et nutritionnels (Assie Benoit, 2004).

# Conclusion



---

## Conclusion

Le miel est un composé biologique très complexe dont la composition qualitative dépend de nombreux facteurs comme la race des abeilles, l'état physiologique de la colonie, les conditions météorologiques lors de la miellée, la nature de la flore visitée et du sol et les processus de récolte et de conditionnement (chauffage excessif, fermentation,... etc.). L'étude des paramètres physico-chimiques est un bon critère de qualité du miel, souvent utilisé dans le contrôle de routine. Les caractéristiques physico-chimiques du miel de la région de l'ouest Algérien sont conformes aux normes proposées par la commission du Codex Alimentarius.

L'Algérie de part sa superficie et ses différents climats se voit pourvue d'une grande richesse en plantes mellifères (nectarifère et pollinifère) et d'une floraison qui peut s'étendre pratiquement tout au long de l'année. La Méliissopalynologie a permis l'identification de 10 genres et 23 espèces végétales. En effet, l'analyse du spectre pollinique du miel de chaque point de prélèvement ne peut se différencier de celui des miels des régions voisines que par des formes d'importance locale à titre d'exemple : Les espèces végétales mellifères comme l'*Eucalyptus sp.*, *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba*, *Daucus carota*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, et *Papaver rhoeas* sont prédominantes dans les miels étudiés, ce sont les espèces omniprésentes dans la majorité des spectres polliniques, ce qui montre la présence d'une ressource mellifère importante dans la région de l'ouest Algérie. Selon les taxons butinés, les échantillons des miels analysés contiennent une quantité variable de pollens. Cependant, la majorité d'entre eux sont très riches.

Le miel est le produit issu de la nature. Il n'échappe donc pas à la pollution de l'environnement. En effet, les miels peuvent contenir des résidus de métaux lourds, de pesticides utilisés dans l'agriculture et d'antibiotiques issus de la pratique apicole. Les résultats de recherche de certains contaminants comme les résidus de chloramphénicol et certains métaux toxiques (Pb et Cd) indiquent que les échantillons de miel prélevés de points différents de la région ouest d'Algérie, sont pour la plupart de bonne qualité chimique, répondant aux normes imposées, sauf pour le miel N°08 provenant de Tissemsilt qui présente des traces de chloramphénicol. Les éléments traces qui sont présents dans nos échantillons de miels en quantité modérée ne présentent aucun risque pour la santé tant qu'ils sont en faibles doses et par contre participent au bon fonctionnement de l'organisme. Les éléments toxiques décelés dans les miels étudiés, ne présentent aucun risque du fait qu'ils sont en-dessous de la

limite maximale résiduelle mais à ce jour, on connaît peu les effets à long terme de leurs combinaisons sur la santé. Il est important donc de prendre des précautions indispensables pour assurer la normalisation et la rationalisation des techniques apicoles, les procédés de fabrication et les processus de stockage pour améliorer la qualité du miel.

Ce produit est doté d'une très grande diversité, lui conférant une multitude de propriétés, aussi bien sur le plan nutritionnel que sur le plan thérapeutique. Grâce à sa composition particulière, d'une grande complexité, il possède des propriétés intéressantes antioxydantes, immunomodulatrices et antibactériennes. Les différences et les similitudes dans la composition chimique des miels affectent leurs propriétés bioactives. Les teneurs en flavonoïdes et en polyphénols sont liés à l'activité antioxydante des miels. L'étude de cette dernière a montré que les miels étudiés possèdent des propriétés très puissantes à piéger les radicaux libres. Ce pouvoir antioxydant confirme les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes et l'échantillon N°03 présumé miel de forêt présente la teneur la plus élevée et par conséquent l'activité antioxydante la plus importante. En effet il existe une relation étroite entre la concentration en composés phénoliques du miel et l'origine des espèces végétales visitées par l'abeille.

En outre, la sensibilité du test ELISA choisi pour le dosage des immunoglobulines chez les souris Balb/c immunisés avec l'ovalbumine, a montré un effet immunosuppresseur très hautement significatif ( $P < 0,01$ ) à la suite de l'administration du miel 6 h avant et après l'injection d'ovalbumine. Cette activité immunomodulatrice peut être utilisée pour des applications cliniques telles que les maladies auto-immunes et les allergies. Il reste à faire des investigations complémentaires en vue de purifier ces immunosuppresseurs présents dans le miel. Par ailleurs les essais *in vitro* sur l'activité antibactérienne de miels de la région ouest d'Algérie ont montré leur efficacité contre les différentes souches pathogènes testées en milieux gélosé et liquide. Les miels étudiés possèdent un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries pathogènes Gram+ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*) qui sont plus sensibles que celles Gram- (*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*). Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* ont montré une résistance aux différents miels testés mais se sont inhibées ou éliminées à des concentrations élevées (>40%).

Les valeurs obtenues restent similaires aux études publiées sur les miels mais toute la chimie reste à explorer laissant ainsi un large champ d'étude à découvrir. Par ailleurs, le méthylglyoxal et la défensine-1 aux propriétés antimicrobiennes, secrétés par les abeilles ne font pas l'objet d'une enquête approfondie dans les études sur le miel et reste donc difficile de

déterminer si ces composés sont réellement efficaces en tant qu'agent antimicrobien. Il serait intéressant d'explorer exhaustivement ces paramètres et de les comparer avec d'autres études. Cela permet d'ouvrir une perspective intéressante dans le domaine médical et pharmaceutique où les antibiotiques jouent un rôle important dans la lutte contre les infections et les intoxications alimentaires.

Actuellement on assiste à un essor de plus en plus important des médecines naturelles ou dites douces et le miel s'inscrit dans cette tendance, le plus souvent en complément des traitements conventionnels. Il trouve ainsi des applications dans des domaines thérapeutiques très variés et contente de ce fait les exigences d'un public désireux de retrouver les moyens simples, naturels, non polluants et sains pour se soigner.



# Références Bibliographiques



### Références Bibliographiques

- 📖 Abuharfeil N., Al-Oran R. and Abo-Shehada M. (1999): « The effect of bee honey on the proliferative activity of human B- and T-lymphocytes and the activity of phagocytes », *Food and Agricultural Immunology*, 11(2): 169-177.
  - 📖 Adams C.J., Boulton C.H., Deadman B.J., Farr J.M., Grainger M.N., Manley-Harris M., Snow M.J. (2008): Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 343: 651–659.
  - 📖 Adams C.J., Manley-Harris M, Molan P.C. (2009): The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 344: 1050–1053.
  - 📖 Adetuyi F.O., Ibrahim T.A., Jude-Ojei Ogundahunsi G.A. (2009): Total phenol, tocopherol and antibacterial quality of honey *Apis mellifera* sold in Owo community, Ondo State, Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* 8:1305-1309.
  - 📖 Adler L.S. (2000): The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91; 409–420.
  - 📖 AFNOR (1984): « Méthodes d'analyse ». Produits alimentaires. Collection AFNOR, France, 455 P.
  - 📖 Aljadi A.M. and Kamaruddin, M.Y. (2004): Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.*, 85, 513–518.
  - 📖 Allen, K.L., Molan, P.C. and Reid, G.M. (1991): A survey of the antimicrobial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 817– 822.
  - 📖 Al-Mamary M., Al-Meerri A. & Al-Habori M. (2002): Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutritional Research*, 22, 1041–1047.
  - 📖 Alphandery R. (1992) : La route du miel. Nathan Ed., Paris, 23: 182-194.ISBN2.09.284760.0.
  - 📖 Al-Waili N.S. and Haq A. (2004): « Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses ». Ed. *Journal of Medicinal Food* 7 (4): 491-494.
  - 📖 Al-Waili, N. (2003): Intrapulmonary administrations of natural honey solution, hyperosmolar dextrose or hyperosmolar distill water to normal individuals and to patients with type 2 diabetes mellitus or hypertension: their effects on blood glucose level, plasma insulin and C-peptide, blood pressure and peak expiratory flow rate. *Eur J Med Res* 8(7):295–303
  - 📖 Al-Waili, N., Al-Ghamdi A., Ansari M.J., Al-Attal Y., and Salom K.Y. (2012): Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Inter. Med. Sci.* 9(9):793-800
  - 📖 Amiot M.J., Aubert S., Gonnet M., Tacchini M. (1989) : Les composés phénoliques des miels : étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles, *Apidologie*, 20(2), 115-125PP.
  - 📖 Amoros M., Sauvager F., Girre L. and Cormier M. (1992): In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 23, 231±240.
  - 📖 Andrew J.M. (2009): Standardized disc susceptibility testing method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64: 454-489.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Andronov L. (2016) : Structure quaternaire de l'ovalbumine. Site :
- 📖 [http://fr.123rf.com/search.php?word=ovalbumine&imgtype=&t\\_word=ovalbumin&t\\_lang=fr&rch\\_lang=fr&sti=mt0belx1olbzec2gcy|&mediapopup=13411903](http://fr.123rf.com/search.php?word=ovalbumine&imgtype=&t_word=ovalbumin&t_lang=fr&rch_lang=fr&sti=mt0belx1olbzec2gcy|&mediapopup=13411903).
- 📖 Anonyme (1977) : Méthodes officielles d'analyse du miel. Journal Officiel de la République française, Paris, 22 avril, 3485-3514.
- 📖 Anso J. (2012) : Du miel à volonté. D2A, N°. 1, 23 p.
- 📖 AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1976): Official Methods of Analysis. 7th Edn., Washington DC, USA. <http://ww.aoac.org>.
- 📖 AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (2000): Sugars and sugar products. In: Official Methods of Analysis. Horwitz, W. (ed.). Association of Official Analytical Chemists International, Vol. 2 No. 44, 16th Edition. Washington, DC 22 -33.
- 📖 Arakawa E.T., Tuminello P.S, Khare B.N. et Milham M.E. (2000): « Optical Properties of Ovalbumin in 0.130-2.50  $\mu\text{m}$  Spectral Region ». Ed. Biopolymers (Biospectroscopy), Vol. 62, John Wiley & Sons, Inc. 122–128 P.
- 📖 Aristotle R. (1910): In D. A. Thompson (Ed.), Natural history. 350B.C. Oxford: Oxford University Press, (1910 pp.).
- 📖 Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A. et Legret, P. (1994) : Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. J. Pharm. Belg. 49 : 462–468
- 📖 Assie B. et Descottes B. (2004) : Le miel comme agent cicatrisant. Thèse d'exercice : Médecine. Toulouse : Toulouse III, 115 p.
- 📖 Bach. J.F. (1993) : Traite d'immunologie. *Medecine science*. E D. FLAM, 187 – 224p.
- 📖 Bailey C.J., Day C., Knapper J. M. E., Turner S. L. and Flatt P. R. (1997): Antihyperglycaemic effect of saccharin in diabetic ob/ob mice, British Journal of Pharmacology, 120, 74 -78.
- 📖 Baldrige J.R. and Lacy M.J. (2000): Adjuvants. In: Howard G.C. and Bethell D. R.: Basic methods in antibody production and characterization, Ed: CRC Press, Boca Raton-USA, PP: 19-29.
- 📖 Balas F. (2015) : Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale : revue de la littérature, thèse de Doctorat En Médecine, Université De Nice Sophia-Antipolis, 85 P.
- 📖 Baltrusaityte V., Rimantas Venskutonis P. and eksteryte V. (2007): Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Food Technol. Biotechnol. 45:201-208.
- 📖 Baude M., Muratet A., Fontaine C., Pellaton M. (2011) : Plantes et pollinisateurs observés dans les terrains vagues de Seine-Saint-Denis, France, 62pp.
- 📖 Beaunier L. et Borensztajn S. (2000) : La *Microscopie électronique à valayage une loupe puissante*, Insectes pp 11-14 N°117 (2).
- 📖 Benoit A. (2004) : Le miel comme agent cicatrisant, Thèse de doctorat en médecine, université Toulouse iii-Paul Sabatier-faculté de médecine.
- 📖 Bertencelj J., Dobersek U., Jamnik M. and Golob T. (2007): Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chem., 105: 822– 828.
- 📖 Biri M. (1981) : « Tout savoir sur les abeilles et l'Apiculture », 7<sup>ème</sup> Édition. Paris. 296 p.
- 📖 Blachon G. (2011) : Détection et Quantification du Chloramphénicol Dans Le Miel Par Thermodésorption Laser à la Pression Atmosphérique Couplée à la Spectrométrie De Masse
-

## Références Bibliographiques

---

- Tandem (LDTD-APCI-MS/MS), mémoire pour l'obtention du grade de Maître es Sciences (M. Se.), Département de Physique, Génie Physique et d'Optique, Faculté des sciences et génie, Université Laval, Québec, 1-94p.
- 📖 Bogdanov S., Gallmann P., Stangaciu S. et Cherbuliez P. (2006): « Produits apicoles et santé ». ALP forum N° 41F. 52 p.
- 📖 Bogdanov S. (1984): Characterisation of antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e.und] Technologie.Food science + technology.Science +technologie alimentaire* 17: 74-76.
- 📖 Bogdanov S. (2004) : Produits apicoles, 23A Miel, Revus par le groupe d'experts « Produits apicoles» 37 P.
- 📖 Bogdanov S. (2005): Die Propolis. *Bienenmütterchen* 57 (12): 223-230.
- 📖 Bogdanov S. (2006): Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37 (1) 1-18.
- 📖 Bogdanov S. (2009): Honey as Nutrient and Functional Food: A Review. <http://www.apitherapie.ch/files/files/Honig/8HoneyNutrientFunctionalReview>.
- 📖 Bogdanov S. (1999): « Stockage, cristallisation et liquéfaction du miel ». Centre Suisse des recherches apicoles. p5.
- 📖 Bogdanov S. et Fluri P. (2001) : Qualité du miel et Résidus d'antibiotiques, Centre Suisse de recherches apicoles. 1-5 pp.
- 📖 Bogdanov S. (2009): « Honey as Nutrient and Functional Food ». Ed. Bee Product Science. Book of Honey, Chapter 7, 28 PP.
- 📖 Bogdanov S., Bieri K., Figar M., Figueirgo V., Iff D., Kanzig A., Stockli H. et Zurcher K. (1995) : « Miel définition et directives pour l'analyse et l'appréciation ». Centre suisse de recherches apicoles. PP 01-26.
- 📖 Bogdanov S., Haldimann M., Luginbuhl W. and Gallmann P. (2007): « Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects ». *Journal of apicultural reserch and bee world*. Vol : 46. N° 4. PP: 269-275.
- 📖 Bogdanov S., Imdorf A., Charrière J.D. et Fluri P. and Kilchenmann V. (2003) : Qualité des produits apicoles et sources de contamination. Centre suisse de recherches apicoles, 12 pp.
- 📖 Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R. and Gallmann P. (2008): Honey for Nutrition and Health: a Review. *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.
- 📖 Bogdanov S., Lullman C. et Martin P. (2004) : « Qualité du miel et normes internationales relatives au miel » ; rapport de la commission internationale du miel. PP : 1-2.
- 📖 Bogdanov S., Martin P. and Lullmann C. (1997): « Harmonised methodes of the european Honey Commission in *Apidologie Extra* issu, 1-59p.
- 📖 Bogdanov S. (1997): Charakterisierung von Schweizer Sortenhonigen. *Agrarforschung*, 4, 427–430.
- 📖 Bogdanov S. et Blumer P. (2001) : Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'apiculture* 98 (3): 107-114.
- 📖 Bogdanov. S., Bieri K. et Gallmann P. (2005) : « *Miels monofloraux suisses* », Centre de recherches apicoles, Station de recherches en production animale et laitière. 55p.
- 📖 Botoglou N.A. and Fletouris D.J. (2001): *Anti-Bacterial Drugs: Drug Residues in Foods*, Marcel Dekker, New York, 85–87 pp.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Bourabah A., Ayad A., Hammoudi S.M. , Boukraa L. and Benbarek H. (2014): Antimicrobial activity of Algerian honey on subclinical mastitis pathogens isolated from goat's milk, *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916 Available at [www.veterinaryworld.org/Vol.7/April-2014/12.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.7/April-2014/12.pdf).
- 📖 Bourdon J.L. & Marchal N. (1973) : In : Techniques bactériologiques. Doin, Paris, 335 p.
- 📖 Braegger C. et Zurich (2004): Prébiotiques, *Paediatrica*, Vol. 15 No. 6, 22-23p.
- 📖 Bromenshenk J.J., Gudatis J.L., Carlson S.R., Thomas J.M., Simmons M.A. (1991): Population dynamics of honey bee nucleus colonies exposed to industrial pollutants. *Apidologie*, 22, (4), 359-369.
- 📖 Brudzynski K. (2006): Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys, *Canadian Journal of Microbiology*, Volume 52, Number 12, 1 December, (10), 1228-1237 pp.
- 📖 Bruneau E. (2005): « Les analyses du miel : les paramètres physico-chimiques ». *actu Api, Cari*. Pp 1-8.
- 📖 Bruneau (1991) : L'Europe apicole. *Les Carnets du CARI*, 30 : 8-12.
- 📖 Bruneau E. (2013) : Pollen dans le miel, *Ingrédient ou constituant, abeilles & cie 1-2013 n°152* 32-35P.
- 📖 Buba F., Gidado A. and Shugaba A. (2013): Analysis of Biochemical Composition of Honey Samples from North-East Nigeria, *Journal of Biochemistry & Analytical Biochemistry*, volume (2), 2-7 PP.
- 📖 Burmester G-R. et Pezzutto A. (2000): « Atlas de poche d'immunologie », Ed : Médecine sciences Flammarion, Paris, 315 P.
- 📖 Cabannes B. et Gautier M. (2013) : Guide pour la mise en place de plantations Mellifères, CRPF PACA.
- 📖 Caillas A. (1927): « Les produits de la ruche : leurs composition et leurs usage pratiques » PP 95-105.
- 📖 Casida, J.E., Quistad, G.B. (1998): Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual review of entomology* 43, 1–16p.
- 📖 Cerceaur M-Th., Hideux M., Iachkar G., Masure E., Renault-Miskowsky J., Roland F., Taugourdeau-lantz J., Ybert J-P. (1976) : Application du microscope électronique à balayage (M.E.B.) à la paléontologie et à la sédimentologie, *Travaux Du Laboratoire De Micropaléontologie*, Paris, 230-277.
- 📖 Chakir A., Romane A., Barbagianni N., Bartoli D. and Ferrazzi P. (2011): Major and Trace Elements in Different Types of Moroccan Honeys, *Rev.Australian J. of Basic and App Scien.*, (5)223-231.
- 📖 Charpentier G. (2013) : Etude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'Apis mellifera élevées in vitro. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse. <http://thesesups.ups-tlse.fr/2094/>.
- 📖 Chataway, H. D. (1933): The Determination of Moisture in Honey by the Hydrometer Method. *Can. J. Res.* 8: 435-439.
- 📖 Chauzat M.P. et Pierre J. (2005): « Importance du pollen pour l'abeille domestique : Le pollen et ses composants ». Ed : Bull. Tec. Apic Vol : 32. PP : 11-17.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Chauzat M.-P., Faucon J.-P., Martel A.-C. (2006): A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France, *Journal of Economic Entomology*, vol. 99, n°2, 253-262 p.
- 📖 Chepulis L.M. (2008): « An Investigation of the Health Benefits of Honey as a Replacement for Sugar In the Diet ». Ed. *Journal of Food Science*. PP 260.
- 📖 Clement H. (2003): « Les cahiers de l'élevage : créez son rucher ».Ed. Rustica Paris. Pp 90-91.
- 📖 Clement M.C., Marmion V. et Lobreau-Callen D. (2000): « Les miels ». Ed. *Techniques de l'ingénieur*. PP 35.
- 📖 Codex Alimentaire (1977): « proposition pour une nouvelle norme internationale ».
- 📖 Codex Alimentaire (2008): « Normes internationales rapport de la commission internationale du miel ». p 12.
- 📖 Codex Alimentarius Commission. (1993): Standard for Honey, Ref. Nr. CL 1993/14-SH, FAO and WHO, Rome
- 📖 Codex Alimentarius (2001) : Programme Mixte FAO/OMS Sur Les Normes Alimentaires. Commission du Codex Alimentarius. ALINORM 01/25, 1-31.
- 📖 Cohen S. M., Ellwein L. B., Okamura T., Masui T., Johansson S. L., Smith R. A., Wehner J. M., Khachab M., Chappel C. I., Schoenig G. P., Emerson J. L. and Garland E. M. (1991): Comparative bladder tumor promoting activity of sodium saccharin, sodium ascorbate, related acids, and calcium salts in rats, *Cancer Research*, 51, 1766-1777.
- 📖 Collignan A. (2011) : Le séchage de produits agricoles et alimentaires, Enseignement de Master.
- 📖 Commission Internationale du Miel (2002): « Harmonised methods of the international honey commission ». Centre Suisse des recherches apicoles. 62 p.
- 📖 Commission Internationale du Miel (2009): « Harmonised methods of the international honey commission ». *Bee Product science*. 63 p.
- 📖 Conseil de l'Union Européen (2002): Council Directive 2001/110/EC of 20 December relating to honey. *Official Journal of the European Communities*. L10, 47-52.
- 📖 Cordella C.B.Y. et Moussa I. (2009): « Pister les fraudes dans les miels : L'apport des microscopies et de la spectrométrie de masse du carbone 13 ». Ed. *Chimie des aliments et du goût*. n° 330 PP 13.
- 📖 Cotte J.F. (2003): « Application de l'analyse des sucres au contrôle de l'authenticité des miels ». 3-24 PP.
- 📖 CRAPC (2016) : <http://www.crapc.dz/>
- 📖 Crousilles A. (2014) : Usages, Propriétés Antibactériennes et Physicochimie de miels Marocains, These de Doctorat en Pharmacie, Maroc, pp12.
- 📖 Dahham, S.S., Ali, M.N., Tabassum, H. & Khan, M. (2010): Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, Vol.9, No.3, pp.273-281, ISSN 1818-6769.
- 📖 Darrigol J. (1979): « Le miel pour votre santé », Ed. Maloine. Paris. p14.
- 📖 De La Fuente M., Hernanz A. and Vallejo M. C. (2005): « The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise ». *Antioxidant and Redox Signaling*; 7(9-10): 1356-66.
- 📖 Devillers J. and Pham-Delegue M.H. (2002): Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. Editions Taylor & Francis, Londres et New-York, 332 p.
-



