

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB – Blida**

**FACULTE DES SCIENCES AGRO-VETERINAIRES**

**DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**

**Contrôle de la qualité des miels locaux ; isolement des  
bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille et l'étude de  
leurs aptitudes technologiques (pH et croissance) dans le lait  
écrémé seul et le lait enrichi par le miel**

**Projet de fin d'étude en vue de l'obtention  
du diplôme de Master académique en sciences de la nature et de la vie**

**Filière : Sciences alimentaires**

**Spécialité : Nutrition et Contrôle des Aliments**

HANIFI Samir

**Devant le jury composé de:**

M. HADJ SADDOK T.	MCB	USDB	Président
Mme DOUMANDJI A.	MCA	USDB	Promotrice
M. ABDELLAOUI Z.	MAA	USDB	Examinatrice
Mme OUTALEB T.	MAB	USDB	Examinatrice
M. TEFFAHI D.	Chercheur	Lab. Hyg.	Invité

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013

## Remerciements

Un grand merci à **Mme DOUMANDJI A.** maître de conférences à l'université de Blida, pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail et de me diriger ainsi que pour ses conseils et orientation, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie **M. HADJ SADDOK T.** maître de conférences à l'université de Blida, qui me fait l'honneur de présider ce travail.

Mes remerciements vont également à **Mme OUTALEB T.** maître assistante à l'université de Blida, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie aussi **Mme ABDELLAOUI Z.** maître assistante à l'université de Blida pour l'honneur qu'il m'a fait en accepter d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements à **M. TEFFAHI Djamel** laborantin principal au niveau de laboratoire d'hygiène de Blida, pour son aide précieuse et de m'avoir accueillie au sein de laboratoire, à tous le personnel de laboratoire d'hygiène en particulier **M. EL HADJ H'MIDA.**

A **Mme LASSASSE** responsable de laboratoire de Bactériologie de l'EPH de Boufarik de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi pour son aide et assistance.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de Laboratoire Central ITELV pour leur convivialité, en particulier **Mme Asma** et **Mme Djinane.**

Je remercie également **M. SAADI S.** et **M. DAHMANE** pour ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

## **Dédicaces**

*Je dédie ce travail à :*

**Ma mère et mon père** qui m'ont soutenu, encouragé et motivé toute au long de ce travail.

**Mes frères** : Oussama, Mohamed, Soufiene et Ferhat

**Mes sœurs** : Nedjoua et Zahia

**Mes neveux et nièces** : Anis, Achraf, Adil, H'mimed, Islem, Imad, Mohamed, Marama et Hasna

**Mes amis** : Ismail, Moussa, Sid Ahmed, Hafsa et Lamia.

*Samir*

## Résumé

Cinq variétés de miels de différentes régions d'Algérie ont été récoltées durant l'année 2012, dans le but de contrôler leurs qualités physico-chimiques, microbiologiques ainsi que l'étude de leurs effets antimicrobiens sur quelques germes pathogènes.

Le miel inhibe effectivement la croissance des germes pathogènes aussi bien pour les bactéries Gram(+) (*Bacillus* sp, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) et pour les bactéries Gram(-) (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Cet effet montre des sensibilités importantes avec des concentrations différentes des cinq variétés de miel étudiées. Par contre, on n'a pas trouvé un effet antimicrobien vis-à-vis d'*Enterococcus* sp et de *Streptococcus* sp.

L'effet du miel sur l'aptitude technologique (pH et croissance) des bifidobactéries isolés à partir des intestins de l'abeille au cours de la fermentation a montré que cet extrait exerce un effet stimulateur sur l'activité acidifiante et sur la croissance de *Bifidobacterium* sp et réduire aussi leur mortalité.

Une diminution progressive des valeurs du pH dans les deux types de lait où il atteint une valeur de 4,25 pour le lait sans miel et une valeur de 4,08 pour le lait enrichi en miel. Cette diminution de pH ou l'augmentation de l'acidité s'explique par l'activité microbienne qui met en évidence la production d'acide lactique et d'acide acétique par fermentation du lactose qui correspond à la croissance des bifidobactéries.

Le suivi de la cinétique de croissance des bifidobactéries, montre un comportement différent de cette flore bactérienne ou au début la croissance est plus accélérée pour le lait écrémé additionné de miel par rapport à celui observé dans le lait seul. Le miel peut être considéré comme prébiotique et stimulateur de la croissance de la flore bifide.

**Mots clé:** Miels, qualité, *Bifidobacterium* sp, activité antimicrobienne, pH et croissance.

## Summary

Five varieties of honey from different regions of Algeria were collected during 2012 in order to control their physicochemical and microbiological qualities, and the study of their antimicrobial effects on some pathogens.

Honey effectively inhibits the growth of bacteria as pathogenic properties for Gram (+) bacteria (*Bacillus* sp, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) and Gram (-) bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). This effect shows significant sensitivities with different concentrations of the five varieties of honey studied. By cons, we did not find an antimicrobial effect against *Enterococcus* sp and *Streptococcus* sp.

The effect of honey on the processing quality (pH and growth) of bifidobacteria isolated from the gut of the bee during the fermentation showed that the extract has a stimulatory effect on the acidifying activity and growth *Bifidobacterium* sp and also reduce mortality.

A gradual decrease in pH values in both types of milk when it reaches a value of 4,25 for milk without honey and a value of 4,08 for the enriched milk. This decrease in pH or increasing the acidity is due to microbial activity that highlights the production of lactic acid and acetic acid from lactose, which is the growth of bifidobacteria.

Monitor the kinetics of growth of bifidobacteria, shows a different behavior of the bacterial flora, in the earlier growth, it's accelerated in the milk enriched with honey, compared to that observed in only skim milk. Honey can be considered as a prebiotic and growth stimulator of the bifid flora.

**Keywords:** Honey, quality, *Bifidobacterium* sp, antimicrobial activity, pH and growth.

## الملخص

تم جمع خمسة أصناف مختلفة من العسل من مناطق مختلفة من الجزائر خلال سنة 2012 من أجل مراقبة نوعيتها, الفيزيوكيميائية و الميكروبيولوجية و دراسة أثارها المضادة على بعض الميكروبات الممرضة.

العسل يمنع فعليا نمو البكتريا الممرضة بالنسبة لبكتريا غرام + مثل

*Bacillus sp, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis*

و أيضا بالنسبة لبكتيريا غرام – مثل

*Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa*

هذا التأثير يظهر حساسيات كبيرة مع تركيزات مختلفة للأصناف الخمسة المدروسة.

تأثير العسل على الخصائص التكنولوجية (الحموضة و النمو) للبيفيدوبكتريا المعزولة من أمعاء النحلة خلال فترة

التخمير يظهر أن للعسل اثر تحفيزي علي الحموضة و النمو و يقلص موت البيفيدوبكتريا.

ارتفاع كبير في درجة الحموضة في كلا نوعي الحليب حيث نجد 4.25 في الحليب بدون عسل و 4.08 في الحليب

المضاف إليه العسل. هذا الارتفاع في درجة الحموضة يعود إلى عمل البكتريا حيث تنتج حمض اللاكتيك و حمض

الاستيك عن طريق تخمير سكر اللاكتوز.

مراقبة تطور نمو البيفيدوبكتريا يظهر سلوك مختلف ففي البداية النمو يكون سريعا في الحليب المضاف إليه العسل

بالمقارنة مع الحليب الخالي من العسل.

**الكلمات الدالة:** عسل, نوعية, بيفيدوبكتريا, ضد المكروبات, حموضة و نمو.

## Sommaire Pages

---

Liste des abréviations  
Liste des figures  
Liste des tableaux

**Introduction** ..... 1

### Partie bibliographique

#### Chapitre I : généralités sur l'abeille

I. Historique .....	3
II. L'abeille ( <i>Apis mellifera</i> ) dans la classification systématique .....	3
III. Morphologie .....	4
IV. Anatomie interne de l'abeille <i>Apis mellifera</i> .....	5
V. La vie sociale de la colonie d'abeilles <i>Apis mellifera</i> .....	7
VI. Durée de vie des abeilles .....	10
VII. L'importance des abeilles .....	10

#### Chapitre II : Le miel

I. Généralités sur le miel .....	12
II. Composition chimique moyenne du miel .....	15
III. Les propriétés du miel .....	19
IV. Production du miel .....	26
V. Technologie du miel .....	27
VI. Actions frauduleuses .....	31

#### Chapitre III : Les bifidobactéries

I. Découverte et historique .....	33
II. Taxonomie .....	33
III. Morphologie .....	33
IV. Ecologie .....	34
V. Physiologie .....	35
VI. Intérêts des bifidobactéries .....	37

#### Chapitre IV : Matériel et méthodes

I. Matériel .....	40
II. Méthodes .....	40
II.1. Echantillonnage .....	40
II.2. Le plan expérimental .....	42

II.3. Analyses physico-chimiques .....	43
II.4. Analyses microbiologiques .....	47
II.5. Mise en évidence l'effet antimicrobien du miel .....	53
II.6. Isolement de bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille .....	56
II.7. Suivi de l'acidification et de la croissance de <i>Bifidobacterium</i> sp .....	61
III. Les analyses statistiques .....	63

## **Chapitre V : Résultats et discussions**

I. Résultats des analyses physico-chimiques .....	64
II. Résultats des analyses microbiologiques .....	72
III. Résultat de l'effet anti-microbien .....	73
IV. Résultat de l'isolement de <i>Bifidobacterium</i> .....	80
V. Résultats de l'évolution du pH dans les deux types de lait .....	81
VI. Résultats de l'évolution de la flore bifide .....	83
VII. Résultats des analyses statistiques .....	85
<b>Conclusion</b> .....	88
<b>Références bibliographiques</b> .....	90
<b>Tables des matières</b> .....	96
<b>Annexes</b> .....	100