## Références Bibliographiques

---

- 📖 Descottes B. (2009) : Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 années. *Phytothérapie*, vol. 7, n° 2, p. 112-116.
  - 📖 Domerego, R. (2007) : Les remèdes de la ruche, Monaco, Alpen Editions, 96p.
  - 📖 Donadiou Y. (2003): « Qu'est ce que le miel ? ». Chapitre I. Faculté de médecine de Paris .p 06.
  - 📖 Draiaia R., Rezki A-R., Ben nacer k. and Chefrour E. (2014): Quality of Some Algerian Honey: Study of Botanical and Some Physicochemical Parameters, *Middle-East Journal of Scientific Research* 22 (9): 1363-1371pp.
  - 📖 Dreyfuss M.F., Lotfi H., Marquet P., Debord J., Daguët J.L. et Lachatre G. (1994) : Analyse de résidus de pesticides dans des miels et des pommes par CLHP et CPG. *Analysis*, 22, (5), 273-280.
  - 📖 Duddukuri G.R., Kumar P.S., Kumar V.B. and Athota R.R. (1997): « Immunosuppressive effect of honey on the induction of allergen-specific humoral antibody response in mice ». Ed. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* Dec, 114(4): 385-8.
  - 📖 Duddukuri G.R., Vasudeva R.Y., Rao D.N. and Athota R.R. (2001): « Immunomodulation of ovalbumin-specific IgG and other classes of antibody response by honey in mice ». Ed. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 16(1), PP 89-94.
  - 📖 Dustmann, J.H. (1979): Antibacterial effect of honey. *Apiacta*, 14(1):7 11.
  - 📖 Emarah M.H. (1982): A clinical study of the topical use of bee honey in the treatment of some ocular diseases. *Bull. Islamic Med*, 2(5), 422-5
  - 📖 Eon N. (2011) : De la fleur à l'abeille, de l'abeille au miel, du miel à l'homme, Miel et autres produits de la ruche, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Nantes, Faculté de Pharmacie.
  - 📖 Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L. & Curini, M. (2007): *Phytochemistry*, 68, 939–953.
  - 📖 Erdtman G. (1952): Pollen morphology and plant taxonomy. *Angiosperms*, Almqvist et Wicksell, Stockholm, 539p.
  - 📖 Erdtman, G. (1943): An introduction to pollen analysis. New York, *Chronica botanica*.
  - 📖 Erejuwa O.O., Sulaiman S.A. and Wahab M.S. (2012) : Fructose might contribute to the hypoglycemic effect of honey. *Molecules*; 17:1900–15.
  - 📖 EU Pesticides database (page consultée le 01/10/2010), Site internet des LMR de pesticides dans l'Union Européenne, Adresse URL: [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm).
  - 📖 Ezoubeiri, A., Gadhi, C.A., Fdil, N., Benharref, A., Jana, M. and Vanhaelen, M. (2005): Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *J. Ethnopharmacol.* 99: 287-292.
  - 📖 Faliu L. (1994) : Les miels naturellement toxiques. *Revue Med. Vet.*, 145, (1), 33-36.
  - 📖 Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. & Zappal\_a, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 49–54.
  - 📖 FCF : Fédération canadienne de la faune (2015) : L'ABC de la pollinisation, Site web: <http://www.cwf-fcf.org/fr/decouvrez-la-faune/ressources/lecons/labc-de-la-pollinisation.html?referrer=https://www.google.dz/>
-



## Références Bibliographiques

---

- 📖 Fernandez Muino M.A., Sancho M.T., Simal Gandara J., Creus Vidal J.M., Huidobro J.F. and Simal Lozano J. (1995): Organochlorine pesticide residues in Galician (NW Spain) honeys. *Apidologie*, 26, (1), 33-38.
- 📖 Flamini C. (1986) : Analyse de divers types de résidus en Apiculture. Thèse de doctorat ingénieur, Université de Nice, 101 p.
- 📖 Fléché C., Cléments M-C., Zeggane S. et Faucon J-P. (1997) : Contamination des produits de la ruche et risques pour la santé humaine : Situation en France, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (2), 609-619.
- 📖 Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927): On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 27 : 627–650.
- 📖 Formicki G., Gre A., Stawarz R., Zy k B. and Gał A. (2013) : Metal Content in Honey, Propolis, Wax and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring. *Pol. J. Environ. Stud.*; 22/1:99-106.
- 📖 Fournier R. (2009): ABC de l'Apithérapie, Paris, Editions Grancher, 140p.
- 📖 Gadbin. C. (1979): « *L'intérêt de l'acétolyse en méliissopalynologie, Die Bedeutung der Acetolyse in der Melissopalynologie* », Laboratoire de Botanique historique et Palynologie, E.R. n° 404 du C.N.R.S. 6p.
- 📖 Gazzani G., Papetti A., Daglia M., Berte F., Gregotti C. (1998): Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsomes and the effect of thermal treatment. *J Agric Food Chem*; 46:4123–7.
- 📖 Gheldof N. and 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. *J. Agric. Food Chem*, 50, 3050–3055.
- 📖 Giroud, B., Vauchez A., Vulliet E., Wiest L. and Buleté A. (2013): Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Nov 5; 1316:53-61.
- 📖 Gonnet M. (1982): « Le miel : composition, propriétés et conservation ». Ed : Opida. PP 10-29.
- 📖 Gonnet M. (1991): « Ce miel : Approche d'une appréciation sensorielle visant à une meilleure définition de la qualité du principal produit de l'abeille ». In Dossier l'abeille de France n°757 PP 81-87.
- 📖 Gonnet M. (1992): « Le problème de l'HMF dans le miel ». In revue Française d'apiculture n° 301.
- 📖 Gonnet M. (1993): « Les principaux critères de la qualité d'un miel ». *Revue Française d'Apic* N° 30 PP 269-271.
- 📖 Gonnet (1986): « L'analyse des miels ». Description de quelques méthodes de contrôle de qualité. *Bull. Tech. Apic*, 54, 13 (1) PP 17-36.
- 📖 Google Earth (2016): <https://www.google.dz/maps/@35.1142252,1.9711516,8z>
- 📖 Gout J. (2009): « Le miel ». Editions Jean-Paul Gisserot, Paris, 64 p.
- 📖 Gülcin H., Alici A., Cesur M. (2005): Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53: 281-285.
- 📖 Håiborne J.B. & Smith D.M. (1978): Anthochlors and other flavonoids as honey guides in the Compositae. *Biochem. Syst. Ecol.* 6, 287-291
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Halawani E. and Shohayeb M. (2011): Survey of the antibacterial activity of Saudi and some international honeys. *J. Microbiol. Antimicrob.* 3:94- 101.
- 📖 Haoua, H., de Cormis L., and Rey J. (1990) : Le fluvalinate appliqué sur pommiers en pleine floraison: contamination des abeilles butineuses et des produits de la ruche. *Agronomie* 2: 133-137.
- 📖 Hartmann T. (2007): From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* Volume 68, Issues 22–24; 2831–2846.
- 📖 Hodnick W.F., Milosavljevic E.B., Nelson J.H. and Pardini R.S. (1988): Electrochemistry of flavonoids. *Biochem Pharmacol*; 37:2607–11.
- 📖 Hongbao M. (2006): Cholesterol and Human Health. *The Journal of American Science*, 2 (1): 46-50.
- 📖 Hooper T. (1980): « Les abeilles et le miel ». Ed. Delachaux. 260 P.
- 📖 Hoyet C. (2005) : Le miel : de la source à la thérapeutique. Thèse de doctorat : Pharmacie. Nancy : Nancy 1.
- 📖 Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- 📖 Huchet E., Coustel J. et Guinot L. (1996): Les constituants chimiques du miel. Méthode d'analyse chimique. Département de science et l'aliment. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. France. 16p.
- 📖 Hyungjae L., Churey J.J., Worobo R.W. (2008): Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *Int. J. Food Microbiol.* 126:240-244.
- 📖 Ibrahim Khalil M.D., Mohamed M., Jamalullail S.M.S., Alam N. and Sulaiman S.A. (2011): Evaluation of Radical Scavenging Activity and Colour Intensity of Références bibliographiques Nine Malaysian Honeys of Different Origin. *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 3 (1), 04 – 11.
- 📖 Ibrahim Khalil M.D., Sulaiman S.A., Alam N., Moniruzzaman M., Bai'e S., Man C.N., Jamalullail S.M.S. and Gan S.H. (2012): Gamma Irradiation Increases the Antioxidant Properties of Tualang Honey Stored Under Different Conditions, *Molecules* 17, 674-687; [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules).
- 📖 Jasper D.E. (1981): Bovine mycoplasmal mastitis. *Adv. Vet Sci. Comp. Med.* 25, 121-159.
- 📖 Jean F.C. (2014) : Les grains de pollen, Site : <http://acces.ens-lyon.fr/acces/terre/paleo/paleobiomes/comprendre/les-pollens-indicateurs-de-vegetation-et-de-climat/le-pollen-dans-le-cycle-du-vegetal>.
- 📖 Jeanne J. (1983) : « Les répulsifs chimiques en Apiculture ». Ed. OPIDA. 36 P.
- 📖 Jeanne J. (1993) : « Produits de la ruche ». In *Bull. Tec. Apic* 10 (3). P: 111-133.
- 📖 Jean-Prost P. (2005) : « Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher ». 7<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc Lavoisier .Paris. p 380.
- 📖 Je-Ruei, Liu, Ye, Yi-Ling., Lin, Ting-Yu., Wang, Yun-Wen., Peng ,Chi-Chung. (2013): Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. *Food. Chemist*, 938–943.
- 📖 Johnson S. and Jadon N. (2010): Antibiotic Residues in Honey, *Centre For Science And Environment*, 1-46 PP.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Johnson S., Jadon N., Mathur H.B. and Agarwal H.C. (2010): Study: Antibiotics Residues in Honey, Centre For Science And Environment, 1-42P.
- 📖 Jonard L., Banh L., Pressac M., Just J., Bahuau M. (2006) : Les défensines en physiopathologie humaine : Defensins in human health and disease, *Immuno-analyse et biologie spécialisée, Revues générales et analyses prospectives*, 21, 342–347.
- 📖 José M. Bastías (2013): Honey as a bioindicator of arsenic contamination due to volcanic and mining activities in Chile, *Chilean Journal Of Agricultural Research* 73(2) April-June, 147-153.
- 📖 Ka ániová M., K azovická V. and Melich M. (2009): Environmental concentration of selected elements and relation to physicochemical parameters in honey. *J Environ Sci Heal A*, 44, 414–422.
- 📖 Kaneko M., Kawakita T. and Nomoto K. (1999): « Inhibition of eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity by a traditional Chinese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name : Hochu-ekki-to) ». Ed. Dekker, Monticello, Ny, Etats-Unis. vol. 21, n°1, 125-140 pp. .
- 📖 Kenjeric D., Mandic M.L., Primorac L., Bubalo D. and Perl A. (2007): Flavonoid profile of Robinia honeys produced in Croatia. *Food Chem*102:683-690.
- 📖 Khenfer A. et Fettal. M. (2001): « Le miel ». Ministère de l'agriculture. Direction de la formation de la recherche et de la vulgarisation. 23 p.
- 📖 Kiistala R., Hannuksela M., Makinen-Kiuunen S., Niinim A. and Haahtela T. (1995): Honey allergy is rare in patients sensitive to pollens. *Allergy*, 50 (10), 844-7p.
- 📖 Kivrak ., Kivrak . and Harmandar M. (2016): Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS, *Food Sci. Technol, Campinas*, 36(1): 90-96p.
- 📖 Kubik M., Nowacki J., Pidek A., Warakomska Z., Michalczyk L. and Goszczynski W. (1999): Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie*, 30, (6), 521-532.
- 📖 Kubik M., Nowacki J., Pidek A., Warakomska Z., Michalczyk L. and Goszczynski W. (2000): Residues of captan (contact) and difenoconazole (systemic) fungicides in bee products from an apple orchard. *Apidologie*, 31, (4), 531-541.
- 📖 Kwakman P. H. S., Te Velde A. A. and De Boer L. (2010): How honey kills bacteria. *FASEB journal*, vol. 24, n° 7, p. 2576-2582.
- 📖 Kwakman P. H. S. and Zaat S. A. J. (2012): Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*, vol. 64, n° 1, 48-55 p.
- 📖 Kwakman P., Te Velde A. and De Boer L. (2011): Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity, *PLoS One*, vol. 6, n°3, 17709 p.
- 📖 Labro, M.T. (2006) : Immunomodulation médiée par les agents antibactériens. *Réanimation*, 15(4), 259-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.06.004>.
- 📖 Lakhdar L. (2015) : Evaluation de l'Activité Antibactérienne d'huiles Essentielles Marocaines sur *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* : Etude in Vitro, Thèse de Doctorat, n° : 28/14 CSVS, Faculté de Médecine Dentaire de Rabat Centre D'études Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé, Maroc, 183.
- 📖 Lalomiteaunu M. and Daghie V. (1973): Investigations of the antibiotic qualities of honey. *XXIV Int Congr Apic Proc Buenos Aires* 438-440.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Lambert O., Piroux M., Puyo S., Thorin C., L'Hostis M., Wiest L., Buleté A., Delbac F., and Pouliquen H. (2013): Widespread Occurrence of Chemical Residues in Beehive Matrices from Apiaries Located in Different Landscapes of Western France. *PLoS ONE*, 8(6): p. e67007.
- 📖 Laudine L. (2010): « Du nectar a un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur ». Ed. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon. Thèse de Docteur Vétérinaire n°085, Univ. Lyon.175PP.
- 📖 Laurent O. (2005) : Les bienfaits du miel, Paris, Editions De Vecchi S.A., 101p.
- 📖 Lefief-Delcourt A. (2010): Le miel malin. Paris, Leduc.s, 176 p.
- 📖 Leita L., Muhlbachova G., Cesco S., Barbattini R., Barbattini and Mondini R., Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination, *Rev.EnvilMoni and Asses.*, 43 (1996) 1-9.
- 📖 Louveaux J. (1985): « Les abeilles et leur élevage ». Ed. Opida. 164-181PP.
- 📖 Louveaux J. (1968a): « Composition propriété et technologie du miel ». Les produits de la ruche, in *Traité de biologie de l'abeille*. Tome 03. Ed : Masson et Cie. 389 p.
- 📖 Louveaux J. (1968b): « L'analyse pollinique des miels, in *Traité biologique de l'abeille* », Tome 3. Ed. Masson de Cie, Paris. PP 324-361.
- 📖 Louveaux J. (1976): « Caractéristiques de composition du miel ». Ed. INRA. PP 37-46.
- 📖 Louveaux J., Maurizio A. et Vorwohl G. (1970): « Les méthodes de la mélikso-palynologie », commission internationale de botanique apicole de l'U.I.S.B. 17p.
- 📖 Louveaux, J; Maurizio, A. and Vorwhol, G. (1978): *Methods of Melissopalynology*. *Bee World*. 59: 125-138.
- 📖 Makhloufi C, Schweitzer P, Azouzi B, Oddo LP, Choukri A. (2007): Some properties of Algerian honey. *Apiacta* 42: 73–80.
- 📖 Makhloufi K-M. (2011) : Caractérisation d'une Bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc Pseudomesenteroides* isolée du boza, thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie, France, 1-200 pp.
- 📖 Makhloufi, C.; Kerkvliet, D.; Ricciardelli d'albore, G.; Choukri, A.; Samar, R. (2010): Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. *Apidologie*, 41, 509–521.
- 📖 Marc Fr., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C. (2004) : Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4), 458-463.
- 📖 Marceau J., Noreau J. et Houle E. (1994): « Les HMF et la qualité du miel ». Vol.15 n° 2. Fédération des Apiculteurs du Québec .service de zootechnie, Mapaq. 04p.
- 📖 Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Valenter, P. H., Paulina, N (2001): Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacology* 74, 105-112
- 📖 Martel A.C. (2014) : Journée "Santé des abeilles : La surveillance aujourd'hui, les perspectives pour demain", ANSES, Paris - 09 décembre 2014, 1-24 pp.
- 📖 Masahiro, K., Makoto, H., Yasuo, S., Kyoichi, T. and Yasutaka, N. (1997): Fractal-like behavior of a mass-transport process. *AICHE* ; 43:2187–2193.
- 📖 Maurizio A. et Louveaux J. (1967): « Commission internationale de botanique apicole de l'UISB. P 211-227. INRA.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., & Henle, T. (2008): Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(4), 483-489.
- 📖 Mayer A.S., Donovan J.L., Pearson D.A., Waterhouse A.L. and Frankel E.N. (1998): Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *J Agric Food Chem*; 46:1783-7.
- 📖 Melin, E. (1986) : De la fleur au miel. Société Botanique de Liège, 52 p.
- 📖 Minh-Ha-Pham-Délègue k. (1999) : « Connaître et découvrir les abeilles ». Ed. Minerva. Genève. Pp 43-163.
- 📖 Mohamed M., Sirajudeen K.N.S., Swamy M., Yaacob N.S. and Sulaiman M. (2010): Studies on the Antioxidant Properties of Tualang Honey of Malaysia. *Afr. J. Trad. CAM*, 7 (1), 59 – 63.
- 📖 Molan P. C. (1996): « Authenticity of honey ». In: Ashurst P.R. and Dennis M.J. (Eds.) *Food Authentication*, Blackie Academic and Professional, London pp. 259-303.
- 📖 Molan P.E. (1998): A brief review of the use of honey as a clinical dressing. *Aust J Wound Manage*, (6), 148-58
- 📖 Molan R.C., Allen K.L. (1996): The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J. Pharm.Pharmacol.*, 48, 1206-9
- 📖 Molan P.C., Russell, K.M. (1988): Nonperoxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural, Research*, 27(1): 62-67.
- 📖 Molan, P. C. (1992): The Antibacterial Activity of Honey. The Nature of Antibacterial Activity. *Bee World*, 73(1) 15-28.
- 📖 Molan, P.C. (2006): The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(1), 40-54.
- 📖 Molan, P. C. (2009): Why honey works. In R. Cooper, P. Molan & R. White (Eds.), *Honey in modern wound management*. Aberdeen: Wounds UK Ltd.
- 📖 Molan, P.C. (1997): Honey as an antimicrobial agent. In A. Mizrahi & Y. Lensky (Eds.), *Bee Products. Properties, Applications, and Apitherapy* (pp. 27-37). New York, Springer: Science+Business Media.
- 📖 Molyneux P. (2004): The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26 (2), 211-219.
- 📖 Moussa A., Djebli N., Hammoudi S-M., Meslem A. and Aissat S. (2012): Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, Volume 5, Issue 10, Pages 773-776.
- 📖 Msda : Manuel Suisse de Denrées Alimentaires (2003): « Produits apicoles : 23A Miel ». Revue par le groupe d'experts « produits apicoles ». p 37.
- 📖 Mundo M., Padilla-Zakour O.I. and Worobo R.W. (2004): Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honey. *Int. J. Food Microbiol.* 97:1-8.
- 📖 Muñoz O. & Copaja S. (2007) : Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles Chilenas e índice antioxidante. *Quím. Nova.*, 30: 848-851.
- 📖 Nair S., Meddah B. and Abdelkader Aoues A. (2013): Melissopalynological Characterization of North Algerian Honeys, *Foods* (2), 83-89pp.
-



## Références Bibliographiques

---

- 📖 NCCLS (2002): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12.NCCLS, Wayne.
  - 📖 Nedji N. and Loucif-Ayad W. (2014): Antimicrobial Effects of Algerian Honey on Pathogenic Food-Related Bacteria, *Advance Journal of Food Science and Technology* 6(11): 1194-1200.
  - 📖 Nicolaÿ J. (2014) : Perspectives d'avenir en Apithérapie à l'officine, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Angers, UFR ; Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé, 187p.
  - 📖 Obaseiki-Ebor E.E. and Afonya T.C.A. (1984): In vitro evaluation of the anticandidiasis activity of honey distillate (IYY-1) compared to that of some antimycotic agents. *J. Pharm. Pharmacol.*, 36,283-4
  - 📖 Orsolio N. and Basic I. (2004): « Honey as a cancer-preventive agent », *Periodicum Biologorum* 106 (4): 397-401.
  - 📖 Orsolio N., Terzic S., Sver L. and Basic I. (2005): « Honey-bee products in prevention and/or therapy of murine transplantable tumours », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3): 363-370.
  - 📖 Ortelli D., Edder P., and Corvi C. (2004): "Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Chromatographia*, vol. 59, no. 1-2, pp. 61–64.
  - 📖 Osho A. & Bello O.O. (2010): Antimicrobial effect of honey produced by *Apis mellifera* on some common human pathogens. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1:875-880
  - 📖 Osman K.A., Al-Doghairi M.A., Al-Rehiyani S. and Helal M.I.D. (2007): Mineral contents and physicochemical properties of natural honey produced in Al-Qassim region, Saudi Arabia. *Journal of Food & Environment*, 5: 142–146.
  - 📖 Ouchemoukh, S., Louaileche, H. & Schweitzer, P. (2005): Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*, 18, 52–58 (<http://www.sciencedirect.com/science>).
  - 📖 Ouchemoukh S., Schweizer P., Bachir Bey M., Djoudad-Kadji H. and Louaileche H. (2010): HPLC sugar profiles of Algerian honeys. *Food Chem.*, 121: 561-568.
  - 📖 Pan C., Zhang H., Chen S., Xu Y. and Jiang S. (2006): Determination Of Chloramphenicol Residues In Honey By Monolithic Column Liquid Chromatography–Mass Spectrometry After Use Of Quechers Clean-Up, *ACTA Chromatographica*, NO. 17, 320-327 PP.
  - 📖 Parent D. et Demalsy (1989): « Analyse pollinique des miels de l'antario, Canada. *Revue Apidologie* 20 n°2. 127-138 P.
  - 📖 Pérez-Pérez E., Vit P. and Huq F. (2013): Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity, *Review in International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine*, Vol. 1(4), pp. 063-072.
  - 📖 Perna A., Simonetti A., Intaglietta I., Sofo A. and Gambacorta E. (2012): Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 47: 1909-1917.
  - 📖 Phillippe J.M. (1999): « Le guide de l'apiculture ». 3<sup>ème</sup> édition. Edisud. La Calade. Pp 203-216.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Piljac-Žegarac J., Stipcevic T. and Belscak A. (2009): Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 1 (2), 43 – 50.
  - 📖 Piro R. and Mutinelli. F. (2003): The EU legislation for honey control. *PIACTA* 38, 15-20
  - 📖 Polus P. (2007): « Récolte et conditionnement du miel ». *Revue d'abeille de France* N° 937. p 17.
  - 📖 Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B. (2009) : Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
  - 📖 Prost J. (1972): « Apiculture » Ed. J.B. Bailliere.
  - 📖 Prost J. (1987): « Apiculture, connaître l'abeille. Conduire le rucher » Ed. Lavoisier. P 309-342.
  - 📖 Puignerb V., Salgado J., and Queralt J. (1995): « Effect of cyclosporin and dexamethasone on IgE antibody response in mice, and on passive cutaneous anaphylaxis in the rat ». *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 108, 142-145.
  - 📖 Punt W., Blackmore S., Nilsson S. & Le Thomas A. (1994): Glossary of pollen and spore terminology. LPP Foundation, UTRECHT, 1994. LPP contributions séries n°1, 69p.
  - 📖 Rabiet E. (1984): « Plantes mellifères, Plantes apicoles. Rapports entre les plantes et l'abeille domestique ». Ed. Rabiet.
  - 📖 Radisson L. (2011) : La commercialisation de miel contaminé par du pollen issu d'un OGM est soumise à autorisation, *actu-environnement.com*.
  - 📖 Ramirez Cervantes M.A., Gonzalez Novelo S.A. et Sauri Duch E. (2000): « Les effets du traitement thermique sur la qualité du miel pendant l'entreposage ». *Apiacta*, 35 (4). PP : 162-170.
  - 📖 Randrianarivelo R.H.M. (2010): Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A.) en Biologie et Ecologie Végétales, Université d'Antananarivo, 71p.
  - 📖 Rashed M.N. and Soltan M.E. (2004): Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys, *Rev. J of Food Comp and Anal.*, 17 725–735.
  - 📖 Rasoloarijao T.M. (2013) : Analyses polliniques des miels de Madagascar et de deux îles des Mascareignes (île de la Réunion – île Rodrigues), Mémoire pour l'obtention de Diplôme d'Etudes Approfondies en Biologie et Ecologie Végétales, Université D'Antananarivo, 90p.
  - 📖 Ravazzi J. (2007): « L'abeille et l'apiculture ». Ed. De Vecchi, P 155.
  - 📖 Renault J. et Petzold M. (1992): « Spores et pollen ». Ed : New Chatel Suisse PP 92-194.
  - 📖 Révillard, J. P. (2001): Immunologie, pages 147–152. DB Université. Paris, Bruxelles.
  - 📖 Rigal M.L. (2012) : Miel et gelée royale: utilisations thérapeutiques dans le domaine cutané et applications en cosmétologie, Thèse d'exercice. France: Université de Limoges. Faculté de médecine et de pharmacie.
  - 📖 Rindt I.K., Niculae M. and Bruda c F. (2007): Biological Impact Of Polyfloral Honey on Antibioresistant *Staphylococcus Aureus* Isolated From Canine Dermatitis, *lucr ri tiinfice medicin veterinar vol. XI, timi oara*, 580-583pp.
  - 📖 Riondet J. (2010) : Savoir-faire, les travaux du mois, “Enfin la chaleur !”, Tester contre le Varroa, Abeilles et Fleurs, la Revue de l'Apiculture, N°715, p.27.
-



## Références Bibliographiques

---

- 📖 Rodziewicz L. and Zawadzka I. (2007): Rapid Determination of Chloramphenicol Residues in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and the Validation of Method Based on 2002/657/EC. *APIACTA* 42, pp. 25-30.
- 📖 Rossant A. (2011) : Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse de doctorat, Univ. Limoges, 132 p.
- 📖 Russell, K. M., Molan, P. C., Wilkins, A. L., & Holland, P. T. (1988): The identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 10-13.
- 📖 Ryan G. B. and Majno G. (1977): « Inflammation », Ed. Upjohn; Kalamazoo, Michigan, USA; 80 pp.
- 📖 Saba Z.H., Yusoff K.M., Makpol S. and Yusoff M.A. Y. (2011): Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents Increase with Gamma Irradiation in Two Types of Malaysian Honey. *Journal molecules*, 16, 6378-6395.
- 📖 Sabongi C., Suzuki N. and Sakane T. (1997): « Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in humans in vitro », *Cell Immunology*, 177:129-36.
- 📖 Sackett W.G. (1919): « Honey as a carrier of intestinal diseases », *Bulletin of the Colorado State University Agricultural Experimental Station No. 252*: 18pp.
- 📖 Sagripanli L., Routson B. and Bonilacion C. (1997): Mechanism of copper mediated inactivation of herpes simplex virus. *Antimicrobial Agent Chemother*, 41, 812-7
- 📖 Sanchez-Moreno C. (2002): Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3), 121-137.
- 📖 Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A. and Saura-Calixto F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270-276.
- 📖 Sant'Ana L., Sousa J., Salgueiro F., Affonso M.C. and Castro R (2012): Characterization of Monofloral Honeys with Multivariate Analysis of Their Chemical Profile and Antioxidant Activity. *J. Food Sci.*, 71: C135-C140.
- 📖 Šarić G., Marković K., Major N., Krpan M., Ursulin-Trstenjak N., Hruskar M. and Vahčić N. (2012): Changes of Antioxidant Activity and Phenolic Content in Acacia and Multifloral Honey During Storage. Original scientific paper, FTB-ms 2946.
- 📖 Schweitzer P. (2001): « Journée de l'abeille à sombernon ». Revue : l'abeille de France. *Cetam-Lorrain* .PP : 01-05.
- 📖 Schweitzer P. (2005): « Un miel étrange... ». Revue : Abeille de France. *Laboratoire d'analyse et d'écologie apicole*. 3-6 P.
- 📖 Schweitzer P. (2009) : *Laboratoire d'Analyses et d'Écologie Apicole*.
- 📖 Schweitzer (2012) : L'adultération des miels & les OGM dans le miel, 1-5p, site : [http://www.alsace.chambagri.fr/fileadmin/documents\\_alsace/INTERNET/elevage/apiculture/RELEMENTATION\\_Schweitzer\\_2012\\_Adulteration\\_des\\_miels\\_et.pdf](http://www.alsace.chambagri.fr/fileadmin/documents_alsace/INTERNET/elevage/apiculture/RELEMENTATION_Schweitzer_2012_Adulteration_des_miels_et.pdf).
- 📖 Sesta (2006): Determination of sugars in royal jelly by HPLC, *Apidologie* 37 (2006) 84–90p.
- 📖 Sherlock O., Dolan A., Athman R., Power A., Georgina G., Cowman S. and Humphreys H. (2010): Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey
-