## La liste des abréviations

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**Bf** : *Bifidobacterium*

**Cd**: Cendre.

**DM** : Délutions décimales.

**FAO**: Food and Agriculture Organization.

**GAMT** : Germes aérobies mésophiles totaux.

**GMH** : Gélose Muller Hinton.

**J.O.R.A** : Journal Officiel de la République Algérienne.

**h**: heure.

**HMF** : Hydroxymethylfurfural.

**ISO** : Organisation internationale de normalisation.

**ITELV** : Institut Technique d'Elevage.

**LM** : Lait enrichi par le miel.

**LS** : Lait seul.

**Mf** : Mcfarland.

**MO** : Matière Organique.

**MRS**: Gélose de Man, Rogosa, Sharpe.

**MS** : Matière Sèche.

**N** : normalité.

**NF** : Norme Française.

**OGA** : Glucose à l'Oxytetracycline.

**pH** : potentiel d'Hydrogène.

**PCA**: Plate Count Agar.

**T** : Temps.

**TSE**: Tryptone- Sel- Eau.

**VF** : Gélose Viande Foie.

**VRBL** : Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre.

**UV** : Ultra Violet.

**UFC** : Unité Formant Colonies.

## Liste des figures

Figure	Titre	page
Figure 1	<i>Apis mellifera</i> dans la classification systématique.	2
Figure 2	Les principaux organes de l'ouvrière.	5
Figure 3	De l'œuf à la reine.	6
Figure 4	De l'œuf au faux bourdon.	7
Figure 5	De l'œuf à l'ouvrière.	7
Figure 6	<i>Apis mellifera</i> butinant une fleur.	11
Figure 7	Production du miellat.	12
Figure 8	Composition moyenne du miel.	13
Figure 9	Cadre de miel operculé.	26
Figure 10	La désoperculation et l'extraction du miel.	27
Figure 11	La filtration.	27
Figure 12	Photographie d'un maturateur.	28
Figure 13	Le genre <i>Bifidobacterium</i> .	32
Figure 14	Types de miels étudiés.	39
Figure 15	Réalisation des dilutions décimales.	46
Figure 16	Préparation de différentes dilutions du miel.	51
Figure 17	Un agitateur Vortex.	52
Figure 18	Un densitomètre.	52
Figure 19	Technique de diffusion sur gélose.	53
Figure 20	La fixation de l'abeille	54
Figure 21	Protocole d'isolement des bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille.	55
Figure 22	Protocole d'identification de <i>Bifidobacterium</i> sp.	56
Figure 23	Suivi de pouvoir acidifiant et de la croissance de <i>Bifidobacterium</i> sp dans le lait écrémé seul et dans le lait additionné au miel.	58
Figure 24	Les valeurs moyennes du pH des miels analysés.	60
Figure 25	Acidité libre des cinq miels analysés.	61
Figure 26	Teneur en eau et matière sèche des miels étudiés.	62
Figure 27	Conductivité électrique des cinq variétés de miels étudiés.	63
Figure 28	Les valeurs des indices de couleur des miels analysés.	64
Figure 29	Les valeurs de la densité des miels analysés.	65
Figure 30	Les valeurs de l'absorbance des miels analysés.	66
Figure 31	Les valeurs de la teneur du HMF des miels analysés.	66
Figure 32	Les valeurs de la teneur en matière minérale des miels analysés.	67
Figure 33	Effet antimicrobien de miel sur <i>E. coli</i> .	70
Figure 34	Effet antimicrobien de miel sur <i>Bacillus</i> sp.	71
Figure 35	Effet antimicrobien de miel sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
Figure 36	Effet antimicrobien de miel sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	73
Figure 37	Effet antimicrobien de miel sur <i>Staphylococcus epidermis</i> .	74
Figure 38	Aspect macroscopique des colonies obtenues à partir du tube digestif de l'abeille.	76
Figure 39	<i>Bifidobacterium</i> sp vu au microscope photonique.	77
Figure 40	<i>Bifidobacterium</i> sp vu au microscope photonique.	77
Figure 41	Courbe d'évolution du pH dans le lait écrémé seul et dans le lait	78

	additionné de 10 % miel au cours d'incubation.	
<b>Figure 42</b>	Evolution de la croissance de <i>Bifidobacterium</i> sp durant la période $T_0 - T_{24}$ des deux types de lait.	<b>79</b>

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Principaux sels minéraux et oligo-éléments présents dans le miel.	15
Tableau II	Durée nécessaire pour la formation de 40mg HMF/kg de miel en fonction de la température de stockage.	17
Tableau III	Les différentes couleurs des miels en fonction de leur origine florale.	20
Tableau IV	Propriétés thérapeutiques attribuées aux principaux miels unifloraux.	23
Tableau V	Production de miel par pays, en 2010.	24
Tableau VI	Production de Miel en Algérie.	25
Tableau VII	Les espèces de bifidobactéries et leurs origines.	33
Tableau VIII	Origine et dates de récolte des échantillons de miels étudiés.	38
Tableau. IX	Résultat du pH des miels étudiés.	106
Tableau X	Résultat de l'acidité des miels étudiés.	107
Tableau XI	Résultat de la teneur en eau des miels étudiés.	107
Tableau XII	Résultat de la conductivité électrique des miels étudiés.	107
Tableau. XIII	Résultat de la couleur des miels étudiés.	107
Tableau XIV	Résultat de la densité des miels étudiés.	108
Tableau XV	Résultat de l'absorbance des miels étudiés.	108
Tableau XVI	Résultat de la teneur en HMF des miels étudiés.	108
Tableau. XVII	Résultat de la teneur en Cendres des miels étudiés.	108
Tableau IX	Les résultats de l'analyse microbiologique.	68
Tableau X	Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur <i>Escherichia coli</i> .	69
Tableau XI	Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur <i>Bacillus</i> sp.	70
Tableau XII	Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur <i>P. aeruginosa</i> .	71
Tableau XIII	Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur <i>S. aureus</i> .	72
Tableau XIV	Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur <i>S. epidermidis</i> .	74
Tableau XV	Caractères biochimiques des bifidobactéries isolés.	76

<b>Tableau XXVI</b>	Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification (V pH), du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ).	<b>82</b>
<b>Tableau XXVIII</b>	L'analyse de la variance de pH en fonction de temps et la nature de lait.	<b>85</b>
<b>Tableau XXIX</b>	L'analyse de la variance de LogUFC en fonction de temps et de la nature de lait.	<b>87</b>

# **INTRODUCTION**

### Introduction

L'abeille, insecte social de l'ordre des hyménoptères, est née au Crétacé, il y a plus de cent millions d'années. Associée à l'image du miel, elle a toujours fasciné les hommes qui ont progressivement appris à l'élever, à l'entretenir et à la soigner. C'est *Apis mellifera* qui est l'espèce la plus intéressante en apiculture. Originnaire d'Asie, elle a été disséminée par l'Homme à travers le monde (**Hoyet, 2005**).

Les propriétés du miel sont connues depuis l'Antiquité. Selon les Egyptiens, le miel serait né des larmes du Dieu soleil Rê. Ils l'utilisaient comme offrande aux Dieux, mais aussi pour la production de médicaments, pour des soins de beauté, et comme agent sucrant dans la préparation de pains et gâteaux (**Rossant, 2011**).

Le miel d'abeille est un produit noble réputé doué de nombreuses propriétés thérapeutiques et dont l'utilisation par l'homme à cet effet remonte à l'antiquité. De nombreuses études avaient souligné l'action inhibitrice du miel sur divers microorganismes pathogènes (**Nagai et al., 2006**). Cependant, l'influence du miel sur la croissance des bifidobactéries sur le milieu lait n'a fait l'objet que de très peu de travaux. Selon **Lagrange et al. (1991)**, le miel a été utilisé pour exalter la saveur des yaourts et des crèmes glacées.

En ce qui concerne les bifidobactéries, plusieurs publications ont rapporté que leur croissance et leur survie dans le lait et dans le tractus gastro-intestinal étaient stimulées par la présence du miel d'abeille (**Shin et Ustunol, 2005**). L'idée d'ajouter du miel à des préparations de lait fermenté par des bifidobactéries en vue d'améliorer les aptitudes fermentaires de ces microorganismes.

Si l'introduction des bifidobactéries en industrie laitière s'est faite il y a plus d'une vingtaine d'années dans les pays technologiquement avancés, elle n'est par contre, pas encore envisageable dans certains autres pays comme l'Algérie. Cette situation est liée aux contraintes posées par le genre *Bifidobacterium* qui est très sensible à l'acidité développée dans le lait et à l'aérobiose relative qui y règne.

## Introduction

---

Il est urgent de contrôler les miels locaux du point de vue hygiénique à fin d'éviter toute intoxication ou intoxication pour le consommateur algérien.

Jusqu'à ce jour les ferments lactiques sont importés et très onéreux, il serait intéressant de mettre en place une collection de probiotiques autochtones isolés.

En proposant en originalité un isolement des bifidobactéries à partir des intestins des abeilles.

Les objectifs du présent travail sont:

- L'étude des paramètres physico-chimiques de cinq variétés de miels locaux (pH, acidité libre, teneur en eau, conductivité électrique, Hydroxymethyl furfural et matière minérale).
- La qualité hygiénique des miels à travers le dénombrement de la flore mésophile totale, coliformes totaux, coliformes fécaux, *Clostridium* sulfite-réducteurs, levures et moisissures.
- Mise en évidence l'effet antimicrobien du miel vis-à-vis de quelques germes pathogènes.
- L'isolement des bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille.
- L'étude des aptitudes technologiques (soit le pH et la croissance) de *Bifidobacterium* sp dans le lait seul et enrichi en miel.



**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **CHAPITRE I**

## **GENERALITES SUR L'ABEILLE**

## I. Historique

De tout temps, les abeilles ont toujours fasciné les hommes. En effet, dans beaucoup de civilisations et de croyances, le miel a toujours eu une place privilégiée. Il est notamment indissociable des rites et coutumes qui accompagnent la naissance et la mort. Ce cadeau de la nature est le symbole à la fois de la vie, de l'abondance, de la pureté et de la sagesse (**Lefief-Delcourt, 2010**).

La première peinture représentant des hommes cueilleurs de miel a été retrouvée en Espagne, et daterait d'environ 10 000 ans avant J.-C. Les propriétés du miel sont connues depuis l'Antiquité. Selon les Egyptiens, le miel serait né des larmes du dieu soleil Rê. Ils l'utilisaient comme offrande aux dieux, mais aussi pour la production de médicaments, pour des soins de beauté, et comme agent sucrant dans la préparation de pains et gâteaux (**Rossant, 2011**).

## II. L'abeille (*Apis mellifera*) dans la classification systématique

Dans l'arbre phylogénétique des animaux, les insectes forment une classe de l'embranchement des arthropodes définie par des téguments chitineux. Les insectes sont caractérisés par : un corps composé de trois parties (la tête, le thorax et l'abdomen) Chez les insectes, l'ordre des hyménoptères comprend plus de cent mille espèces. On trouve dans cet ordre les abeilles du genre *Apis* (**Le Conte, 2002**).

Les hyménoptères présentent des comportements étonnamment complexes, disposant d'un système nerveux et d'organes sensoriels particulièrement développés, représentant ainsi l'un des groupes les plus évolués parmi les insectes. L'existence d'un aiguillon et de comportements évolués (comme bâtir un nid avec des matériaux spécifiques) distingue certains hyménoptères classés dans l'infra-ordre des Aculéates. Les Apoïdes, sous embranchement des Aculéates, sont caractérisés par la présence de nombreux poils sur leurs cuticules et d'une longue langue (**Le Conte, 2002**).

On distingue les Apoïdes inférieurs qui sont tous solitaires, et les Apoïdes supérieurs qui comprennent la famille des *Apidae* et qui possèdent tous un degré de socialité. Actuellement, la tribu des *Apini* contient un seul genre *Apis*, et une seule espèce à laquelle appartient l'abeille domestique. Ce sont les abeilles dites

mellifères, que l'on retrouve un peu partout à travers le monde. De plus, c'est l'espèce la plus intéressante à élever, car ce sont elles qui assurent les meilleurs rendements. Elles sont caractérisées par un comportement hautement social. Les principales races d'*Apis mellifera* sont : *Apis mellifera mellifera* (abeille noire d'Europe occidentale), *Apis mellifera ligustica* (abeille Italienne), *Apis mellifera carnica* (abeille présente des Alpes à la mer Noire), *Apis mellifera caucasica* (abeille Caucasienne), *Apis mellifera intermissa* (pays du Maghreb), *Apis mellifera adansoni* (pays d'Afrique tropicale) etc (Pham-Délègue, 1999 ; Le Conte, 2002), (Figure 1).

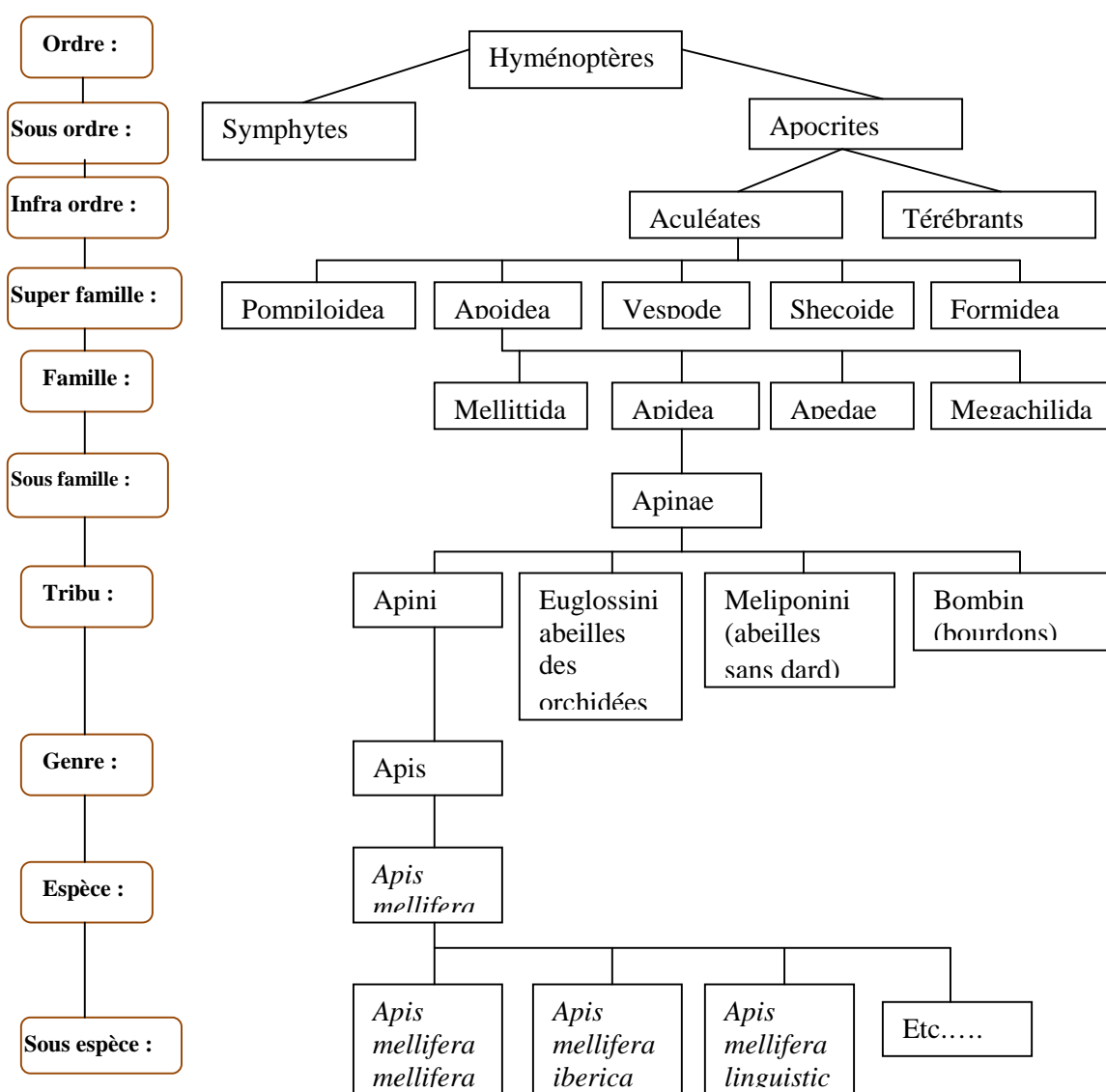


Figure 1: *Apis mellifera* dans la classification systématique (Le Conte, 2002).

### III. Morphologie

Le corps de l'abeille est entouré par une membrane externe de chitine appelé « cuticule » et forme un exosquelette en trois parties : tête, thorax et abdomen (**Le Conte, 2002**).

#### III.1. La tête

La tête est une capsule ovoïde qui extérieurement présente deux yeux composés et trois ocelles, deux antennes et les pièces buccales. Elle porte les principaux organes des sens et renferme un cerveau d'un volume important, ainsi que les glandes hypo-pharyngiennes, labiales et mandibulaires (**Le Conte, 2002**).

#### III.2. Le thorax

Situé entre la tête et l'abdomen, le thorax est constitué de trois segments communs à tous les insectes, plus une extension du premier segment abdominale. Il porte les éléments locomoteurs de l'abeille : deux paires d'ailes membraneuses et trois paires de pattes.

Les pattes sont composées de pièces articulées : la hanche, le trochanter, le fémur, le tibia et le tarse avec ses cinq parties dont la dernière porte des griffes et une pelote adhésive (**Le Conte, 2002**).

#### III.3. L'abdomen

L'abdomen comprend sept segments reliés entre eux par une membrane inter-segmentaire et formés chacun d'une partie supérieure, le tergite et une partie inférieure, le sternite. La taille de l'abdomen peut varier grâce à un système musculaire permettant l'extension ou le repli de la membrane qui relie les tergites et les sternites ainsi que les différents segments abdominaux.

L'abdomen porte sept paires de stigmates. Chez l'ouvrière, il comprend les plaques des glandes cirières sur les sternites 4 à 7, et la glande NASANOV, glande productrice de phéromone sur la membrane inter-segmentaire des tergites 6 et 7 (**Le Conte, 2002**).

#### IV. Anatomie interne de l'abeille *Apis mellifera*

##### IV.1. Le système circulatoire

Le système circulatoire de l'abeille permet le transport dans les différentes parties du corps de l'abeille, les éléments nutritifs, les produits des dégradations cellulaires et les différentes hormones ainsi que les œnocytes, cellules qui participent à la défense de l'organisme (**Le conte, 2002**).

##### IV.2. Le système nerveux

Le système nerveux de l'abeille est constitué de deux ensembles complémentaires :

- Le système nerveux central, avec le cerveau et la chaîne nerveuse ventrale ;
- Le système nerveux stomato-gastrique, lié à l'activité et au fonctionnement des organes internes, est l'équivalent du système nerveux sympathique des mammifères (**Le conte, 2002**).

##### IV.3. Le système respiratoire

Le système respiratoire prend et rejette l'air par des orifices appelés stigmates, situés de chaque côté des segments thoraciques et abdominaux. Ces vingt stigmates forment une structure complexe ou une valve et un système musculaire permettent la fermeture d'une chambre munie de poils filtrant l'air (**Le conte, 2002**).

##### IV.4. Le système digestif

Le système digestif de l'ouvrière adulte est situé principalement dans l'abdomen. Il prend naissance dans la bouche, et se prolonge en hypopharynx puis en pharynx, vient ensuite un long œsophage, qui conduit, dans l'abdomen au jabot.

Les substances nutritives passent depuis le jabot, dans le ventricule : il est le siège de leur digestion et absorption. Le ventricule est séparé de l'intestin antérieur par le pylore, dont la base porte les tubes de Malpighi, équivalent de nos reins.

Les déchets solides de la digestion transitent dans l'intestin et s'accumulent dans le rectum. L'ampoule rectale est très extensible pour permettre à l'abeille

d'accumuler les déchets, en particulier en hiver, avant de les excréter à l'extérieur de la colonie lors d'un vol « de propreté » (Le conte, 2002), (figure 2).

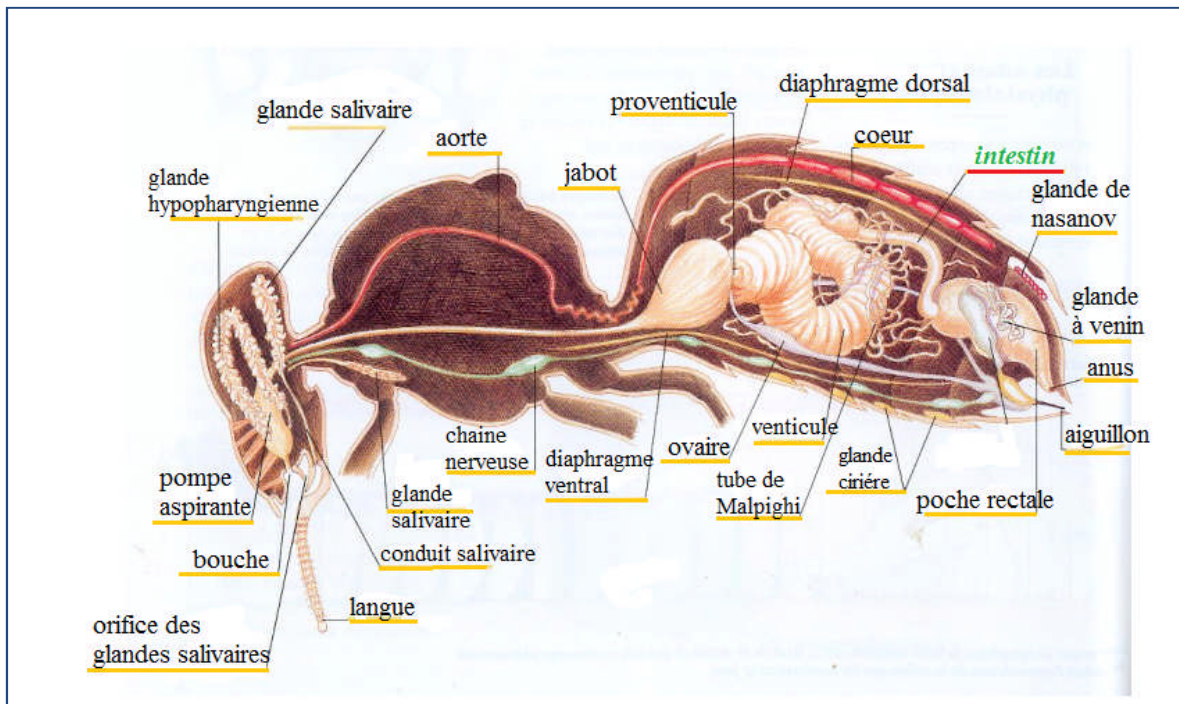


Figure 2: Les principaux organes de l'ouvrière (Le Conte, 2002).

## V. La vie sociale de la colonie d'abeilles *Apis mellifera*

Les abeilles possèdent une organisation fascinante. En effet, trois castes structurent la société des abeilles : la reine, les ouvrières et les faux bourdons.

Fort différents sur le plan morphologique comme dans leur espérance de vie, les membres de chaque caste assurent une tâche particulière. Chez les abeilles, chacun travaille dans l'intérêt du groupe, et de la vitalité de ce dernier dépend la survie de chacun. Au sein de la ruche, aucun individu ne peut vivre seul (Clément, 2009). En fonction de la taille et du stade de développement de la colonie, l'effectif de la population peut varier de 20 000 à 80 000 individus, dont : une reine, 1000 à 4000 mâles (présents uniquement d'avril à septembre), le reste étant constitué par les ouvrières (Rossant, 2011).