## Références Bibliographiques

---

- against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2-5PP. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/47>.
- 📖 Simon A., Traynor K., Santos K., Blaser G., Bode U. and Molan P. (2008): Medical honey for wound care - still the 'Latest Resort'. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 10,1093.
- 📖 Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999): Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 265-275.
- 📖 Sla anac V., Lu an M., Hardi J., Krstanovi V. and Komleni D-K. (2012): Fermentation of Honey-Sweetened Soymilk with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and *Bifidobacterium longum* Bb-46: Fermentation Activity of Bifidobacteria and in vitro Antagonistic Effect against *Listeria monocytogenes* FSL N1-017, *Czech J. Food Sci.* Vol. 30, No. 4: 321–329
- 📖 Snowden, Jill A. and Cliver and Dean O. (1996): Microorganisms in honey. *International J. Food Microbiol.* 31(1-3): 1-26.
- 📖 Socha R., Juszczak L., Pietrzyk S. and Fortuna T. (2009): Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoney. *Food Chem.*, 113: 568–574.
- 📖 Swellam T., Miyanaga N., Onozawa M., Hattori K., Kawai K., Shimazui T. and Akaza H. (2003): « Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: *in vivo* and *in vitro* studies », *International Journal of Urology*, 10(4): 213-9.
- 📖 Tagg J.R. and Mc Given A.R. (1971): Assay system for bacteriocin. *Appl. Microbiol*, 21, 943.
- 📖 Tajik H., Jalali F.S.S. (2009): In vitro Evaluation of antimicrobial efficacy of natural honey comparison with sulfonamide derivatives. *J. Anim. Vet. Adv.* 8:23-25.
- 📖 Taormina P.J., Niemira B.A. and 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), 217-25
- 📖 Tavares M.C., Morais S.M., Costa-Siqueira S.M., Alencar de Menezes J., Nogueira D., Andrade L.K. and Lima I. (2011): Phenolic content and antioxidant and antiacetylcholinesterase properties of honeys from different floralorigins. *Journal of Medicinal Food* 14: 658-663.
- 📖 Telleria M. (1988): « Analyse pollinique des miels du nord-ouest de la province de Boenos aires ». *Apidologie*, 19 (3). Argentine. PP : 275-290.
- 📖 Ternynch T.H. et Avrameas S. (1987): « Techniques immunoenzymatiques », Ed : Inserm, Paris-France, PP : 41-57.
- 📖 Tetart G. (2004) : Diététique Naturelle et Santé « Parfaite » Les Produits apicoles, XVIIème Congres de l' AISLF. Tours juillet 2004. Cr 17 «Sociologie et Anthropologie de l'alimentation». Lemangeur-ocha.com. France, 1-9.
- 📖 Theunissen F., Groblers and Gedalia I. (2001): « The antifungal action of three South African honey on *Candida albicans* ». Ed. INRA/DIB.AGIB/EDP science. 9 P.
- 📖 Thompson H. M., Waite R.J., Wilkins S., Brown M. A., Bigwood T., Shaw M., Ridgway C. and Sharman M.(2005): Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood, *Food Additives & Contaminants: Part A.* 22(6), 573 – 578.
-

## Références Bibliographiques

---

- 📖 Tomás-Barberán F.A., Martos I., Ferreres F., Radovic B.S. and Anklam E. (2001): HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 81:485-496.
  - 📖 Tomczak C. (2010) : Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat, école nationale vétérinaire, Univ. Lyon, 185 p.
  - 📖 Tonks A.J., Cooper R.A., Jones K.P., Blair S., Parton J. and Tonks, A. (2003): « Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes », *Cytokine* 21: 242-247.
  - 📖 Tonks A.J., Dudley E., Porter N.G., Parton J., Brazier J., Smith E.L. and Tonks A. (2007): « A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4 », *Journal of Leukocyte Biology*, 82(5): 1147-55.
  - 📖 Torre D., Pugliese A. and Speranza F. (2002): Role of nitric oxide in HSV1 infection: friend or foe? *Lancet Infectious Diseases*, 2, 273-80.
  - 📖 Toullec, A.N.K. (2008): Abeille noire, *Apis mellifera mellifera*. Historique et sauvegarde. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil. 168p.
  - 📖 Tumini N., Halim N.A.A., Shahjahan M., Noor Izani N.J., Sattar M.A., Khan A.H. and Mohsin S.S.J. (2005): Antibacterial activity of local Malaysian honey. *Malaysian J. Pharmaceut. Sci.* 2:1-10.
  - 📖 Van Campo M. (1957) : Palynologie Africaine. I. Bulletin de l'I.F.A.N., Tome XIX, Série A n°3 : 659-677.
  - 📖 Van Ketel, B.A. (1892): Feestnummer der Berichsten van de Nederlandse Maatschappij ter Bevordering der Pharmacie 67/96.
  - 📖 Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M. and Jang J. (1995): Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem*; 43:2800–2.
  - 📖 Vinson J.A. and Hontz B.A. (1995): Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem*; 43:401–3.
  - 📖 Vitkova V., Ph.D. Thesis, (2002), University of Rennes I, Rennes, France.
  - 📖 Vorwohl G. (1968): « La teneur en hydroxyméthylfurfural des miels de la république fédérale d'Allemagne ». In *Apidologie* 11 (4) P 376-385.
  - 📖 Vorwohl, G. (1967): The microscopic analysis of honey, a comparison of its methods with those of the other branches of palynology. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 3, 287–290.
  - 📖 White J. et Louveaux J. (1962): « Composition, propriétés et technologie du miel ». In *Traité de biologie de l'abeille*. Tome 3. Les produits de la ruche. p 276-328.
  - 📖 White, J.W., Riethof M.H. and Kushnir I. (1962): Composition of American Honeys. United States Department of Agriculture Technical Bulletin. 1261:124.
  - 📖 WHO (World Health Organization) (2014): Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. Retiré de: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf).
  - 📖 Wiest L., Buleté A., Giroud B., Fratta C., Amic S., Lambert O., Pouliquen H., and Arnaudguilhem C. (2011): Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography
-

## Références Bibliographiques

---

- coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(34): p. 5743-5756.
- 📖 Woisky R. and Salatino A. (1998): Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res*; 37: 99-105.
- 📖 Yaiche Achour H. et Khali M. (2014) : Composition physicochimique des miels algériens. Détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques, *Afrique SCIENCE* 10 (2) (2014) 127 – 136 PP.
- 📖 Yatsunami K. and Echigo T. (1984): Antibacterial action of honey and royal jelly (japanisch), *Honeybee Science* 5, 125-130.
- 📖 Yedhu Krishnan, R. and Rajan K.S. (2016): Microwave assisted extraction of flavonoids from *Terminalia bellerica*: Study of kinetics and thermodynamics. *Sep. Purif. Technol.* 157 :169–178.
- 📖 Youmbi E., Cerceau-Larrival M-T, Verhille A-M & Carbonnier-Jarreau M-C (1998) : Morphologie et germination in vitro du pollen de *Dacryodes edulis* (Burseraceae), *Grana* 37: 87-92.
-

# Article



# Characterization of Algerian Honey from Tiaret Region and Immunoassay Study of Its Immunomodulatory Effect in BALB/c Mice

Yamina MEHDI<sup>1,2</sup>, Saâd MEBREK<sup>1</sup>, Soraya DJEBARA<sup>1</sup>, Yamina AISSAOUI<sup>1</sup>, Khadidja BENAHMED<sup>1</sup>,  
Amina Imène BENALI<sup>1</sup>, Mohammed BENALI<sup>1</sup> & Slimane BELBRAOUE<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biotoxicology laboratory, Sidi Bel-Abbes University, Algeria

<sup>2</sup> Research center of physicochemical analysis techniques of Tipaza, Algeria

<sup>3</sup> École de Nutrition, Université de Moncton, Moncton, Canada

Correspondence: Slimane BELBRAOUE, École de Nutrition, Université de Moncton, Moncton, Canada.  
E-mail: slimane.belbraouet@umoncton.ca

Received: April 15, 2015 Accepted: September 12, 2015 Online Published: December 22, 2015

doi:10.5539/jfr.v5n1p26

URL: <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v5n1p26>

## Abstract

Honey is a food that possesses several antiseptic, antibacterial, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. In this study, the immunomodulatory effect of honey was evaluated by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using ovalbumin as an allergen model. To compare the honey quality, we conducted a range of physicochemical analyses on four different samples from the Tiaret region (Algeria) using the immunosuppressive or immunomodulatory effect in Balb/c mice. Our results show that the injection of 100 µL of honey before 6 hours, 6 hours after and at the same time as the injection of antigen (ovalbumin) causes a significant suppressive activity on production of the IgG isotype by Balb/c mice. This result corroborates this therapeutic virtue ascribed to honey which has resulted in a suppressive demonstration of honey on the humoral immune response. This opens an interesting perspective in the clinical area, as immunosuppressive agents play an important role in the transfer of various organs and immune system diseases.

**Keywords:** Honey, immunomodulatory effect, IgG, ELISA

## 1. Introduction

The immune system plays a crucial role in natural defence, but its excessive or inappropriate activation may have adverse consequences for the host. The modulation of the immune system or "immunomodulation" can be applied to reduce excessive responses or, conversely, to strengthen the inadequate response of the system (Labro, 2006). Honey is among the ancient foods of mankind, and is one of the few natural products that can interfere with the immune system by its immunosuppressive agents. It was found to be a suitable alternative for healing wounds and burns, and a product that can be used in oral health treatments (Molan, 2001; Lusby et al., 2002; Gallardo-Chacon et al., 2008; Lavflurrie, 2008). It also has a potential role in cancer care and shows antimicrobial properties (Bardv et al., 2008). Furthermore, it is used much more as a food than for therapeutic purposes because of its properties. This allows it to be a noble and precious product. The main purpose of this study was to investigate some properties of various honey samples collected from Tiaret region of Algeria by using different honey analysis tests such as moisture, ash, pH, free acidity, electrical conductivity, and hydroxymethylfurfural. The determinations of the frequency of pollen grain classes were also determined in these honey samples, in order to verify the floral origin and to obtain a complete pollen spectrum. In the second part of our work, the best honey sample was used to study the immunomodulatory effect of honey in the Balb/c mice using an ELISA immunochemical technique and ovalbumin as an allergen model.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Sample Collection

Four different honeys samples were obtained from individual beekeepers in the Tiaret Region (E1: Sebt, E2: Sougueur, E3: Sidi Ali Mellel, E4: Dahmouni) of Algeria. All samples were collected in their original packages

and were transferred to the laboratory and kept at 4–5°C until analysis. They were labelled using a code number indicating their geographical origin, harvest date, and their extraction method (Table 1).

Table 1. Description of the sampled honey

Honey samples	Harvested period	Locality	Extraction mode
1	June 2008	Sebt	Manual
2	June 2009	Sougueur	Mechanic
3	June 2009	Sidi Ali Mellel	Manual
4	July 2009	Dahmouni	Manual

## 2.2 Physicochemical Analysis

The physical and chemical parameters of honey samples were studied using the methods harmonized by the International Honey Commission (Bogdanov et al., 1997). All analyses were performed in triplicate. Electrical conductivity of honey was determined from a honey solution containing 20% of honey dry matter in 100 mL distilled water at 20°C. Honey density was determined by weighing 10 mL of honey compared to the same volume of distilled water using a pycnometer (Bogdanov et al., 1995). The pH value was measured with a pH meter in a 10% (w/v) solution of honey in distilled water (French Official Journal, 1977). Water content (moisture) was determined using refractive index (RI) referring to the table of Chataway reported in Gonnet (1982). Acidity was estimated using the official method of analysis (AOAC, 1990). HMF (hydroxymethylfurfural) was performed using the Winkler method. The resulting colour was measured with a UV-spectrophotometer at 550 nm. Ash was evaluated by incineration of honey samples in a muffle furnace at 600°C (International Honey Commission, 2009).

## 2.3 Immunomodulatory Effect of Honey

### 2.3.1 Chemicals and Reagents

Ovalbumin (OVA) used to induce anti-OVA response in mice was obtained from Sigma. Multifloral honey of Africanized bees *Apis mellifera* (E3) was obtained from the Tiaret region of (Algeria).

### 2.3.2 Animals

Eight week old Balb/c mice were obtained from the Pasteur National Institute of Algeria. Six mice were used in each group for determination of antibody response.

### 2.3.3 Immunization Protocol

Different groups of mice were intraperitoneally (i.p.) injected with 10µg OVA or OVA plus 100 µL of honey on days 0, 21 and 35 and were bled on day 42 (Duddukuri et al., 2001). The antisera was separated and used for the estimation of total immunoglobulin IgG. The suppressive effect of honey on OVA-specific IgG antibody response was further studied by administering honey at different time intervals (0, 6h, 24h) prior to and after immunisation with OVA.

### 2.3.4 Determination of Immunoglobulin Levels by ELISA

Total IgG Anti-OVA levels in the sera from both control and test groups of mice were assayed by ELISA. Briefly, the 96-well microtitre plates (Nunc, n°167008, Lot: 049283) were coated with 100 µL of OVA at a concentration of 5µg/mL in carbonate-bicarbonate buffer (0.1 M, pH 9.5) and incubated for 2 h at 37°C (or overnight at 4°C). After incubation, the wells were washed three times with PBS containing 0.1% of Tween-20 (PBS-T). One mL of 5% pork gelatine (Fluka, n: 2325546, Lot: 387213/1 40101) in 9 mL of PBS-Tween was used to block the nonspecific binding sites for 1 h at room temperature (ELISA incubator: THERMOSTAR BMG). After washing the plates, the wells were further incubated with 100 µL of diluted sera (1:300 in PBS-Tween-Gelatine) for 2 h at 37°C. The unbound serum constituents were washed off and the levels of total bound IgG were measured by incubating with 100 µL of horseradish peroxidase (HRPO) conjugates of goat anti-mouse IgG (Sigma, 5 CODE 026K4846 A9917-1 mL) at a dilution of 1:2000 for one hour at 37°C. Finally, the unbound conjugates were washed with PBS-T five times and 100 µL of freshly prepared substrate solution [6 mg of orthophenylen diamine (OPD) in 12 mL of citrate sodium-citric acid buffer 0.1 M, pH 5.5 with addition of 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 3%] was added per well. The reaction was stopped after 15 to 30 min by adding 50 µL of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The developed colour was read at 492 nm using automatic ELISA reader (TECAN SUNRISE). The data



expressed was the mean of the optical density (OD) of the triplicates after subtracting the absorbance for the pre-immune serum.

#### 2.4 Statistical Analysis

All results were statistically analyzed by Microsoft Excel 2007 using Student's test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1 Quality of Honey Samples

The results of physicochemical parameters of honey samples from the Tiaret region were presented in Table 2. All honey samples were acidic in nature and the pH values varied between 3.83 and 4.34. Total acidity of analyzed honey samples was between 20 and 32 meq/kg.

The electrical conductivity was less than 0.8 mS/cm. Sidi Ali Mellal honey sample (E3) had the highest conductivity (Table 2). The EC found in all of the samples was typical for floral honey. The HMF content in four honey samples was lower than the allowed maximum limit of 40 mg/kg recommended by the European Honey Commission (2009).

Table 2. Physicochemical characterization of honeys

Physicochemical parameters	Honey samples			
	E1	E2	E3	E4
Density	1.343 ±0.015	1.477 ±0.012	1.390 ±0.010	1.403 ±0.015
Electrical Conductivity (ms/cm)	0.453 ±0.008	0.382 ±0.003	0.484 ±0.007	0.484 ±0.007
pH	4.343 ±0.060	3.830 ±0.085	4.293 ±0.025	3.963 ±0.140
Moisture (%)	17.800 ±0.265	18.600 ±0.300	16.200 ±0.265	16.600 ±0.265
Ash (%)	0.456 ±0.060	0.059 ±0.003	0.181 ±0.022	0.044 ±0.002
Acidity (meq/kg)	20 ±1.00	32 ±1.00	21 ±1.00	32 ±0.00
HMF (hydroxymethylfurfural) (mg/kg)	36.483 ±1.456	7.683 ±0.495	5.760 ±0.288	15.363 ±0.638

\*According to the ANOVA test the relationship between the different honeys and parameters was statistically significant ( $P < 0.001$ ).

Table 3. Quantitative melissopalynological analyses

Honey samples	Pollen number GP/g	Classes	Interpretation
E1	314034	V	Rich
E2	79711	IV	Rich
E3	697452	V	Rich
E4	15478	III	Rich

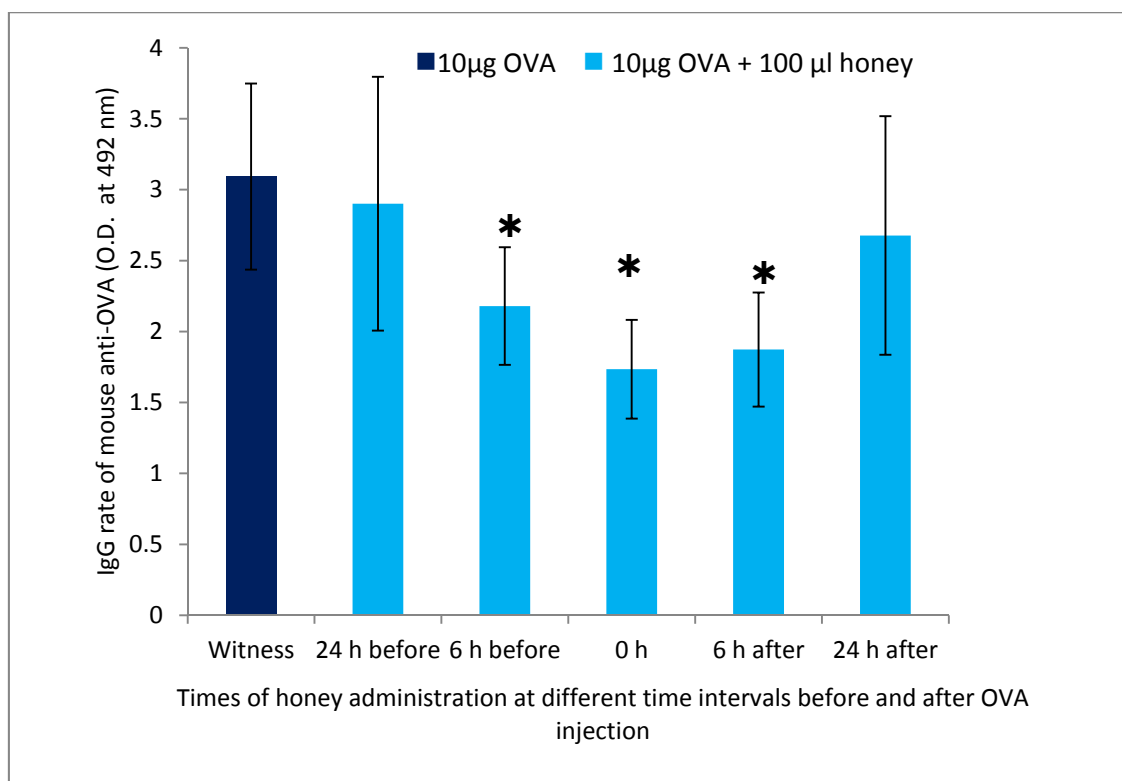
Table 4. Qualitative melissopalynological analyses

Honey samples	Origin place	Predominant and secondary pollen types
E1	Sebt	<i>Eucalyptus sp</i> + <i>Daucus carota</i>
E2	Sougueur	Multifloral+ <i>Eucalyptus sp</i> + <i>Brassica napus</i>
E3	Sidi Ali Mellel	Multifloral + <i>Hedysarum coronarium</i> + <i>Daucus carota</i> + <i>Brassica napus</i>
E4	Dahmouni	Multifloral + <i>Eucalyptus sp</i>

### 3.2 Immunomodulatory Effect of Honey

Different groups of mice were treated with honey at different time intervals (in hours) prior to and after immunization with OVA on days 0, 21 and 35. The sera collected on day 42 were used to evaluate the OVA-specific IgG antibody responses ( $P < 0.01$ ).