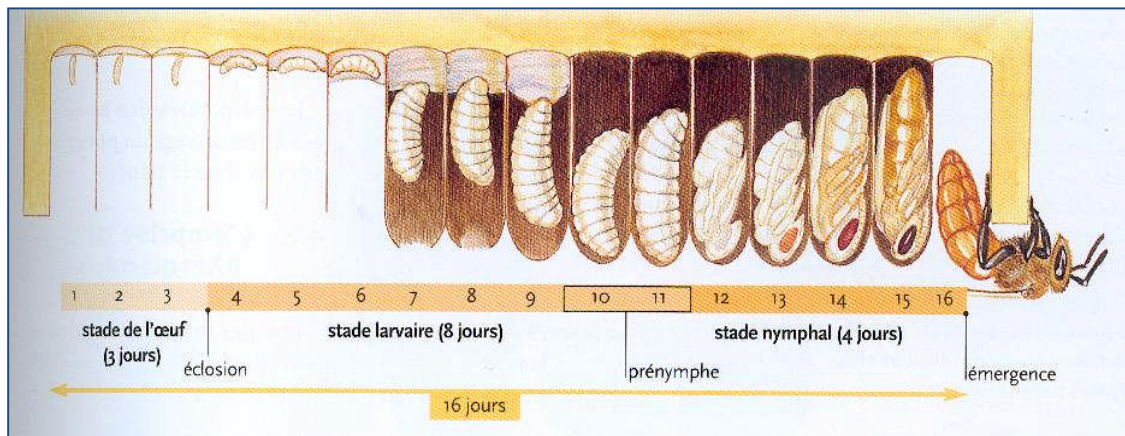
### V.1. La reine ou mère

La reine a un développement plus rapide que les ouvrières: il ne faut que 15 à 16 jours à une reine pour éclore (figure 3).

La reine a un rôle essentiel pour la ruche. Non seulement elle va permettre de renouveler la population grâce à sa fertilité hors du commun, mais elle va émettre

des phéromones qui vont rythmer l'activité de la ruche : en effet, trois rôles essentiels sont à noter (Rey, 2012):

- La reine va attirer les ouvrières, qui vont venir former une "cour royale", et ainsi essaimer les phéromones dans la ruche.
- En présence d'une reine fécondée les ouvrières n'élèveront pas de nouvelle reine. Les phéromones agiront alors comme des inhibiteurs sur le comportement de construction des cellules royales et sur la façon de nourrir les larves.
- A long terme la phéromone royale va avoir une action inhibitrice sur le développement ovarien des ouvrières. Si la reine vient à disparaître on a l'apparition d'une ruche dite "bourdonneuse": les abeilles se mettent à pondre des œufs non fécondés qui deviendront de faux bourdons.



**Figure 3:** De l'œuf à la reine (Le Conte, 2002).

## V.2. Le mâle

Le mâle a un développement plus long, d'environ 24 jours (figure 4). Après leur naissance les mâles sont nourris par les ouvrières de nourriture de couvain, de pollen et de miel. Ils prendront ensuite leur envol au bout du septième jour en attendant l'opportunité de féconder une nouvelle reine, généralement dans un rayon de 3 à 4 km de la ruche initiale, assurant ainsi un brassage génétique, mais diffusant par la même occasion des parasites tel le varroa. Lors de la reproduction avec une reine l'appareil génital du mâle est arraché entraînant la mort rapide de l'individu. Il y a toujours quelques faux bourdons dans la ruche (entre 500 et quelques milliers, nombre relativement faible comparé aux dizaines de milliers d'ouvrières), qui n'ont aucun rôle mis à part la fécondation, mais qui permettent, en cas de disparition brutale de la reine, d'assurer une pérennité à la



ruche. Lorsque la préparation à l'hivernation arrive, en général fin août ou septembre, les faux bourdons sont chassés de la ruche et/ou sont tués par les ouvrières, et les larves sont mangés (Rey, 2012).

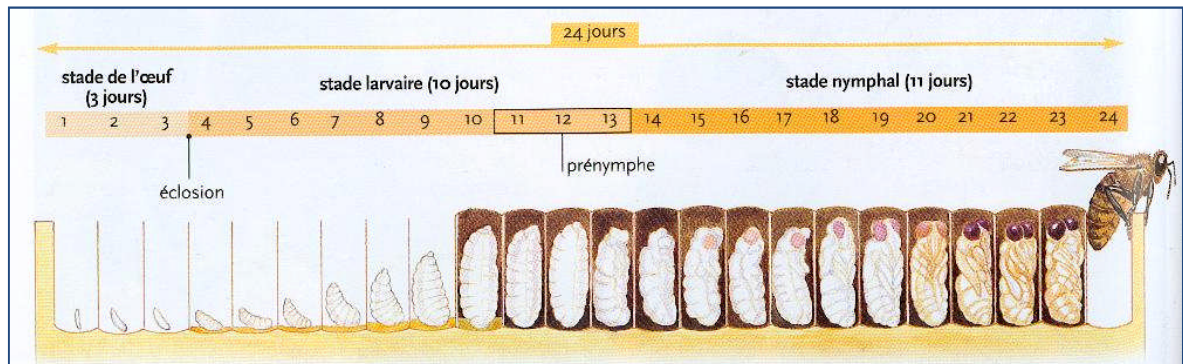


Figure 4: De l'œuf au faux bourdon (Le Conte, 2002).

### V.3. L'ouvrière

La vie d'une ouvrière passe par différents stades en fonction de son âge et de sa maturation : l'œuf fécondé éclot 3 jours après la ponte. Les ouvrières nourricières alimentent alors la larve avec une bouillie larvaire composée de miel et de pollen pendant 5 jours, permettant un accroissement rapide de la larve, celle-ci grandissant de 1700 fois sa taille initiale. A ce stade la cellule larvaire sera operculée après 21 jours (figure 5) (Rey, 2012).

Les ouvrières exécutent tous les travaux : entretien, nettoyage, soins aux jeunes, gardiennage, élaboration du miel, construction des rayons, butinage. Toutes ces fonctions et ces activités correspondent à des adaptations physiologiques et sont rythmées par le développement de différentes glandes, en fonction de leur âge et selon les besoins de la colonie (Marchenay et Bérard, 2007).

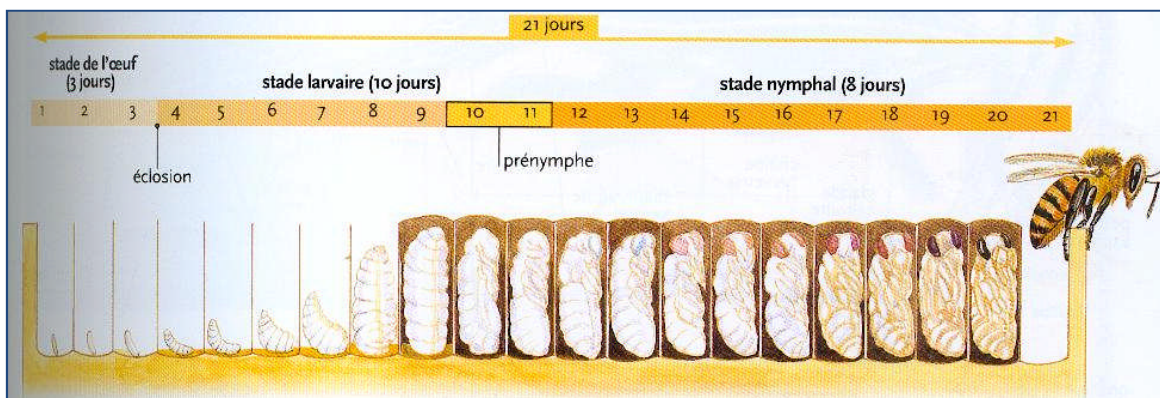


Figure 5: De l'œuf à l'ouvrière (Le Conte, 2002).

## VI. Durée de vie des abeilles

La longévité des abeilles varie en fonction de leur caste et de la saison (**Rey, 2012**):

- Une ouvrière à une durée de vie allant de 30 à 60 jours au printemps, lors du réveil de la ruche, 15 à 40 jours en été, au plus fort de l'activité tandis que les ouvrières d'hiver vivent en moyenne 140 jours.
- La durée de vie des faux bourdons est de 20 à 30 jours au printemps et en été, mais elle peut atteindre les 90 jours en automne, sachant que l'expulsion hors de la ruche à l'approche de l'hiver est souvent fatale, ces derniers ne se nourrissant que du miel de la ruche, et n'étant pas physiologiquement adaptés à la récolte du nectar.
- Enfin la reine à une durée de vie de 2 à 4 ans, le record observé jusqu'ici étant de 8 ans. Les apiculteurs recommandent de changer la reine tous les 3 ans, car le pic de ponte est atteint à la deuxième année.

## VII. L'importance des abeilles

« Si l'abeille disparaissait de la surface du globe, l'homme n'aurait plus que quatre années à vivre ». Cette prédiction bien connue et attribuée à **Albert Einstein** (bien qu'aucune preuve ne confirme cette paternité) montre pourtant par sa véracité à quel point l'abeille est primordiale aux écosystèmes du monde entier (**Rey, 2012**).

### VII.1. Rôle biologique (la pollinisation)

La pollinisation est le transfert du pollen des anthères (partie mâle de la fleur) aux stigmates (partie femelle de la fleur). La majorité des plantes utilisent l'entomophilie (pollinisation par les insectes) et/ou l'anémophilie (pollinisation par le vent), puis vient ensuite la zoophilie, notamment dans les régions froides ou peu d'insectes pollinisateurs survivent (**Rey, 2012**).

On estime que 80% des plantes sont entomophiles, et il a été estimé que la moitié des pollinisateurs des plantes tropicales sont des abeilles (**Dafni, 2005**). Cette forte prépondérance des abeilles est due à leur grand nombre et à leur comportement alimentaire. Ainsi contrairement aux idées reçues les abeilles sont avant tout attirées par le nectar de la fleur dont elles vont se nourrir et non pas par le pollen, bien que celui ci serve ensuite à la production de nourriture pour le

couvain. La morphologie générale des abeilles leur permet cependant d'être d'excellents pollinisateurs, notamment grâce à leurs poils. En effet, contrairement à beaucoup d'insectes, les abeilles sont très poilues, ce qui permet une bonne fixation et un bon transport du pollen d'une fleur à l'autre (**Rey, 2012**).

## VII.2. Rôle économique

En butinant à la recherche de nectar et de pollen, le tiers d'une colonie (ce qui peut représenter 15 000 – 20 000 abeilles) peut quitter la ruche pour butiner et produire jusqu'à 6 kg de miel. Pour chaque kilo de miel, il faut près de 50 000 vols et plus d'un million de fleurs visitées. Ceci en précisant que durant sa vie de butineuse, chaque ouvrière est spécialisée dans une espèce florale particulière et ce jusqu'à l'épuisement de la ressource ou l'identification de ressources plus intéressantes. Ces chiffres illustrent l'importance quantitative et qualitative de la pollinisation réalisée par l'abeille domestique (**Adam, 1985**).

L'apport de la pollinisation par les abeilles aux récoltes est exploité dans certains pays. Par exemple en Grande-Bretagne, en Italie, au Japon et dans les pays scandinaves, où l'on a observé une augmentation des productions parallèlement à l'augmentation du nombre de ruches par hectare. On peut opposer à cette situation d'enrichissement mutuel le cas de la France où ce sont les apiculteurs qui demandent à placer quelques unes de leurs ruches dans un verger, versant parfois même un « loyer » pour cette occupation qui sera profitable à l'arboriculteur (**Toullec, 2008**).