In order to examine the possible immunomodulatory activity of honey, the antibody response was induced in mice by intraperitoneal injection of 10  $\mu\text{g}$  of OVA in the absence or presence of honey. As seen in figure 1, the administration of 100  $\mu\text{L}$  of honey at different time intervals (0, 6h, 24h) prior to and after immunization with OVA was found to exhibit a suppression of anti-OVA IgG antibody response. This suppressor effect of honey was significant ( $P < 0.01$ ) after administration of honey 6h prior to and after immunization with OVA. This confirms the immunosuppressive effect of honey.



\*  $p < 0.01$ .

Figure 1. Influence of honey administration on OVA-specific IgG antibody response

## 4. Discussions

### 4.1 Physicochemical Analysis

To ensure the authenticity of honey samples, it is necessary to study in detail the physicochemical properties which are important for the certification process that determines honey quality.

#### 4.1.1 Electrical Conductivity

This parameter is a good criterion related to botanical origin of honey (Bogdanov et al. 2004) and this is very often used in routine honey control instead of the ash content. Ash and electrical conductivity are two parameters bound to honey minerals content. The EC found in all of the samples was typical for floral honey. Its value varied from 0.38-0.48 mScm-1. The lowest value was obtained from honey samples from the Sougueur area and the highest value of EC obtained from Sidi Ali Mellel area of the Tiaret region.

#### 4.1.2 Density

This parameter depends on the water content; the sample E1 has a slightly lower density than other honey samples because it has high water content (17.8%).

#### 4.1.3 The pH

The pH values of the studied honeys were consistent with the result of Algerian honeys, the pH range of which was 3.49-4.53; these results are in the range reported by White (1975), who mentioned that honey is characteristically quite acidic.

#### 4.1.4 Water Content (Moisture)

Honey moisture content depends on the environmental conditions and the manipulation from beekeepers at the harvest period, and can vary from year to year (Acquarone et al., 2007). High moisture content could accelerate crystallization in certain types of honey and increase its water activity to values where certain yeasts could grow. Moisture contents of honey samples ranged from 15.9 to 17.2, which are well below the imposed limit of 21% (EU, 2001). These results are indicative of good storage ability of these honeys, since high moisture content could lead to fermentation during storage.

#### 4.1.5 Acidity

The free acidity of honey may be explained by taking into account the presence of organic acids in equilibrium with their corresponding lactones. High acidity can be indicative of the fermentation of sugars into organic acids. In fact, the presence of gluconic acid in all honey originates largely from the activity of glucose oxidase which the bees add during ripening (Ruiz-Argueso et al., 1973). None of the samples exceeded the limit recommended by White et al. (1962) (8.68-59.40 meq/kg), which may be taken as indicative of the freshness of all honey samples.

#### 4.1.6 HMF

The HMF content is indicative of honey freshness (Terrab et al., 2002), because it is absent in fresh honeys and tends to increase during processing and/or aging of the product. Several factors influence the levels of HMF, such as temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source; thus, it provides an indication of overheating and storage in poor conditions (Fallico et al., 2006), and from this point of view most of the analyzed samples are fresh. The spectrophotometric analysis of our samples revealed that all of them had levels below the limits HMF (40 mg/kg) suggested by the European Commission of honey.

#### 4.1.7 Ash

The ash values of the honey samples evaluated ranged from 0.04 to 0.45% with an average of 0.18±0.19. These results are good agreement with those of June et al. (2012) (maximum and minimum limits are 0.01 and 0.65%, respectively). This variability in the ash content may be attributed to different floral sources or to factors related to honey sampling such as different geographical locations of various honey types or different environmental conditions of producing regions (Turgay, 2009).

The physicochemical characteristics of honey samples analyzed in this study completely agree with the European Commission and the Codex Alimentarius indicating adequate processing, good maturity and freshness that open the door for the commercialization of Algerian honey from the Tiaret region.

### 4.2 Immunomodulatory Effect of Honey

In this study, it was found that the OVA-specific IgG antibody response was suppressed ( $P < 0.01$ ) by the intraperitoneal administration of honey (100µl) at different time intervals (0, 6 h) prior to and after immunization with OVA. Many animals' experimentations confirm the immunosuppressor effect of honey; Duddukuri et al. (1997) found that honey exerted an immunosuppressive effect on the induction of allergen-specific humoral antibody response in mice as evaluated by passive cutaneous anaphylaxis and Ouchterlony double immunodiffusion methods. The same authors reported that OVA-specific IgG antibody response was significantly suppressed by honey ( $p < 0.01$ ) in Balb/c mice, as measured by ELISA. However, honey does not

show an immunosuppressive effect on antibody responses of other IgG subclasses such as IgG2a and IgG3. Furthermore they showed that the total IgG antibody response was significantly suppressed by the administration of honey 12 h before and after immunization with OVA. These results are in contradiction with those of herbal Chinese medicine called "Hochu-ekki-to" which suppresses the IgE antibody response without affecting the levels of IgG1 and IgG2a. Also, the dexamethasone selectively inhibits IgE and IgA but does not influence IgG and IgG1 levels (Puignerb et al., 1995). These immunosuppressive presentations in honey may come from medicinal plants from which bees collect pollen and nectar; therefore, honey has some healing properties.

## 5. Conclusion

Honey is a natural complex and is diverse. However, whatever its origin, the presence of enzymes secreted by the hypopharyngeal glands of bees makes it fragile and it has evolved physicochemically over time. Such variations have allowed many authors to describe honey as a "living product". This food presents all of the qualities required to enter the list of natural therapeutic samples, either in the cure or prevention, where the composition and characteristics present important variations related to its geographical and botanical origin. The sensitivity of the ELISA test chosen for the determination of immunoglobulins in BALB/c mice immunized with ovalbumin, which showed very highly significant suppression ( $p < 0.01$ ) after the administration of honey 6 h before and after injection with OVA. This confirms the immunosuppressive effect of honey. This immunomodulatory activity can be used for clinical applications such as autoimmune diseases and allergies. Further investigation, in order to identify and purify these immunosuppressants, are present in honey. Moreover, the characterization of different honeys from different regions of our country can be an interested, certain especially when the various active principles specific to each honey will be specified. Composition tables for this purpose will be beneficial to the various uses of this product.

## References

- 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*, 695-703. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.058>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). In K. Helrich (Ed.), *Official Methods of Analysis* (15th ed.) Arlington, VA, USA.
- Bardy, J., Slevin, N. J., Mais, K. L., & Molassiotis, A. (2008). A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. *Journal of Clinical Nursing*, *17*, 2604-2623. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2702.2008.02304.x>
- Bogdanov, S., Lüllmann, C., Martin, P., von der Ohe, W., Russmann, H., Vorwohl, G., ... Flamini, C. (1999). Honey Quality and International Regulatory Standards: Review of the International Honey Commission. *Bee World*, *80*, 61-69. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099428>
- Bogdanov, S., Bieri, K., Figar, M., Figueiredo, V., Iff, D., Kanzig, A., ... Zurcher, K. (1995). Miel définition et directives pour l'analyse et l'appréciation. Centre suisse de recherches apicoles (pp. 1-26).
- Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C., Borneck, R., Flamini, C., & Morlot, M. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, *28*, 1-59.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, *35*, 4-17. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004047>
- Crane, E. (1979). Honey: A comprehensive survey (pp. 3-76). Heinemann Intern. Bee Res Ass (IBRA). London.
- Duddukuri, G. R., Kumar, P. S., Kumar, V. B., & Athota, R. R. (1997). Immunosuppressive effect of honey on the induction of allergen-specific humoral antibody response in mice. *International archives of allergy and immunology*, *114*(4), 385-388. <http://dx.doi.org/10.1159/000237699>
- Duddukuri, G. R., Rao, Y. V., Rao, D. N., & Athota, R. R. (2001). Immunomodulation of ovalbumin-specific IgG and other classes of antibody response by honey in mice. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *16*(1), 89-94. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02867574>
- Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., & Zappalà, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance*, *11*(1-2), 49-54. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-006-0128-6>
- French Official Journal. (1977). 15 February decree 1977 of official analyzes methods of honey (pp. 1-30).

- Gallardo-Chacón, J. J., Caselles, M., Izquierdo-Pulido, M., & Rius, N. (2008). Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. *Journal of apicultural research*, 47(2), 131-136.
- Gonnet M. Le miel. (1982). Composition propriétés et conservation (2nd Ed., p. 31). Opida. France.
- International commission of honey. (2009). Harmonised methods of the international honey commission (p. 63). Bee Product Science..
- Serem, J. C., & Bester, M. J. (2012). Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*, 133(4), 1544-1550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.047>
- Kaneko, M., Kishihara, K., Kawakita, T., Nakamura, T., Takimoto, H., & Nomoto, K. (1997). Suppression of IgE production in mice treated with a traditional Chinese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to). *Immunopharmacology*, 36(1), 79-85. [http://dx.doi.org/10.1016/S0162-3109\(96\)00162-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0162-3109(96)00162-2)
- Labro, M. T. (2006). Immunomodulation médicamenteuse par les agents antibactériens. *Réanimation*, 15(4), 259-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.06.004>
- Lay-Flurrie, K. (2008). Honey in wound care: effects, clinical application and patient benefit. *British Journal of Nursing*, 17(Sup5), S30-S36. <http://dx.doi.org/10.12968/bjon.2008.17.Sup5.29649>
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Commission Internationale de Botanique Apicole de L'UISB Les méthodes de la mélissso-palynologie. *Apidologie*, 1, 211-227. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19700206>
- Lusby, P. E., Coombes, A., & Wilkinson, J. M. (2002). Honey: a potent agent for wound healing?. *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*, 29(6), 295-300. <http://dx.doi.org/10.1097/00152192-200211000-00008>
- Lobreau-Callen, D., Clement, M. C., & Marmion, V. (2000). Les miels (p. 35). Techniques de l'ingénieur.
- Molan, P. C. (2001). Why honey is effective as a medicine- 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World*, 82, 22-40. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099498>
- Oddo, L. P., & Bogdanov, S. (2004). Determination of honey botanical origin: problems and issues. *Apidologie*, 35(Suppl. 1), S2-S3. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004044>
- Puignero, V., Salgado, J., & Queralt, J. (1995). Effects of cyclosporine and dexamethasone on IgE antibody response in mice, and on passive cutaneous anaphylaxis in the rat. *International archives of allergy and immunology*, 108(2), 142-147. <http://dx.doi.org/10.1159/000237131>
- Ruiz-Argüeso, T., & Rodriguez-Navarro, A. (1973). Gluconic acid-producing bacteria from honey bees and ripening honey. *Journal of general microbiology*, 76(1), 211-216. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-76-1-211>
- Terrab, A., Diez, M. J., & Heredia, F. J. (2002). Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, 79(3), 373-379. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00189-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00189-9)
- Turgay, Ö. (2009). Characteristic Properties of Kahramanmaraş Honey Samples. *KSU J. Nat. 22 Sci.*, KSÜ Doğa Bil. Derg, 12, 21-25.
- White, J. W., Riethof, M. L., Supers, M. H., & Kuschner, I. (1962). Composition of American honeys. *Tech Bul US Dep Agric.*, 1261, 1-124.
- White, J. W. (1975). Minerals in honey. In E. Crane (Ed.), *Honey, a comprehensive study* (9th ed., pp. 157-206). London: Heinemann Edition.
- White, J. W. (1978). Honey. *Adv Food Res*, 24, 287-374. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3)
- White, J. W. (1979). Spectrophotometric Method for Hydroxymethylfurfural in Honey. *J Ass Off Anal Chem.*, 62, 509.

### Copyrights

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

# Annexe



**Correspondance entre l'indice de réfraction et la teneur en eau du miel**  
*(Commission Internationale du miel 2009).*

<b>Teneur en eau</b>	<b>Indice de</b>	<b>Teneur en eau</b>	<b>Indice de</b>
<b>g/100g</b>	<b>20°C</b>	<b>g/100g</b>	<b>20°C</b>
13.0	1.5044	19.0	1.4890
13.2	1.5038	19.2	1.4885
13.4	1.5033	19.4	1.4880
13.6	1.5028	19.6	1.4875
13.8	1.5023	19.8	1.4870
14.0	1.5018	20.0	1.4865
14.2	1.5012	20.2	1.4855
14.4	1.5007	20.4	1.4850
14.6	1.5002	20.6	1.4845
14.8	1.4997	20.8	1.4840
15.0	1.4992	21.0	1.4835
15.2	1.4987	21.2	1.4830
15.4	1.4982	21.4	1.4825
15.6	1.4976	21.6	1.4820
15.8	1.4971	21.8	1.4815
16.0	1.4966	22.0	1.4800
16.2	1.4961	22.2	1.4795
16.4	1.4956	22.4	1.4795
16.6	1.4951	22.6	1.4790
16.8	1.4946	22.8	1.4785
17.0	1.4940	23.0	1.4790
17.2	1.4935	23.2	1.4785
17.4	1.4930	23.4	1.4780
17.6	1.4925	23.6	1.4775
17.8	1.4920	23.8	1.4770
18.0	1.4915	24.0	1.4765
18.2	1.4910	24.2	1.4760
18.4	1.4905	24.4	1.4755
18.6	1.4900	24.6	1.4750
18.8	1.4895	24.8	1.4745
		25	1.4740

Correction de température – indice de réfraction

T > à 20°C – ajouter 0.00023 par °C

T < à 20°C – soustraire 0.00023 par °C



---

**Préparation des tampons****➤ PBS (Phosphate-buffer-saline) pH 7,4 (Hongbao M., 2006)**

NaCl	8g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster pH à 7,4 avec HCl

**➤ Gélatine à 5%**

Dissoudre 5 g de gélatine dans 100 ml d'eau distillée par chauffage à ébullition. Répartir en petits flacons stériles et garder à 4°C. Chauffer au bain-marie bouillant pour redissoudre avant l'utilisation.