# **CHAPITRE II**

## **LE MIEL**

## I. Généralités sur le miel

### I.1. Définition

Dans de nombreux pays, la loi fournit une définition légale du miel. Cette dernière a pour objet la protection du consommateur contre les différents types de fraudes susceptibles d'être pratiqués (**Louveaux, 1968**).

Le *Codex alimentarius* définit le miel comme suit:

« Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles "*Apis mellifera*" à partir du nectar des plantes ou à partir des sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou à partir d'excrétions d'insectes butineurs laissées sur les parties vivantes de plantes, que les abeilles butinent, transforment en les combinant avec des substances spécifiques qu'elles sécrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche » (**Codex, 2001**).

### I.2. L'origine de miel

L'appétence naturelle des abeilles pour tout ce qui est sucré les amène à butiner différentes sources. Le miel est élaboré par les abeilles à partir de substances sucrées végétales provenant soit:

- des nectars de plantes (essentiellement de fleurs)
- des exsudats rejetés par des insectes piqueurs et suceurs (pucerons essentiellement)
- exceptionnellement, de jus de fruits déjà attaqués par d'autres insectes ou par de petits animaux (les pièces buccales de l'abeille ne lui permettant pas de perforer les fruits) (**Hoyet, 2005**).

#### I.2.1. A partir du nectar

##### • *Définition et origine du nectar*

Le nectar est produit par des organes propres aux végétaux supérieurs, qui portent le nom de nectaires. Ce sont des structures glandulaires de petite dimension dont la localisation est très variable, qui reçoivent un canal (faisceaux libéro-ligneux) acheminant la sève de la plante. On distingue les nectaires floraux (à la base des fleurs), des nectaires extra floraux (sur les feuilles, les tiges ou les autres parties de la plante). Le nectar reste accumulé sur le nectaire ou passe

dans un organe spécialisé, le plus souvent un éperon dans lequel il est protégé de la dessiccation (Hoyet, 2005).

#### • *Composition du nectar*

Le nectar se forme à partir de la sève de la plante, mais sa composition diffère de celle de la sève.

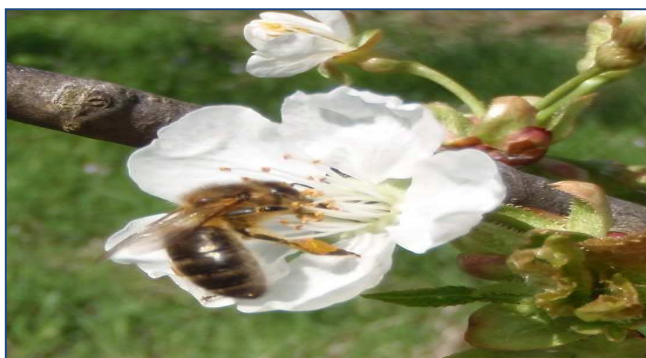
C'est une solution aqueuse plus ou moins visqueuse en fonction de sa teneur en eau qui peut être très variable: la matière sèche représente de 5 à 80 % du nectar.

Cette matière sèche est formée à 90% de sucres dont les plus courants sont le saccharose, le glucose et le fructose. Outre les sucres, largement majoritaires, on peut trouver des acides organiques (acide fumarique, acide succinique, acide malique, acide oxalique), des protéines dont des enzymes et des acides aminés (acide glutamique, acide aspartique, méthionine, sérine, tyrosine...), des substances aromatiques et des composés inorganiques (phosphate entre autre). Tous ces éléments vont donner au miel sa couleur et ses arômes (Hoyet, 2005).

#### • *Récolte du nectar par les butineuses*

Les nectaires sont généralement situés au fond de la corolle des fleurs. Pour y accéder, la butineuse doit pénétrer dans la fleur et allonger sa langue (Figure 6). Elle aspire le nectar, par pompage et par capillarité. Lorsque son jabot est rempli, elle rentre à la ruche où elle transfère le nectar "prédigéré" aux ouvrières manutentionnaires; cet échange de nourriture se nomme trophallaxie.

Chaque fleur butinée laisse dans le miel sa carte d'identité, au travers de son nectar mais surtout de ses micro-éléments (pigments, arômes, grains de pollens...) (Hoyet, 2005).



**Figure 6:** *Apis mellifera* butinant une fleur (Clément, 2009).

### I.2.2. A partir du miellat

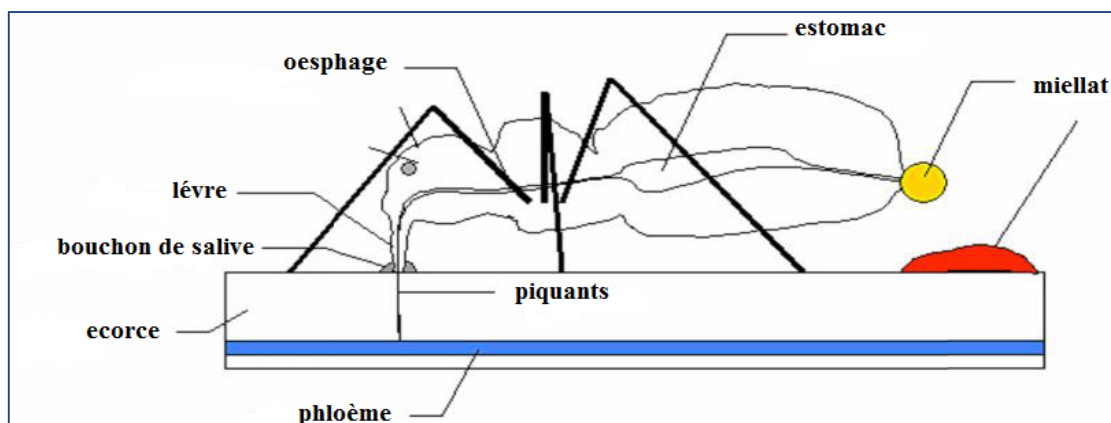
#### • *Définition et origine du miellat*

Le miellat est un produit sucré élaboré par divers insectes à partir de la sève des végétaux et dont se nourrissent certaines abeilles et fourmis (**Biri, 1999**).

Les insectes producteurs de miellat sont tous des hémiptères homoptères, c'est-à-dire que ce sont des insectes qui possèdent des pièces buccales leur permettant de piquer les tissus végétaux pour en prélever la sève. Ce sont des cigales, des psylles, des cochenilles et surtout des pucerons (**Hoyet, 2005**).

Ils perforent les tissus végétaux de la plante pour atteindre les faisceaux dans lesquels circule la sève. Celle-ci passe dans le tube digestif de l'insecte où elle est transformée en miellat qui est ensuite excrété par l'anus.

Selon **Leibing (1999)**, la transformation du suc élaboré commence déjà dans le phloème par l'action de la salive injectée par le puceron. Au cours de son passage dans les organes digestifs, des parties du suc de la plante qui a été avalé sont retirées. D'autres enzymes sont ajoutées au suc, ce qui modifie le spectre des sucres et des acides aminés du miellat (**Figure 7**).



**Figure 7:** Production du miellat (**Liebig, 1999**).

#### • *La récolte du miellat par l'abeille*

Les récoltes de miellat ont lieu entre la fin du printemps et l'été. Les quantités récoltées sont très variables d'une année à l'autre. En effet, les pucerons sont très sensibles aux conditions météorologiques défavorables, et sont exposés à de multiples prédateurs (coccinelles, punaises, guêpes). Il faut noter qu'en présence d'une abondance de nectar, cette source est délaissée par les abeilles. Les

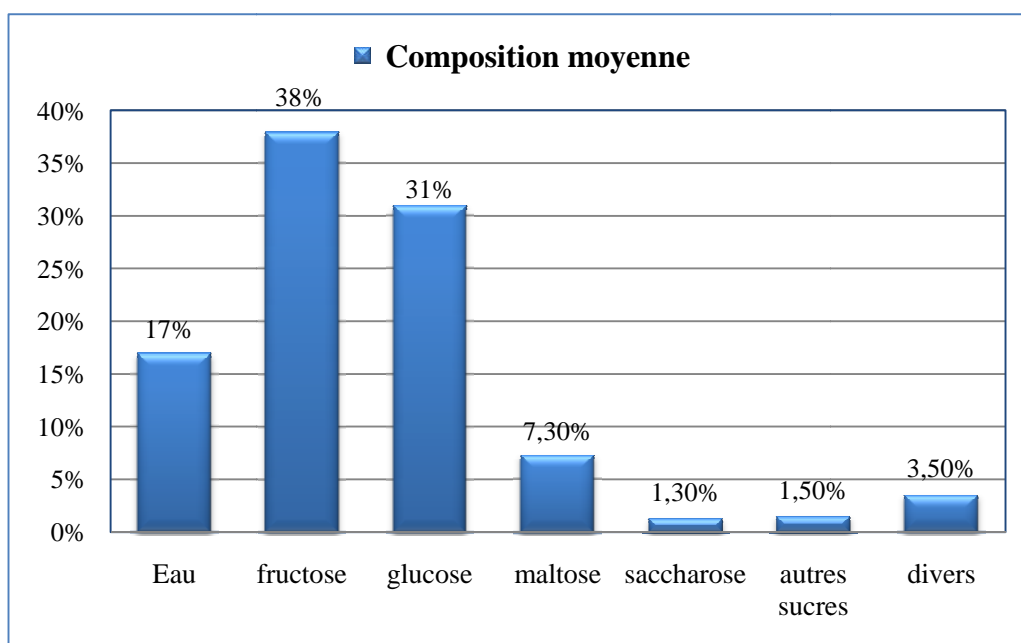


butineuses recueillent le miellat par léchage et remplissent progressivement leur jabot. Ce dernier plein, elles regagnent la ruche (**Hoyet, 2005**).

## II. Composition chimique moyenne du miel

Comme nous l'avons vu, le miel est un produit très complexe dont la fabrication demande plusieurs étapes qui toutes ont une influence sur sa composition chimique finale. En effet, la composition qualitative de ce produit est soumise à de nombreux facteurs très variables qu'il est impossible de maîtriser tels que : la nature de la flore visitée et celle du sol sur lequel pousse ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles, l'état physiologique de la colonie, etc. (**Rossant, 2011**).

La composition chimique varie d'un échantillon à l'autre, généralement, le miel contient des éléments majeurs et des éléments mineurs (**Figure 8**).



**Figure 8:** Composition moyenne du miel (**Bruneau, 2002**).

### II.1. Les éléments majeurs

- **L'eau :** La teneur en eau des miels varie entre 14 et 25%. L'optimum se situe autour de 17%, car un miel trop épais est difficile à extraire et à conditionner, tandis qu'un miel trop liquide riche en eau risque de fermenter (**Rossant, 2011**).



▪ **Les Glucides** : Les glucides représentent 95 à 99 % de la matière sèche du miel. C'est-à-dire que l'eau et les sucres ensemble forment la quasi-totalité du miel (**Louveaux, 1985**).

On trouve des monosaccharides (glucose et fructose) qui représentent 85% à 95% des sucres du miel mais c'est le fructose (lévulose) qui est presque toujours dominant, avec une teneur de 38% du poids du miel, tandis que la teneur en glucose est de 31%. On y trouve également du saccharose (1,5%) et du maltose (7,5%) ainsi que d'autres sucres présents à l'état de traces : isomaltose, nigérose, turanose, maltulose, isomaltulose, leucrose, gentiobiose, laminaribiose, mélézitose, erlose, dextrantriose, raffinose, isopanose, isomaltotétraose, maltotriose, panose, isomaltotriose (**Emmanuelle et al., 1996**).