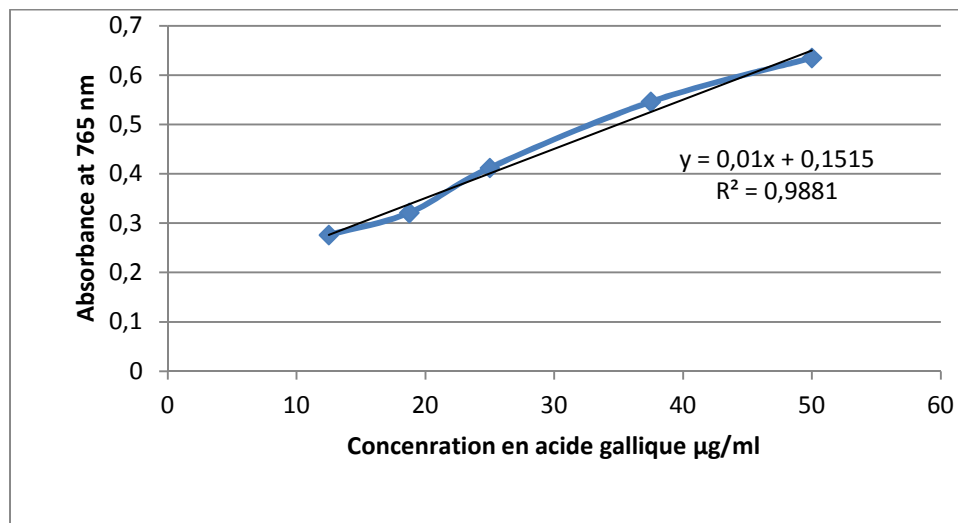
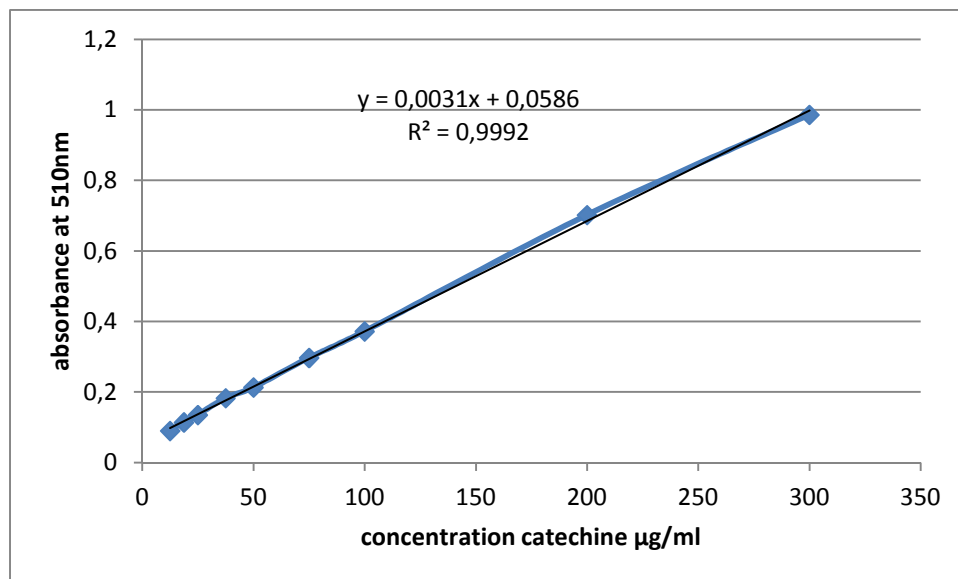
**➤ Tampon Carbonate-Bicarbonate 0,1M pH 9.5**

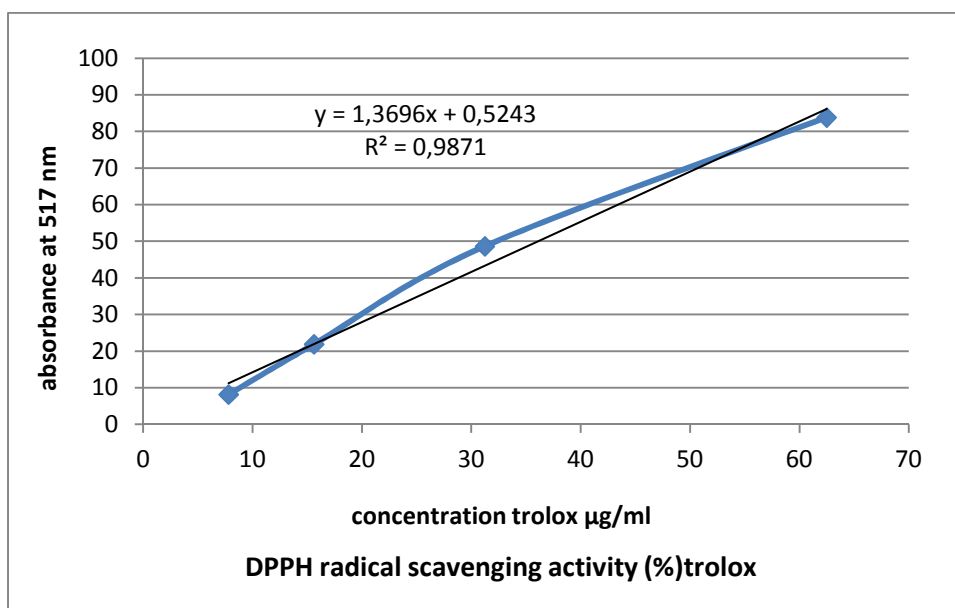
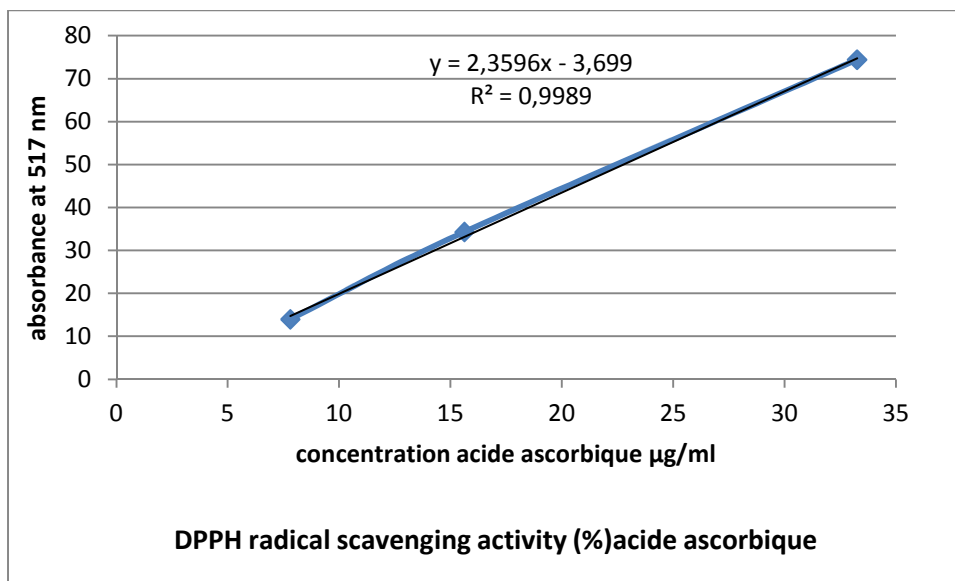
Dissoudre 35g de carbonate de sodium (ou 95 g de carbonate de sodium, 10H<sub>2</sub>O) et 56g de bicarbonate de sodium dans 800ml d'eau distillée et compléter le volume à 1000ml.

**➤ Tampon citrate de sodium-acide citrique 0,1 M pH 5,5**

Dissoudre 2,9 g de citrate de sodium trisodique et 0,41g d'acide citrique dans 100 ml d'eau distillée.

---

**Courbe d'étalonnage de polyphénols totaux :****Courbe d'étalonnage de Flavonoïdes totaux :**

**Courbe d'étalonnage de Test DPPH:**

**Tableau 08: Normes internationales de miel concernant quelques éléments traces métalliques**

Métal	Limite maximale permmissible (mg/kg)
<b>Mg</b>	<b>25<sup>(3)</sup></b>
<b>Fe</b>	<b>15<sup>(1)</sup></b>
<b>Cu</b>	<b>5<sup>(1)</sup></b>
<b>Zn</b>	<b>5<sup>(1)</sup></b>
<b>Ni</b>	<b>2<sup>(3)</sup></b>
<b>Pb</b>	<b>0,1<sup>(1)</sup>, 1<sup>(2)</sup></b>
<b>Cd</b>	<b>0,05<sup>(1)</sup>, 0,1<sup>(2)</sup></b>

<sup>(1)</sup> *Codex Alimentaire*

<sup>(2)</sup> *Législation Européenne*

<sup>(3)</sup> *Osman K., 2007*

*Lames de préparations*



*Fleur de Papaver rhoeas*



*Pollen de Papaver rhoeas (400 X)*



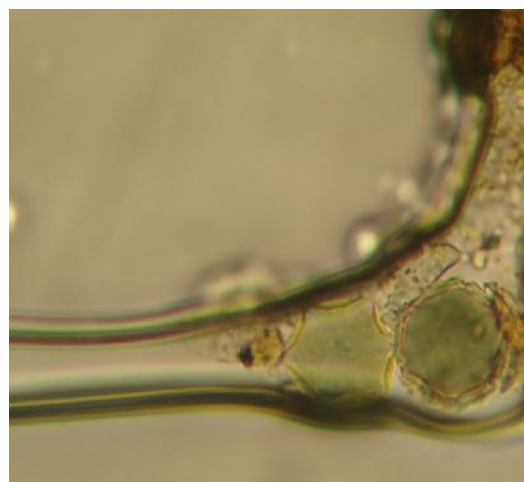
*Fleur de Rosmarinus Officinalis*



*Pollen de Rosmarinus Officinalis (400 X)*



*Fleur de Lavandula stoechas*

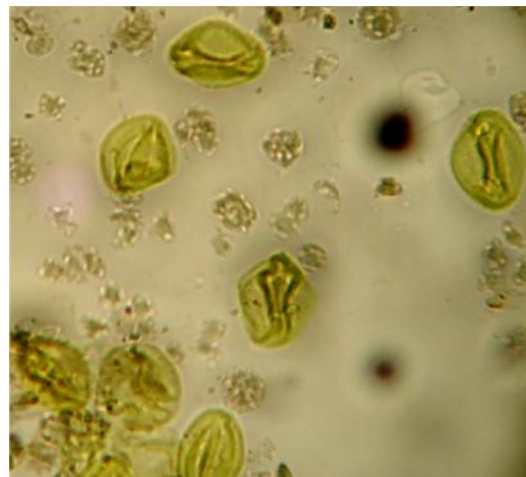


*Pollen de Lavandula stoechas (400 X)*





*Fleur de Quercus robur (chêne)*



*Pollen de chêne (400 X)*



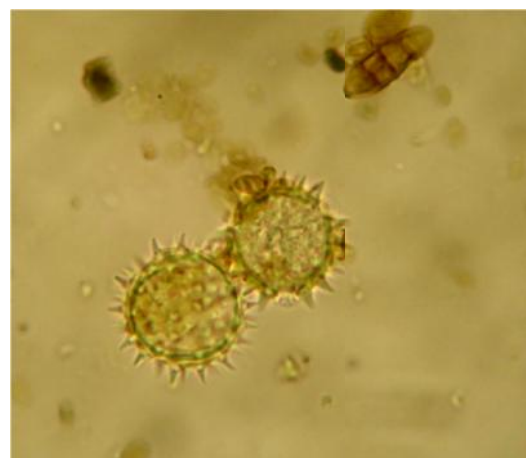
*Fruit d'Olea Europea (olive)*



*Pollen d'Olea Europea (400 X)*



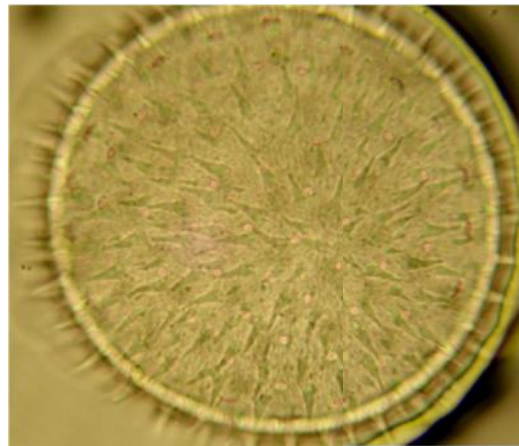
*Fleur de Helianthus annuus (Tournesol)*



*Pollen de Helianthus annuus (400 X)*



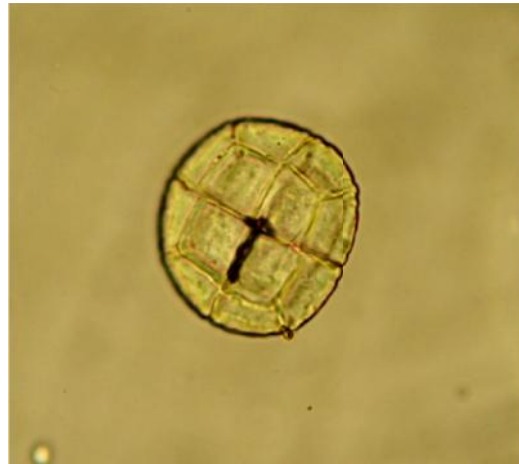
*Fleur de Malva sylvestris*



*Pollen de Malva sylvestris (400 X)*



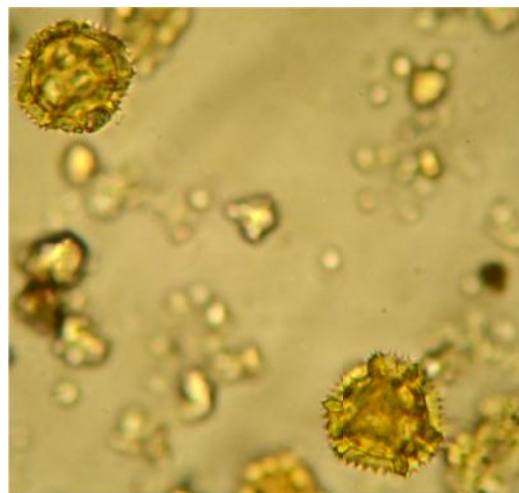
*Fleur de Mimosa*



*Pollen de Mimosa (400 X)*



*Fleur de Taraxacum officinale (Pissenlit)*



*Pollen de Taraxacum officinale (400 X)*





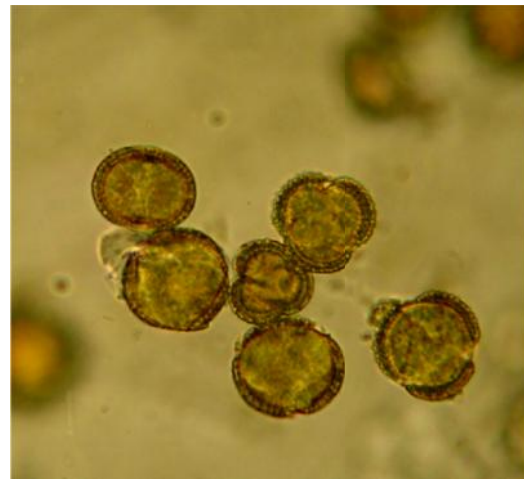
*Fleur de Galactites tomentosa*



*Pollen de Galactites tomentosa (400 X)*



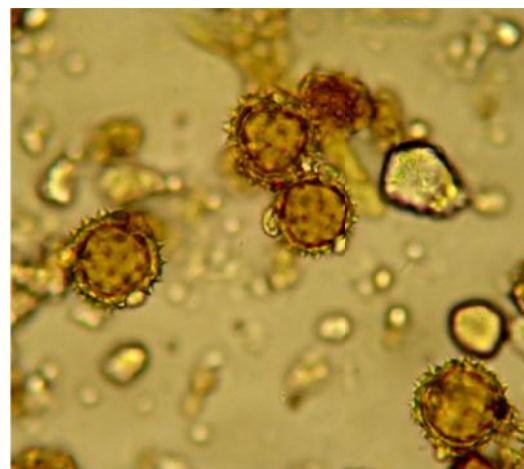
*Fleur de Brassica napus (Colza)*



*Pollen de Brassica napus (400 X)*



*Fleur de Matricaria recutita (Camomille)*

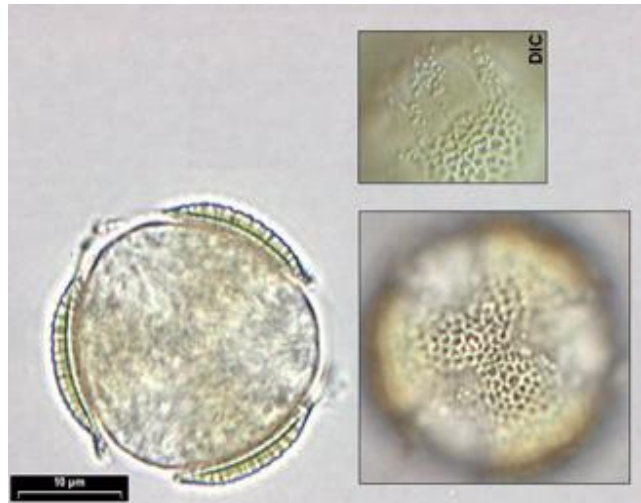


*Pollen de Matricaria recutita (400 X)*

*Autres grains de pollen tirés des publications*



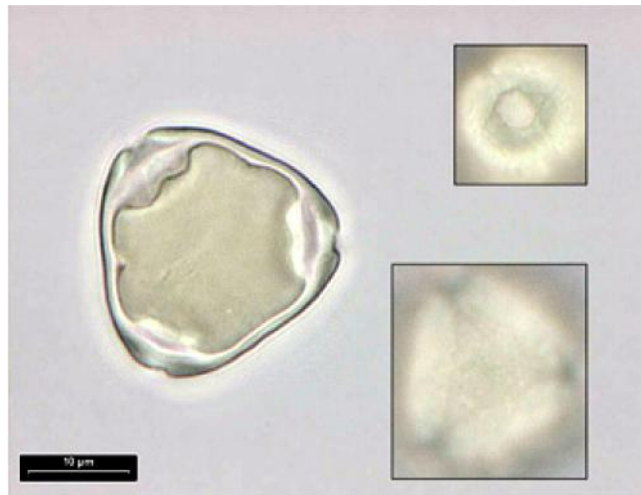
*Fleur de Brassica napus (Colza)*



*Pollen de Brassica napus (1000 X)*



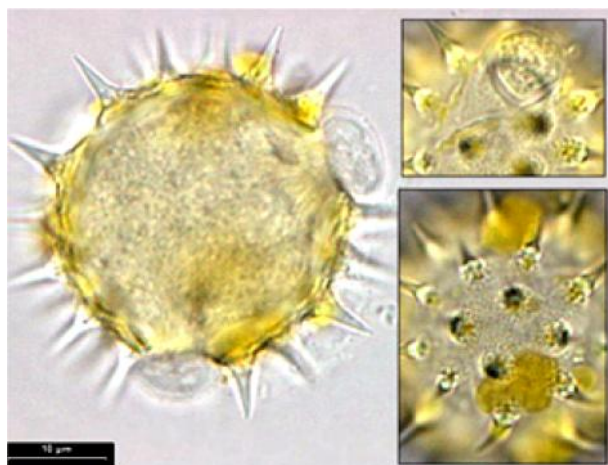
*Fleur d'Eucalyptus sp*



*Pollen d'Eucalyptus sp (1000 X)*



*Fleur de Helianthus annuus  
(Tournesol)*



*Pollen de Helianthus annuus (1000 X)*





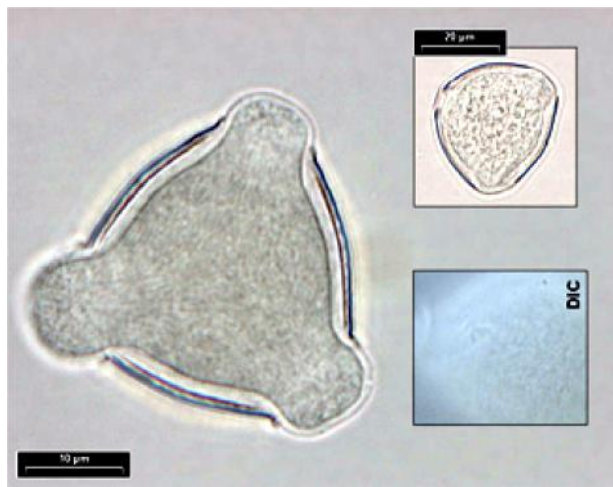
*Fleur de Tillia cordata*



*Pollen de Tillia cordata (1000 X)*



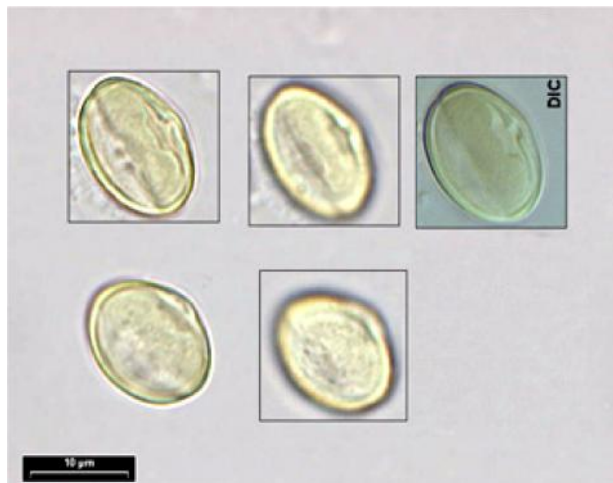
*Fleur de Robinia pseudoacacia*



*Pollen de Robinia pseudoacacia (1000 X)*



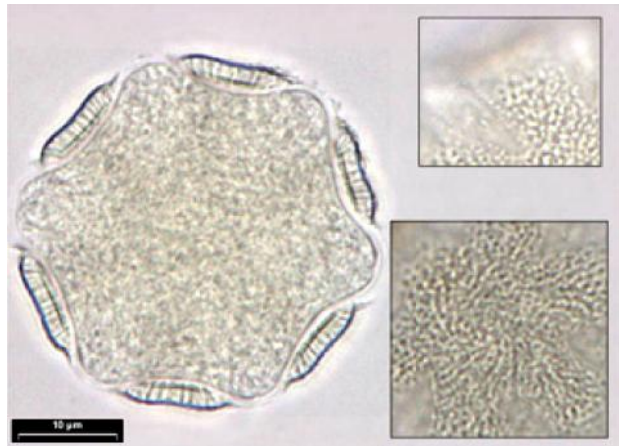
*Fleur de Castanea sativa*



*Pollen de Castanea sativa (1000 X)*



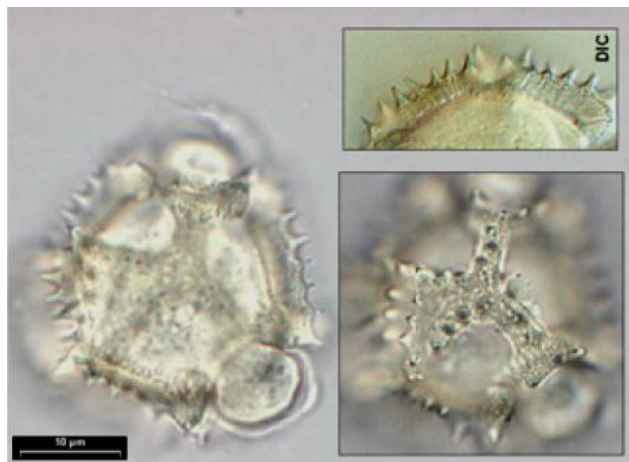
*Fleur de Lavandula*



*Pollen de Lavandula (1000 X)*



*Fleur de Taraxacum officinale*



*Pollen de Taraxacum officinale (1000 X)*

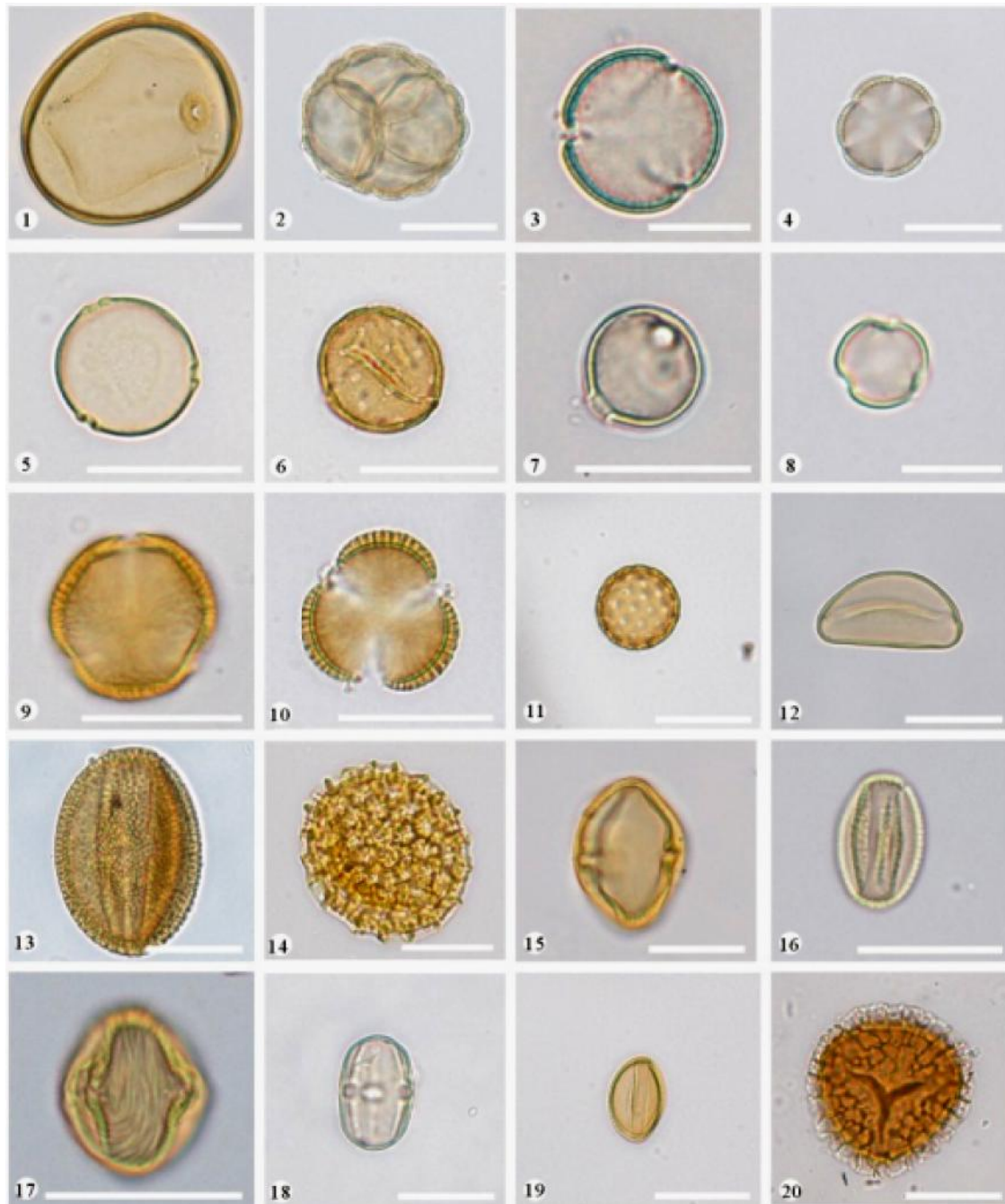


*Fleur de Rosmarinus officinalis*



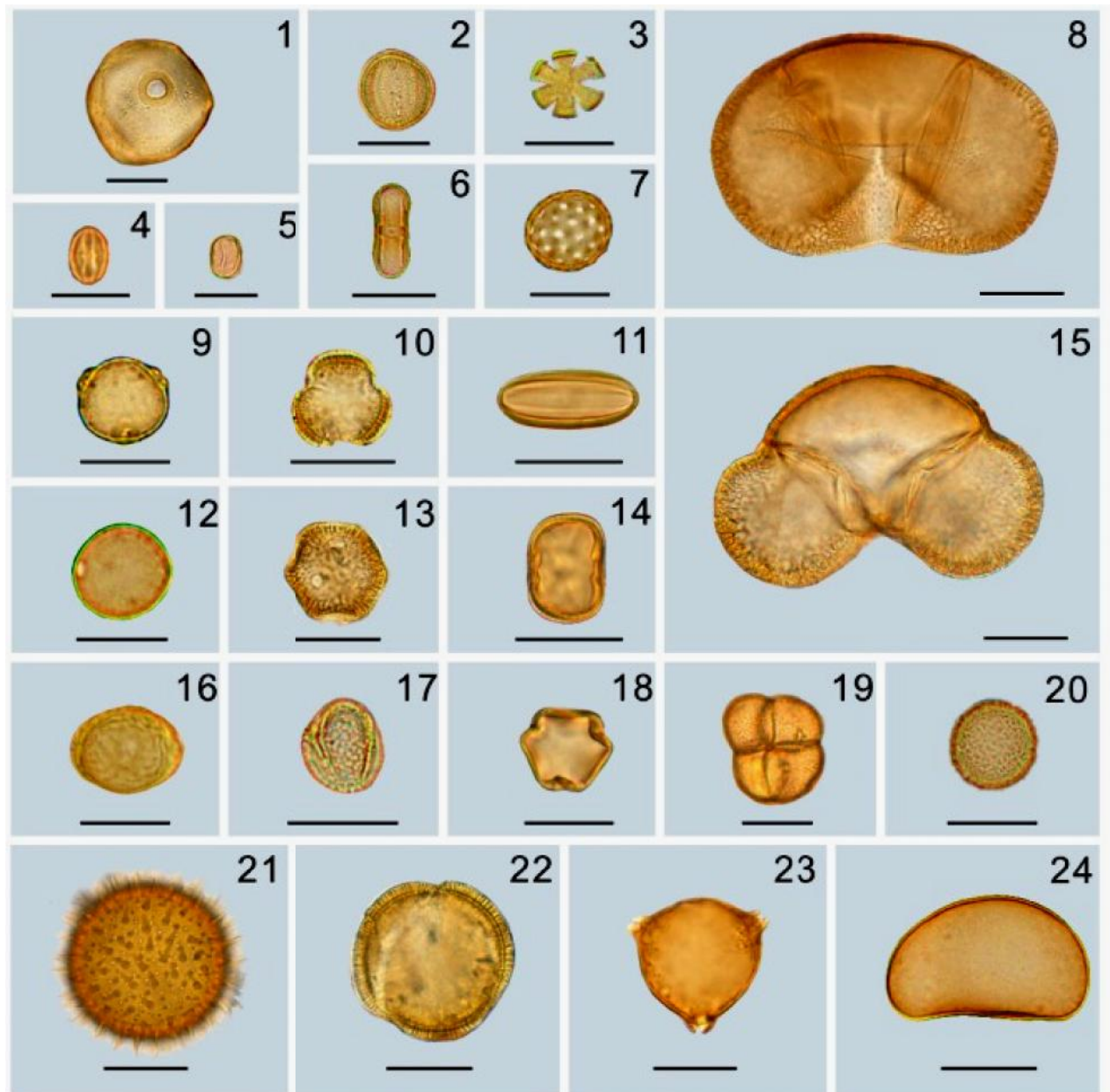
*Pollen de Rosmarinus officinalis (1000 X)*





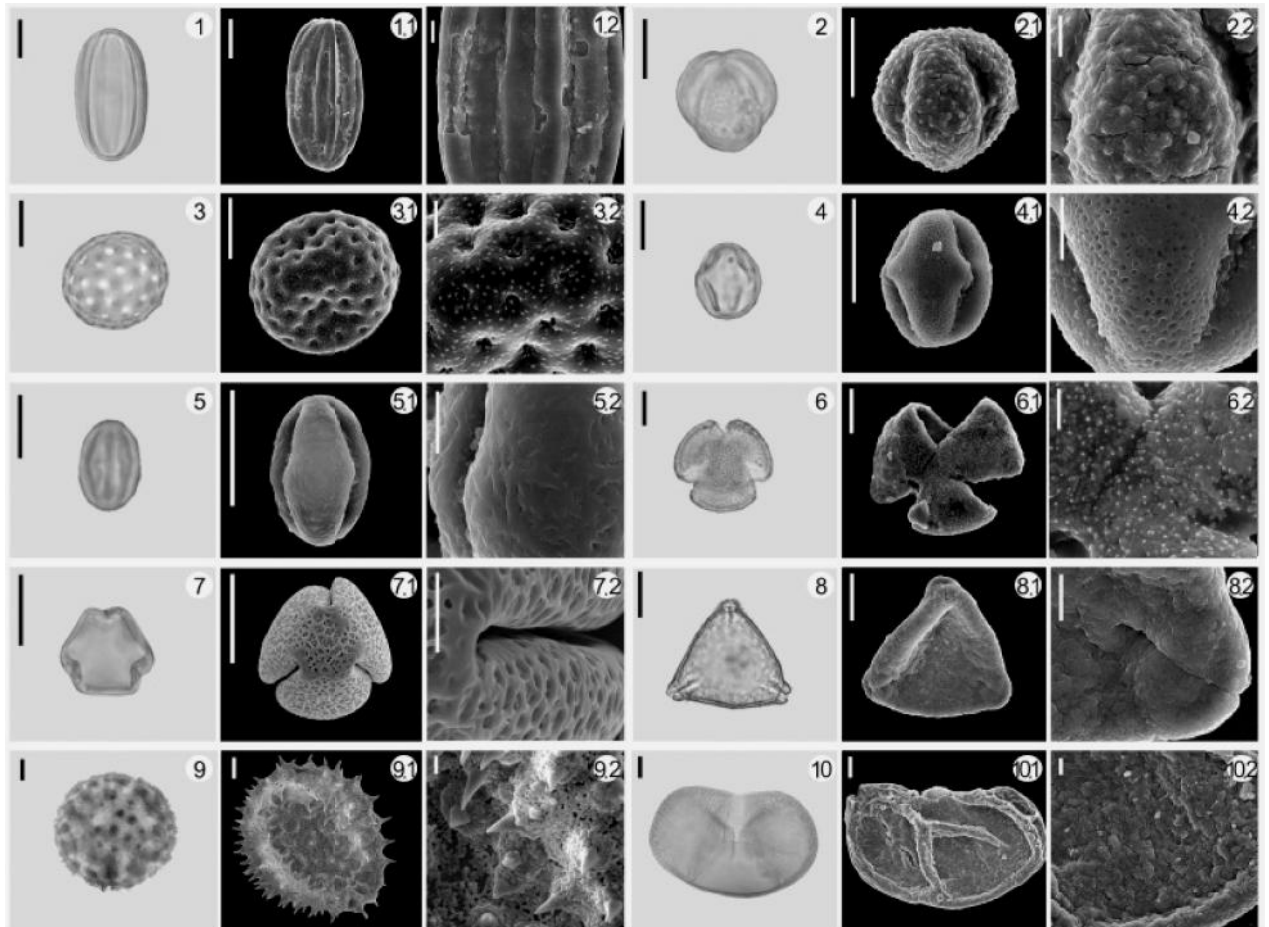
Photomicrographs of selected pollen grains recovered from the honey samples

1. Poaceae type, 2. *Catalpa ovata* (Bignoniaceae), 3. Ranunculaceae type, 4. Lamiaceae type,
  5. *Humulus* sp. (Moraceae), 6. *Juglans regia* (Juglandaceae), 7. *Glycine max* (Fabaceae),
  8. *Sophora japonica* (Fabaceae), 9. *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae),
  10. Brassicaceae type, 11. Chenopodiaceae type, 12. *Allium* sp. (Liliaceae),
  13. *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae), 14. Polygonaceae type, 15. *Rhus* sp. (Anacardiaceae)
  16. *Salix* sp. (Salicaceae), 17. *Prunus* sp. (Rosaceae), 18. *Melilotus suareolens* (Fabaceae),
  19. *Vitex negundo* var. *heterophylla* (Verbenaceae), 20. *Lycopodium* sp. (Lycopodiaceae)
- (Scale bar=20  $\mu\text{m}$  for Nos. 1, 2, 4–7, 9–20, =10  $\mu\text{m}$  for Nos. 3, 8).