## II.2. Les éléments mineurs

▪ **Les acides organiques** : la plupart des acides organiques du miel proviennent des nectars des fleurs ou des transformations opérées par l'abeille. C'est l'acide gluconique dérivé du glucose qui prédomine. 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. Des traces d'acide formique (un des constituants du venin), d'acide chlorhydrique et d'acide phosphorique sont aussi présentes. D'autres composés, les lactones, dont la présence est constante, ont également une fonction acide. Le pH peut varier de 3,2 à 4,5 mais il est en moyenne de 3,9 (**Pham-Délégue, 1999**).

▪ **Les protéines** : Les miels convenablement récoltés sont pauvres ou très pauvres en protéines (**Louveaux, 1968**).

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. On y trouve également des acides aminés libres dont la proline, qui provient des sécrétions salivaires de l'abeille (**Emmanuelle et al., 1996**).

Selon **Gonnet (1982)**, Les recherches les plus récentes ont permis de mettre en évidence dans différents miels la présence de 19 acides aminés libres.

- **Les lipides** : la proportion de lipides est infime sous forme de glycérides et d'acides gras (acide palmitique, oléique et linoléique) ; ils proviendraient vraisemblablement de la cire.
- **Les éléments minéraux** : La teneur en sels minéraux selon **White et al. (1962)**, est de l'ordre de 0,169 % en moyenne. Elle est donc faible ou très faible et sujette à des variations très importantes.

**Louveaux (1968)** signale que, d'une façon générale, les miels clairs sont nettement moins riches en cendres que les miels foncés. Les études de **White et al. (1962)** montrent qu'il existe une relation entre la couleur des miels et leur teneur en cendres.

**Gonnet (1982)** ajoute qu'on y trouve également à l'état de traces une trentaine d'éléments différents parmi lesquels le fer, le cuivre, le cobalt, le chlore, le soufre, le phosphore, le magnésium, le calcium, le sodium et le zinc...

Le miel peut contenir des polluants présents en très faible quantité, comme le plomb et le cadmium. Le dosage de ces polluants constitue un bon indicateur de la pollution de l'environnement (**Tableau I**).

**Tableau I:** Principaux sels minéraux et oligo-éléments présents dans le miel.

	mg/kg		mg/kg
<b>Potassium</b>	200 à 1500	<b>Plomb</b>	0,02 à 0,8
<b>Sodium</b>	16 à 170	<b>Cobalt</b>	0,01 à 0,5
<b>Calcium</b>	40 à 300	<b>Nickel</b>	0,3 à 1,3
<b>Magnésium</b>	7 à 130	<b>Aluminium</b>	3 à 60
<b>Fer</b>	0,3 à 40	<b>Cuivre</b>	0,2 à 6,0
<b>Zinc</b>	0,5 à 20	<b>Cadmium</b>	0,005 à 0,15

**Rossant (2011).**

- **Les enzymes** : Le miel contient plusieurs enzymes dont la présence est liée à l'origine double du miel : animal ou végétal, le nectar, contient dès sa récolte des enzymes qui agissent sur les sucres ; les sécrétions de l'abeille viennent y ajouter les enzymes secrétés par les glandes pharyngiennes (**Louveaux, 1968**).

De nombreuses enzymes se retrouvent dans le miel : l'invertase, l' $\alpha$ -amylase, la  $\beta$ -amylase, l' $\alpha$ -glucosidase et la glucose-oxydase capable de transformer le glucose en acide gluconique. Le miel contient aussi une catalase et une phosphatase. Ces diastases sont détruites par un chauffage exagéré du miel, il y a donc lieu d'éviter ce chauffage de miel si on veut bénéficier de leur action. Ainsi, leur dosage permet de détecter les fraudes liées au chauffage du miel (**Huchet et al., 1996**).

- **Les vitamines** : Le miel est relativement pauvre en vitamines, si on le compare à d'autres aliments. Les vitamines du miel ont presque toujours leur origine dans les grains de pollen (**Louveaux, 1985**).

**Donadieu (1984)** ajoute qu'il y a un grand nombre de vitamines, dont les quantités loin de pouvoir couvrir les besoins journalières de l'homme. On trouve essentiellement : les vitamines B1, B2, B3, B5, B6, et C, et accessoirement (en quantité négligeable): les vitamines (A, B8, B9, D, K).

- **Les substances aromatiques** : Les substances aromatiques ne sont pas importantes quant à leur poids. On dénombre plus de cinquante substances aromatiques qui peuvent permettre l'identification de l'origine des miels, car elles proviennent presque exclusivement de la plante (**Huchet et al., 1996**).

**Donadieu (1984)** ajoute que ces substances donnent l'arôme et le goût spécifique d'un miel déterminé, mais qui ont par ailleurs des vertus thérapeutiques.

- **Les pigments** : Le miel contient des produits pigmentaires qui donnent la couleur au miel. La coloration est une caractéristique physique très importante des miels car elle est en relation avec l'origine florale et la composition. Elle va de l'incolore au noir en passant par le blanc, le jaune, le

brun ambré et le brun vert. En général, les miels d'agrumes sont plus clairs que ceux des forêts.

Selon **Louveaux (1985)** et **Djerd (2008)** La couleur d'un miel est aussi un caractère très important sur le plan commercial.

- **L'hydroxyméthyl furfural (HMF)** : Il n'est pas un composant naturel des miels mais on le trouve néanmoins presque toujours à l'état de traces plus ou moins importantes. Le HMF est une substance produite lors de la dégradation des sucres et principalement le fructose. Ce processus a également lieu par vieillissement et est accéléré par le chauffage (**Gonnet, 1982**).

Selon **White (1964)** un miel frais contient une petite quantité d'HMF (0,06 - 0,02 mg /100g de miel).

Le HMF témoigne du bon ou du mauvais état de conservation du miel. En effet, un miel exagérément chauffé ou conservé trop longtemps dans des mauvaises conditions de température s'enrichit en HMF. Donc, ce produit est un indicateur de la fraîcheur du miel (**Adam et al., 1974**).

D'après **Bendahou et al. (2005)**, il y a deux paramètres entrent en jeu dans cette formation: la température et la durée de stockage ou conservation (**Tableau II**).

**Tableau II:** Durée nécessaire pour la formation de 40mg HMF/kg de miel en fonction de la température de stockage.

Température (° C)	Durée pour 40 mg de HMF/kg
4	20 – 80 ans
20	2 – 4 ans
30	0,5 – 1 ans
40	1 – 2 mois
50	5 – 10 jours
60	1 – 2 jours
70	6 – 20 heures

**Bendahou et al. (2005).**

### III. Les propriétés du miel

#### III.1. Propriétés physico-chimiques

##### III.1.1. La Densité

La densité d'un miel homogène est le rapport, exprimé en nombre décimal, de la masse volumique de ce miel à la masse volumique de l'eau pure à 4 °C. (La masse volumique s'exprime en  $\text{kg/dm}^3$ ). La densité du miel varie approximativement de 1,39 à 1,44 à 20 °C (**Gonnet, 1982**). Le miel est donc un produit relativement dense. Les variations de la densité proviennent surtout des variations de la teneur en eau. Plus un miel est riche en eau et moins il est dense.

##### III.1.2. La Viscosité

La majorité des miels ont une viscosité normale, c'est-à-dire qu'ils suivent les lois de Newton sur l'écoulement des fluides (**Louveaux, 1985**). Selon **Huchet et al. (1996)**, La viscosité du miel dépend de trois facteurs qui sont, sa teneur en eau, sa composition chimique et de sa température.

La viscosité est très élevée à basse température. Elle décroît rapidement lorsque la température augmente (**Gonnet, 1982**). Pour 30 à 35°C, la viscosité est minimale, c'est d'ailleurs la température de la ruche. C'est pourquoi les apiculteurs sont contraints, au cours des opérations de centrifugation, d'extraction et de mise en pots, d'opérer à température suffisamment élevée (**Huchet et al., 1996**).

**Hooper (1980)** ajoute que cette viscosité est également accrue par la quantité de la matière colloïdale contenue dans le miel : les miels foncés ont une viscosité plus élevée que les miels clairs.

##### III.1.3. La Conductibilité thermique

La conductivité thermique est une mesure du transfert de chaleur. Elle est aussi désignée en tant qu'indice thermique. La conductivité du miel est relativement faible. Pour un miel liquide, elle s'élève à  $12 \cdot 10^{-4} \text{ cal/cm/s/}^\circ\text{C}$ , pour un miel cristallisé, elle est de  $12,9 \cdot 10^{-5} \text{ cal/cm/s/}^\circ\text{C}$  (**Bogdanov et al., 2004**).

Selon **Gonnet (1985)** le miel est mauvais conducteur de la chaleur, donc bon isolant thermique.

### III.1.4. La Conductibilité électrique

La conductivité électrique représente la capacité d'un corps à permettre le passage du courant électrique. Elle est exprimée en Siemens par centimètre (S/cm). Selon leur origine florale, les miels ont une conductivité variable. D'une manière générale, les miels de miellat conduisent beaucoup mieux le courant que les miels de fleurs (**Gonnet, 1982**).

**Donadieu (1984)** signale que le miel à une conductivité électrique dans de fortes proportions suivant sa teneur en eau et sa teneur en matières minérales.

### III.1.5. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction est une propriété optique qui caractérise toute substance transparente. Il est en fonction de la teneur en eau et de la température. L'indice de réfraction du miel est d'autant plus élevé que sa teneur en eau est plus basse (**Gonnet, 1982**).

### III.1.6. Le pH

Le pH d'un miel est en fonction de la quantité d'acide ionisable qu'il renferme (ions H<sup>+</sup>) ainsi que de sa composition minérale (ions OH<sup>-</sup>). Plus le taux de la matière minérale est élevé, plus le pH du miel se rapproche de la neutralité (**Gonnet, 1982**).

Selon **Donadieu (1984)** le miel est acide et son pH oscille en moyenne entre 3,5 et 5,5.

### III.1.7. La coloration

La coloration est une caractéristique physique importante des miels car elle est en rapport avec leur origine florale et avec leur composition (**Gonnet, 1982**).

La coloration des miels est due à la présence des substances encore mal identifiées, mais parmi lesquelles semble bien figurer le carotène. La couleur d'un miel étant un caractère très important sur le plan commercial (**Louveaux, 1985**).

### III.1.8. La turbidité

A moins d'avoir été filtrés d'une façon parfaite, les miels sont toujours plus ou moins troubles, même lorsqu'ils ont été très bien refondus. Cette turbidité est due aux particules en suspension : grains de pollen, poussière, levures, particules de cire et de propolis, colloïdes, protéines, etc.... (**Louveaux, 1985**).

### III.1.9. La solubilité

Selon **Donadieu (1984)** le miel est soluble dans l'eau et l'alcool dilué, mais insoluble dans l'alcool fort, l'éther, le chloroforme et le benzène.

### III.1.10. La Cristallisation

La cristallisation des miels est un phénomène très important car c'est de lui que dépend-en partie la qualité du miel (**Huchet et al., 1996**). 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 inférieure à 28 g/100 g ou dont le rapport glucose/eau est inférieure à 1,7 restent plus longtemps liquides.