1. Poaceae 2. Ranunculaceae 3. Lamiaceae 4. Castanea 5. Alhagi 6. Apiaceae 7. Chenopodiaceae 8. Picea 9. Betula 10. Artemisia 11. Ephedra 12. Moraceae 13. Caryophyllaceae 14. Fabaceae 15. Pinus 16. Ulmus 17. Salix 18. Vitis 19. Typha 20. Potamogetonaceae 21. Malvaceae 22. Convolvulaceae 23. Elacagnaceae 24. Polypodiaceae; Scale bar=20  $\mu$ m.

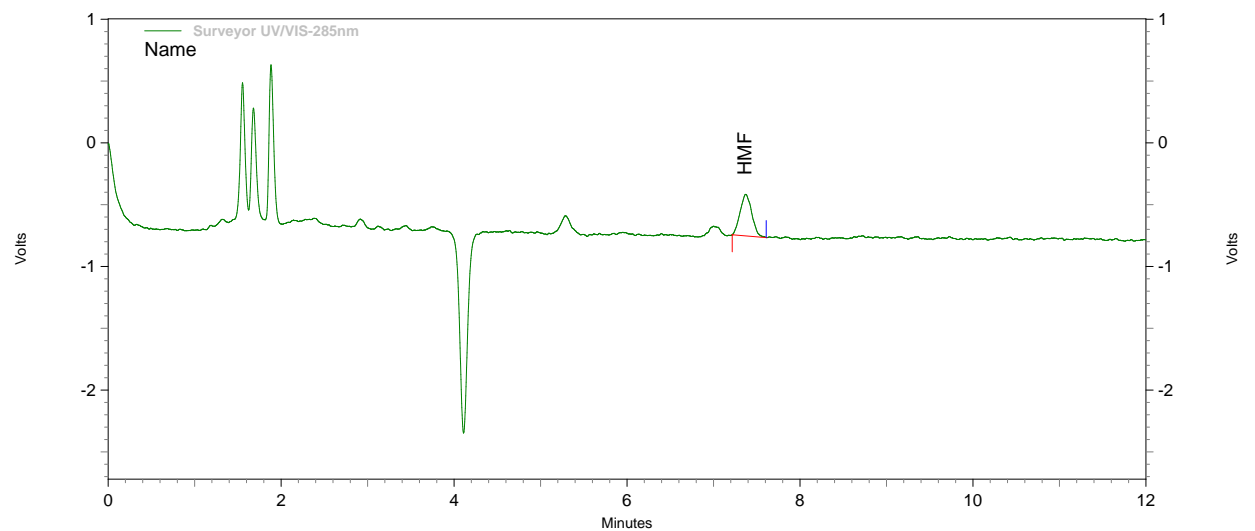
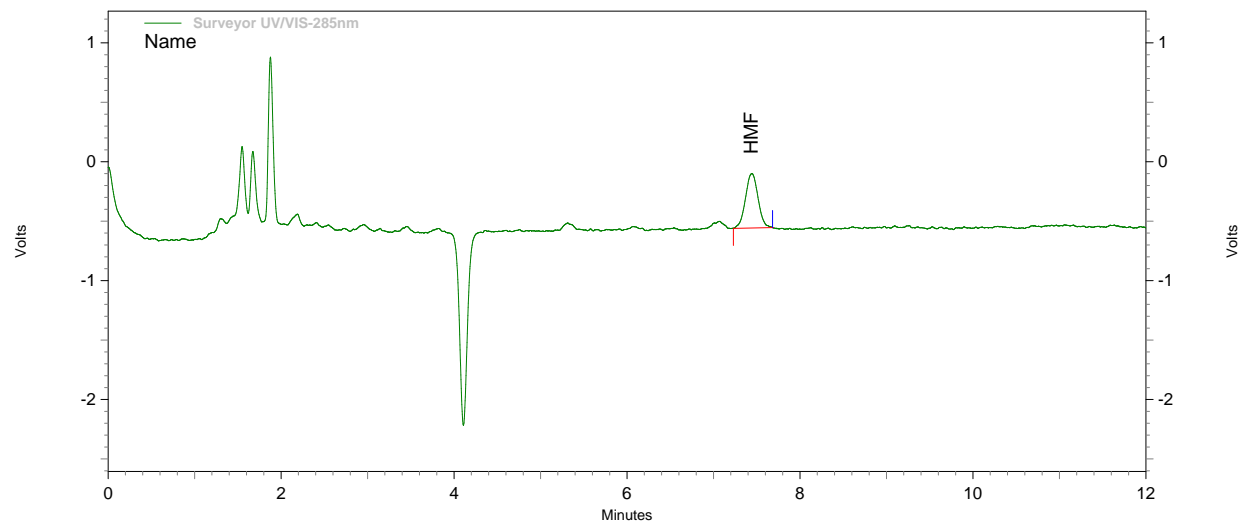
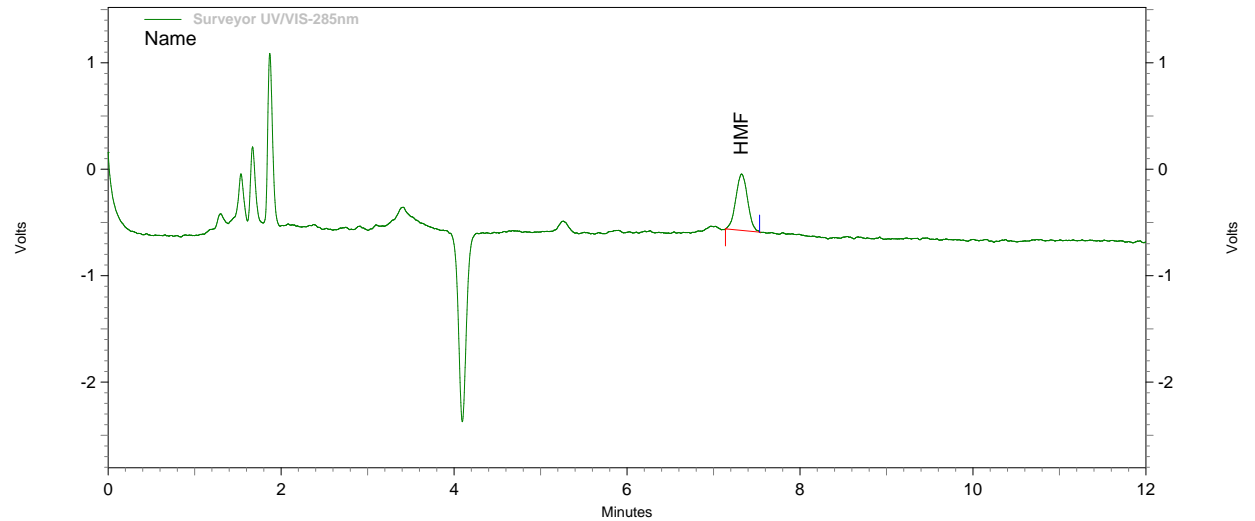




1. Ephedra 2. Artemisia 3. Chenopodiaceae 4. Alhagi 5. Castanea 6. Ranunculaceae 7. Vitis 8. Flaeagnaceae 9. Malvaceae 10. Picea;  
Scale bar in light microscope (LM) and scanning electron microscopic (SEM) overview 10  $\mu\text{m}$ , in SEM close-up 2.5  $\mu\text{m}$ .

## Chromatogrammes de dosage d'Hydroxyméthylfurfural (HMF) par HPLC

Echantillon de miels : E02, E04, E09 respectivement,

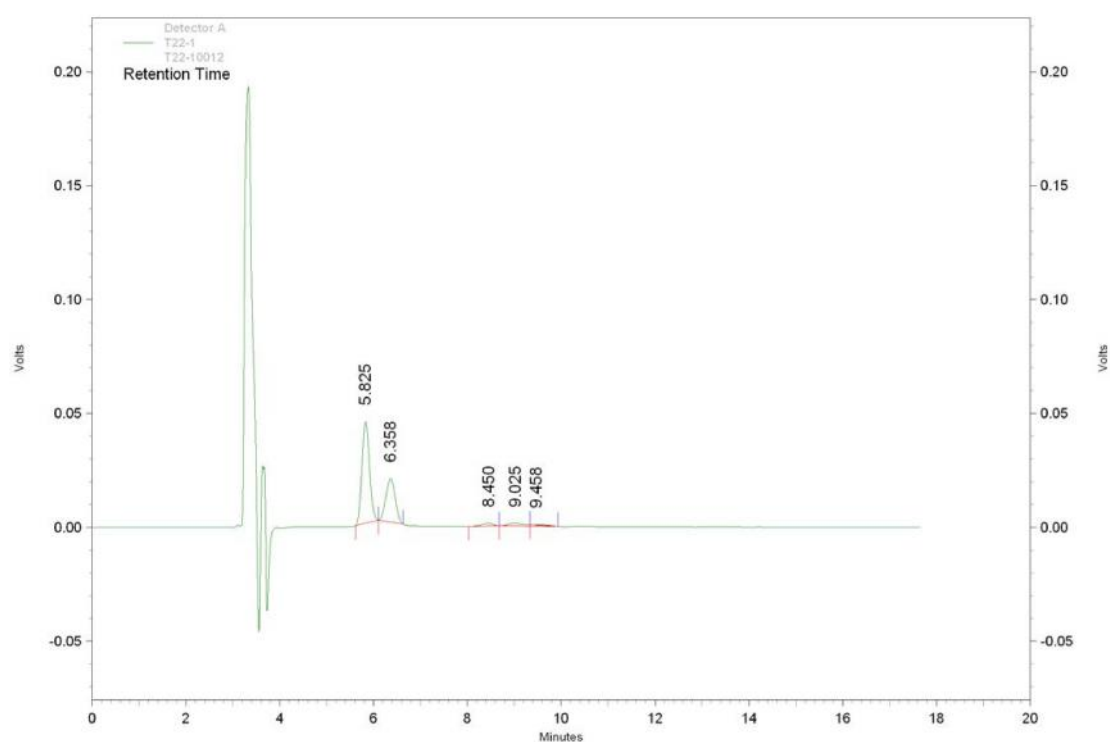


## Chromatogramme de dosage de sucres (Fructose, Glucose, Sucrose et maltose) de l'échantillon N°08 par HPLC

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP2

Area % Report Page 1 of

**Method Name:** D:\shimadzu\methods\SUGER10122015ACN.met  
**Data Name:** C:\CLASS-VP\T22-10012  
**User:** System  
**Acquired:** 11/27/2015 2:21:01 PM  
**Printed:** 12/10/2015 3:41:10 PM

**Detector A**

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height	ESTD concentration	Units
1	fructose	5.825	504153	44635	40.264	%
2	glucose	6.358	265140	19079	22.238	%
3	sucrose	8.450	18302	1062	1.419	%
4	maltose	9.025	25933	1091	2.357	%
5		9.458	5497	168	0.000	
<b>Totals</b>			819025	66035	66.278	

## Résumé

Le miel, un produit complexe, extrêmement riche, possède de nombreuses propriétés cosmétiques, nutritionnelles et thérapeutiques. Notre étude est réalisée sur neuf échantillons de miel récoltés de différentes régions de l'ouest algérien afin de caractériser leurs propriétés physicochimiques (densité, teneur en eau, matière sèche, acidité totale, cendre, conductivité électrique, sucres, HMF, polyphénols et flavonoïdes), de déterminer le niveau des éléments traces métalliques (ETM) (Fe, Cu, Mg, Zn, Ni et certains métaux toxiques Pb et Cd) et la recherche de résidus de chloramphénicol. Par ailleurs, une analyse pollinique permettant de déterminer l'origine botanique de ces miels est effectuée. Aussi une détermination des vertus thérapeutiques *in vitro* et *in vivo* de ces miels (activités antioxydante, immunomodulatrice et antibactérienne) est mise en évidence. Les résultats d'analyses physicochimiques, du dosage des ETM toxiques et des résidus de chloramphénicol ont montré la conformité des miels étudiés aux normes internationales du codex alimentarius à l'exception du miel N°08 qui présente des traces de chloramphénicol. L'analyse palynologique a permis d'identifier cinq miels monofloraux et quatre multifloraux avec une dominance de l'*Eucalyptus sp.*, *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba*, *Daucus carota*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, et *Papaver rhoeas* comme espèces omniprésentes dans la région de l'ouest Algérien. Tous les miels étudiés présentent une activité antioxydante considérable avec un I% élevé pour le miel N°03 (27,289%) qui est corrélé ( $R^2=0,99$ ) avec sa teneur élevée en polyphénols. L'effet immunomodulateur du miel a été prouvé *in vivo* avec le même échantillon qui montre une diminution significative ( $p<0,01$ ) du taux des IgG Anti-OVA chez les souris Balb/c injectées de 100µl de miel 06h avant, 06h après et en même temps que l'immunisation par l'antigène OVA. L'étude *in vitro* de l'effet antibactérien de ces miels indique qu'ils possèdent un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries pathogènes Gram+ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*) qui sont plus sensibles que ceux Gram- (*Escherichia coli* et *Proteus mirabilis*). Cependant *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* montrent une résistance aux différents miels testés mais sont inhibées ou éliminées à des concentrations élevées (>40%). Ces résultats ouvrent une perspective intéressante dans le domaine clinique et suggère l'utilisation potentielle du miel comme un alicament en technologie agro-alimentaire.

**Mots-clés :** Miel, Propriétés Physicochimiques, Métaux Toxiques, Chloramphénicol, Analyse palynologique, vertus thérapeutiques.

## Abstract

Honey is a complex product, extremely rich, has many cosmetic, nutritional and therapeutic properties. Our study is performed on nine honey samples collected from different regions of western Algeria to characterize the physicochemical properties (density, water content, dry matter, total acidity, ash, electrical conductivity, sugars, HMF, polyphenols and flavonoids) to determine the level of metallic trace elements (ETM): Fe, Cu, Mg, Zn, Ni and some toxic metals (Pb and Cd) and the search for chloramphenicol residues. In addition, a pollen analysis to determine the botanical origin of the honey is made. As a determination of therapeutic properties *in vitro* and *in vivo* of these honeys (antioxidant, immunomodulatory and antibacterial activity) is highlighted. The results of physicochemical analysis, determination of toxic ETM and residues of chloramphenicol showed compliance of studied honeys with international standards of alimentarius codex except sample N°08 which shows traces of chloramphenicol. The pollen analysis identified five single-flower and four multiflorous honeys with a dominance of *Eucalyptus sp.*, *Foeniculum vulgare*, *Hedysarum coronarium*, *Olea europea*, *Ziziphus jujuba*, *Daucus carota*, *Taraxacum officinale*, *Brassica napus*, *Matricaria recutita*, and *Papaver rhoeas* species as ubiquitous species in the region of western Algeria. All studied honeys show considerable antioxidant activity with high I% for sample N°03 (27.289%), which is correlated ( $R^2=0.99$ ) with its high polyphenol content. The immunomodulatory effect of honey has been shown *in vivo* with the same sample which shows a significant decrease ( $p<0.01$ ) of Anti-OVA IgG levels in Balb/c mice injected with 100 µl of honey 06h before, 06h after and at the same time that immunization with OVA antigen. The *in vitro* study of the antibacterial effect of these honeys indicates that they have an inhibitory effect on the growth of pathogenic bacteria Gram+ (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus hominis*), which are more sensitive as Gram- (*Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*). However, *Pseudomonas Aeruginosa*. and *Enterobacter cloacae*. Show a resistance to various kinds of honey tested but they are inhibited or eliminated at high concentrations (> 40%). These results open an interesting perspective in the clinical area and suggest the potential use of honey as a health food in food technology.

**Keywords:** Honey, Physicochemical Properties, Toxic Metals, Chloramphenicol, palynological analysis, therapeutic virtues

هو	للغاية، لديه العديد	التجميلية والغذائية والعلاجية. يتم تنفيذ	عينات	جمعها
لتحديد	ها الفيزيوكيميائية (	الكلية،	التوصيل الكهربائي، السكريات،	HMF البوليفينولات والفلافونويد ( تحديد
العناصر المعدنية الدقيقة (ETM): الحديد	المغنسيوم	النكل	( والكادميوم)	بقايا الكلورامفينيكول.
تحليل	يسمح بتحديد	تسليط الضوء على	العلاجية عند الاحياء و	هذه العينات من
(الخاصية	تأثير المناعي	التحليل الفيزيوكيميائي، تحديد	الكلورامفينيكول عينات	معايير
الدولية لهيئة	08 الذي يحتوي	لكلورامفينيكول. تحليل	زهرة	متعددة الأزهار هيمنة
	ي كليلية، الزيتون			
بين ارتفاع كبير للنشاط	مع نفس العينة رقم 03 التي أظهرت	في نسبة التثبيط ل	( $R^2 = 0.99$ )	البوليفينول
6	6	مستضد ألبومين البيض.	لبروتين البيض OVA	Balb/c
حقنها ب 100 ميكرو لتر	6	تأثير	للجراثيم المختبر لهذا	لديهم تأثير
البكتيريا	Gram+ : العسوية الشمعية،	العنقودية هومينيس،	مثيلتها Gram- : الإشريكية القولونية	بينما
الزنجارية والأمعانية المذرقية تظهر		ها تنبئ أويقضى عليها في تراكيز عالية (>40%).	هذه النتائج وجهة	مثيرة للاهتمام
وي إمكانية	تكنولوجيا			
<b>المفتاحية:</b>	فيزيوكيميائية،	كلورامفينيكول، تحليل	العلاجية.	