### III.1.11. La fermentation

La fermentation du miel est parfois une cause de problèmes. Les principaux facteurs qui causent la fermentation sont:

- Une teneur en eau élevée (au-dessus de 20%);
- Une température élevée;
- Une quantité élevée de levure (>10/g).

Une cristallisation irrégulière du miel dans un récipient peut produire de petites poches d'eau, ce qui peut fermenter le miel (**Bradbear, 2010**).

## III.2. Propriétés organoleptiques

### III.2.1. La couleur

La couleur du miel va du jaune très pâle (presque blanc) au brun très foncé en passant par toutes les gammes de jaunes, d'oranges, de marrons et même parfois de verts. Si le nectar ou le miellat n'ont pas de pigments, les miels liquides seront incolores et les miels cristallisés seront blancs (exemple du miel de colza). Dans le cas contraire, la palette de couleur est très large. Les miels de lavande, de rhododendron, et de tilleul sont ivoires, les miels de tournesol et de pissenlit sont jaune intense, les miels de châtaigner, de bruyère, et de miellat sont bruns.

Comme mentionné le **tableau III**, on peut même retrouver des pigments verts dans certains miels de saule ou de sapin **Hoyet (2005)**.

**Tableau III:** Les différentes couleurs des miels en fonction de leur origine florale.

Origine florale	Couleur
Acacia, Oranger	Incolore
Lavande, Tilleul	Ivoire
Tournesol, Pissenlit	Jaune
Châtaignier, Bruyère, Jujubier	Brun
Saule, Sapin	Très foncée avec des reflets verts

Hoyet (2005)

### III.2.2. L'odeurs

Dans les différents miels, les odeurs 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 **(Mokeddem, 1997)**.

### III.2.3. Les goûts

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 en fin de bouche de tanin, de rance, de fumée... **(Mokeddem, 1997)**.

## III.3. Propriétés biologiques

Le miel possède plusieurs propriétés biologiques : nutritionnelles, antimicrobiennes, anti-oxydantes et thérapeutiques.

### III.3.1. Propriété nutritionnelle

Le miel étant composé de sucres simples, il est facilement assimilé 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 : 310kCal / 100g. Il est cependant moins calorique que le sucre (environ 405kCal/100g), ce qui en fait un aliment apprécié des diététiciens **(Gout, 2009)**.

Il a été prouvé que le miel favorise aussi l'assimilation du calcium et la rétention de magnésium **(Luquet, 2010)**.



### III.3.2. Propriété anti-bactérienne

Elle aurait deux origines : l'eau oxygénée produite par l'abeille et les divers composés chimiques issus de la source florale (**Cherpunoj, 1984**).

Elle peut être définie par quatre facteurs : (**Blanc, 2010**)

- **L'effet osmotique** : le miel est hypertonique, ceci grâce à l'action de sucres simples sur l'eau contenue dans les bactéries, et provoque la lyse de la membrane bactérienne, une inhibition de la croissance et la mort du micro-organisme.

- **Le pH** : le miel est acide, du à l'action du système gluconolactone/acide gluconique et est actif contre les germes tels que : *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus cereus*.

- **Le peroxyde d'hydrogène** : il est très actif contre les bactéries et provient du système glucose oxydase/catalase.

- **Les facteurs non peroxydiques** : comme certains acides ou composés volatils ainsi que des flavonoïdes et acides phénoliques transmis par la plante.

### III.3.3. Propriété anti oxydante

De nombreuses études ont démontré l'activité anti oxydante de miel qui essentiellement due à la présence de composés phénoliques (acide-phénols, flavonoïdes,...) (**Schramm et al., 2003**).

### III.3.4. Propriétés thérapeutiques du miel

Le miel a été testé et s'est montré efficace dans une multitude d'infections pour lesquelles les traitements conventionnels avaient échoué (**Rossant, 2011**).

Le miel est utilisé dans le traitement de plusieurs pathologies : broncho-pulmonaire (toux, bronchite, asthme), oro-pharyngiennes (maux de gorge), digestives (diarrhées, ulcère..) et cardio-vasculaire (hypertension, anémies), les plaies infectées, infections urinaires, des brûlures, d'escarres (**Hoyet, 2005**).

D'après certaines études, un miel riche en fructose peut même être consommé par des personnes diabétiques (**Chanaud, 2010**).

Le miel est doué d'un pouvoir bactériostatique important, de par sa haute teneur en sucres (plus de 95% de la matière sèche), sa faible teneur en eau libre (0,50 à 0,62%) et en humidité (14 à 20%), son acidité et la présence de

substances à activité antibactérienne (peroxyde d'hydrogène libre et inhibine) (Tomczak, 2010).

**Blanc (2010)** ajoute que le miel favorise l'assimilation du calcium et la rétention du magnésium ainsi que la digestion des aliments et reste beaucoup moins cariogène que le sucre classique.

Cependant, lors d'un chauffage prolongé, le miel perd ses propriétés (de moitié pour un chauffage à 80°C pendant 30 min, d'un quart pour un chauffage à 65°C pendant 5 minutes). Il est par conséquent préférable d'utiliser en thérapeutique un miel qui n'a pas été chauffé à plus de 40°C (**Gonnet et Lavie, 1960**) (Tableau IV).

**Tableau IV:** Propriétés thérapeutiques attribuées aux principaux miels unifloraux.

Origine botanique	Propriétés thérapeutiques	Origine botanique	Propriétés thérapeutiques
<b>Acacia</b>	-Régulateur Intestinal	<b>Sapin</b>	-Antianémique ; -Antiseptique et anti-inflammatoire des voies respiratoires ; -Diurétique.
<b>Bruyère</b>	-Antiseptique des voies urinaires et diurétiques ; -Antianémique ; -Dynamogénique des voies respiratoires et des voies urinaires.	<b>Lavande</b>	-Antiseptique et anti-inflammatoire des voies respiratoires ; -Antispasmodique ; -Sédatif nerveux.
<b>Eucalyptus</b>	-Antiseptique des voies respiratoires	<b>Thym</b>	-Antiseptique général.
<b>Oranger</b>	-Antispasmodique ; -Sédatif nerveux.	<b>Tilleul</b>	-Antispasmodique ; -Sédatif nerveux.

**Donadieu (1984)**

## IV. Production du miel

### IV.1. Dans le monde

La production mondiale est évaluée par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) à environ 1 200 000 tonnes. Entre 1997 et 2001, pendant que la production mondiale croissait de 9%, celle de la Chine augmentait deux fois plus (19 %). En 2001, la Chine était le premier producteur mondial de miel. Elle exporte près de 42 % de sa production (**Anonyme, 2003**).

Les principaux pays producteurs de miel dans le monde sont : la Chine, la Turquie, l'États-Unis d'Amérique, l'Ukraine et l'Argentine (**FAO, 2010**). La production mondiale du miel réalisée en 2010 est donnée dans le **Tableau V**.

**Tableau V:** Production de miel par pays, en 2010.

Position	Payes	Production « T »
01	Chine	398000
02	Turquie	81115
03	États-Unis d'Amérique	79788
04	Ukraine	70900
05	Argentine	59000
06	Mexique	55684

**FAO (2010)**

### IV.2. En Algérie

Les races apicoles algériennes connues à ce jour, sont: la Tellienne et la Saharienne.

Cependant, la Saharienne tend à disparaître, ceci étant dû au programme de lutte antiacridienne d'un côté, et d'autre part à la pollution génétique par la Tellienne engendré par des achats importants d'essaims du nord induit par le programme de développement de la production de miel au titre du Ministère de l'Agriculture.

Concernant les races exotiques, aucune introduction officielle n'a été effectuée. Cependant, il été observé dans certains élevages, l'existence d'individus croisés avec la race Italienne (**Anonyme, 2003**).

L'évolution de la production de miel est consignée dans le **tableau VI**. L'apiculture algérienne représente aujourd'hui 565,686 ruches pleines (**année**

2002) dont ruches modernes (464,982) et ruches traditionnelles (100,704). Les colonies mises à la production au nombre de 325,144, ont permis une production de 14,345 quintaux (**Anonyme, 2006**).

**Tableau VI:** Production de Miel en Algérie (QX) (**Anonyme, 2003**).

Année	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Production	18000	25000	11000	15000	11830	10540	16390	14345

Malgré cet essor, l'état était contraint de combler le déficit en miel, pour les besoins de la population, par les importations (en moyenne 700 tonnes en 1977 et 2220 tonnes en 2004). Si on associe la production nationale en miel et les importations, la consommation moyenne par habitant et par an varierait, en 1977, entre 85 g et 110 g et à 60g en 2004 (**Anonyme, 2006**).

## V. Technologie du miel

Depuis quelques dizaines d'années, la commercialisation du miel a cependant subi de profondes transformations. De plus en plus, la production du miel est appelée à passer par des circuits commerciaux complexes qui nécessitent la mise en œuvre de moyens modernes de conditionnement pour assurer une présentation agréable et la fourniture en quantités importantes de produits d'excellente qualité. L'obtention de très grosses quantités d'un produit homogène et irréprochable nécessite l'application d'une véritable technologie du miel, dont on peut situer la naissance vers 1929 avec les travaux de **Dyce** sur la cristallisation contrôlée, et qui constitue, à l'heure actuelle, un objet de recherches et de mises au point continues.

Les problèmes de technologie commencent à se poser dès la récolte du miel. Viennent ensuite la maturation, l'ajustement de la teneur en eau, la refonte, la pasteurisation, la cristallisation dirigée, le conditionnement et la conservation (**Louveaux, 1968**).

### V.1. La récolte du miel

La récolte du miel peut se pratiquer dès la fin de la miellée quand les cadres des hausses sont remplis de miel operculé.

### V.1.1. La récolte des hausses

Une ruche, exploitée de façon rationnelle, est divisée en deux parties: le corps et la hausse.

Le corps est la partie inférieure; il contient de hauts cadres dans lesquels les abeilles stockent du miel, et du pollen.

C'est aussi dans cette section de la ruche que se trouve le couvain. L'apiculteur se contente de surveiller le corps de ruche et ne prélève pas le miel qui y est entreposé; celui-ci servira à nourrir les jeunes larves et permettra à la colonie de passer la mauvaise saison (**Hoyet, 2005**).

La hausse constitue la partie supérieure de la ruche; elle est généralement séparée du corps par une grille qui empêche la reine de venir y pondre. L'apiculteur la place dès le printemps. Elle est composée de cadres (généralement moitié moins haut que ceux du corps) destinés à recevoir le surplus de miel.

A la fin de la miellée quand les cadres sont remplis de miel et operculés (**figure 9**), l'apiculteur ramasse les hausses des ruches et les ramène dans sa miellerie afin d'extraire le miel (**Hoyet, 2005**).



**Figure 9** : Cadre de miel operculé (**Lequet, 2010**).

### V.1.2. La désoperculation et l'extraction du miel

L'apiculteur retire, à l'aide d'une lève cadres, les cadres remplis de miel. Il doit désoperculer les alvéoles gorgées de miel à l'aide d'un couteau ou une herse (**Figure 10**).

Les cadres sont ensuite mis dans un extracteur, c'est une sorte de centrifugeuse manuelle ou automatisée, où ils vont tourner très rapidement. La force centrifuge fait alors sortir le miel des alvéoles. Projeté sur les parois, le miel coule au fond de l'appareil (**Luquet, 2010**).



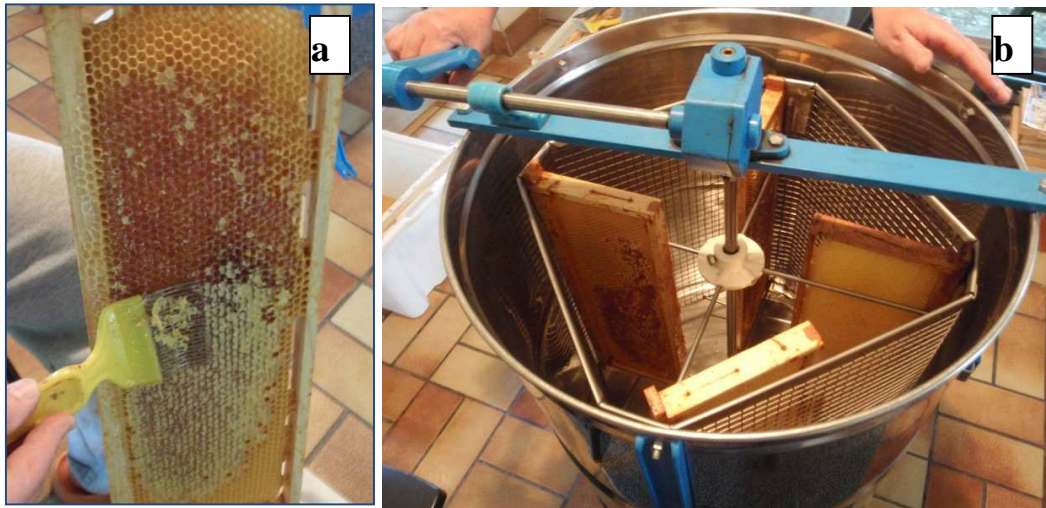


Figure 10 (a, b): La désoperculation et l'extraction du miel (Lequet, 2010).

### V.1.3. Filtration

Le miel est ensuite récupéré et transvasé dans le maturateur muni de filtres de diamètres décroissants (Figure 11). En effet, à la fin de l'extraction, le miel contient de nombreux débris et impuretés, en particulier de cire ou de pollen, qu'il est nécessaire d'éliminer (Hoyet, 2005).



Figure 11: La filtration (Lequet, 2010).

### IV.1.4. La maturation de miel

L'extraction centrifuge ne fournit pas directement un miel prêt à la mise en pots. Pour obtenir un miel commercialisable il est indispensable de l'épurer (Louveaux, 1985). Selon Prost (1987), la maturation signifie épuration, quand il s'agit du miel.

D'après **Louveaux (1985)**, la meilleure façon d'épurer le miel est encore de le laisser reposer pendant quelques jours dans un récipient appelé maturateur (**figure 12**), **Donadieu (1984)** signale que la maturation dure 2 à 8 jours.



**Figure 12:** Photographie d'un maturateur (**Hoyet, 2005**).

#### **V.1.5. Conditionnement de miel**

Du maturateur, le miel est coulé directement dans les récipients de vente. Le miel doit être mis à l'abri de l'air et de l'humidité ceci afin d'éviter certaine dénaturation et surtout des fermentations, d'où la nécessité de récipients bien remplis et hermétiquement fermés (**Donadieu, 1985**).

D'après **Huchet (1996)** le miel est gardé dans des locaux frais où la température ne dépasse pas 20°C. 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.

#### **V.1.6. Pasteurisation de miel**

La pasteurisation consiste à porter le miel à l'abri de l'air, à une température de l'ordre de 78°C pendant 6 à 7 minutes, puis le refroidir rapidement. L'appareillage comporte principalement des plaques chauffante parallèles entres lesquelles le miel va circuler en lames minces (**Prost, 1987**). Le miel pasteurisé est à l'abri des fermentations puisque les levures ont été détruites, et il se conservera à l'état liquide pendant au moins six mois, le temps nécessaire pour qu'il ait été consommé (**Louveaux, 1985**).

**Prost (1987)** mentionne que la pasteurisation peut augmenter très sensiblement la couleur et le taux de l'HMF, qu'il caractérise les miels chauffés et vieux.

### V.1.7. Emballage et étiquetage

Les récipients doivent être étanches à l'eau et à l'air pour éviter toute pénétration d'humidité dans le miel. Les récipients et cuves en fer blanc, en aluminium, en acier chromé et en plastique (qualité alimentaire) conviennent parfaitement à cet usage.

Pour les emballages de consommation, les pots en verre, mais aussi ceux en plastique (qualité alimentaire) et en fer blanc conviennent. Quant aux boîtes en paraffine, elles ne sont étanches ni à l'eau ni à l'air et sont en conséquence inutilisables pour le stockage du miel (**Lequet, 2010**).

D'après **Prost (1987)** le verre est le meilleur emballage pour le miel, mais son poids, sa fragilité et transparence rend visible les traînées blanche, causées par les bulles d'aire, dans le miel cristallisé lui font préférer le carton ou la matière plastique.

Légalement, l'étiquette doit fournir les indications suivantes:

- Le nom et l'adresse de l'apiculteur,
- L'appellation du miel ou une autre appellation légale,
- Le poids du miel contenu dans le récipient,
- Une date de garantie, à consommer de préférence avant fin mois/année (exemple, à consommer avant fin 04/2014), mais il ne s'agit pas d'une date de péremption, tout miel peut être consommé sans risque après cette date. Il est normal de s'en tenir à une durée de conservation maximale de 18 à 24 mois selon les miels, à condition de garantir au consommateur que le miel aura au moins jusqu' à cette date, conservé ses qualités et ses caractéristiques sensorielles (**Guerriat, 1996**).

## VI. Actions frauduleuses

La législation n'autorise aucun ajout d'autres éléments dans le miel, mais les fraudes existent. En effet le miel comme beaucoup d'autres produits n'échappent pas à ces pratiques qui déstabilisent les prix et la confiance des acheteurs (**Lequet, 2010**).



### VI.1. Fraudes par adultération

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**).

Trois principaux types de fraudes ont été mentionnés par **Antinelli et al. (2001)** et **Megherbi (2006)** :

- La fraude consistant à ajouter au miel du saccharose est peu courante car facilement détectable du fait de la faible teneur en ce sucre dans la plupart des miels.

- L'adjonction de saccharose inverti (glucose + fructose) chimiquement est possible mais entraîne la production d'une grande quantité d'HMF.

- L'ajout de sucre de canne, de sirop de sucre de canne ou de miel de sucre sont repérables, notamment par analyse microscopique.

### VI.2. Fraudes par non-conformité

La plupart du temps, il s'agit d'une fausse indication d'origine botanique, en général non intentionnelle. Les analyses polliniques, physico-chimiques et organoleptiques permettent de déceler facilement ces « fraudes » et de reclasser le produit dans la bonne catégorie.

On peut trouver également des miels d'années non-conformes (un miel de 2009 présenté comme un miel de 2010 par exemple). La fraude est décelable par analyse de la teneur en HMF, des activités enzymatiques (amylase et invertase) (**Lequet, 2010**).

### VI.3. Fraudes par contamination

Le miel peut être contaminé par l'environnement ou par l'apiculteur. Dans ces cas, on peut retrouver dans le miel :

- Des résidus de métaux lourds,
- Des résidus de pesticides, d'acaricides, de fongicides et d'antibiotiques,
- Des spores de *Clostridium botulinum* (**Lequet, 2010**).

**CHAPITRE III**  
**LES BIFIDOBACTERIES**

### I. Découverte et historique

Les espèces appartenant au genre de *Bifidobacterium* sont utilisées depuis peu dans la confection de laits fermentés, ont d'abord été décrites comme bactéries commensales de l'homme. Présentes au sein de différentes flores humaines (intestin, vagin, bouche), elles sont également isolées chez les animaux (**Leveau, 1993**). Dès leur découverte par Tissier à l'institut Pasteur de Paris en 1900, elles suscitèrent l'intérêt des médecins et des nutritionnistes qui leur attribuèrent un rôle protecteur vis-à-vis des gastroentérites (**Leveau, 1993**).

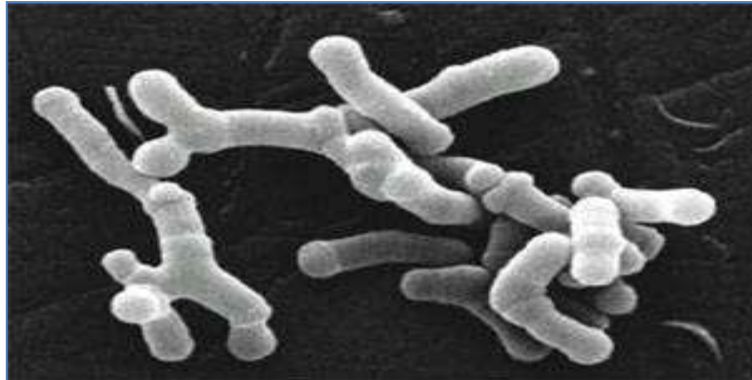
### II. Taxonomie

Pendant plus d'un demi-siècle, la taxonomie des bifidobactéries fut soumise à de nombreuses controverses. Les découvre en 1900 dans selles d'enfants .il donne à l'espèce type le nom de *Bacillus bifidus communis* ou *Bacillus bifidus* dès **1924 Orla-Jensen (1924)** décrit les bifidobactéries comme un taxon séparé et les élève au rang de genre. Cependant, il faut attendre la « VIII<sup>e</sup> édition du Bergey's manual of déterminative bacteriology » pour que cette notion soit universellement reconnue. Entre temps, l'espèce *Bacillus bifidus communis* de Tissier prend successivement les noms de *Bactéroïdes bifidus* puis de *Lactobacillus bifidus*. De nos jours, le genre *bifidobacterium* compte 24 espèces reconnues dont 9 d'origines humaines (**Leveau, 1993**). Une vingt-cinquième vient d'être décrite, *Bf. gallicum*. Le genre appartient à la famille des *Actinomycetaceae* (**Leveau, 1993**).

### III. Morphologie

Les bifidobactéries sont des bacilles à Gram positif, immobiles et non sporules. Leur nom vient des formes à deux branches en Y, V ou X qu'ils peuvent présenter sous certaines conditions de culture (**Leveau, 1993**) (**Figure 13**). Ainsi pour *Bf. bifidum* des quantités insuffisantes de facteur de croissance induisent la formation de bacilles de forme bifide. En fait, leurs morphologie est très variable : petite et régulière, longue avec une protubérance distale, incurvée etc. l'examen au microscope électronique de *Bifidobacterium bifidum* montre des cellules pléomorphiques, non seulement lorsque la souche est cultivé dans différents milieux, mais également dans une même population. Des structures intracellulaires semblables à des membranes enroulées en hélice ou en cercle se répartissent dans le cytoplasme des cellules et sont parfois assimilées à des

mésosomes. Mais elles ne sont pas systématiquement retrouvée chez toutes les souches de *bifidobacterium* (Leveau, 1993).



**Figure 13:** Le genre *Bifidobacterium* (Watterlot, 2010).

#### IV. Ecologie

Les bifidobactéries font partie de la flore prédominante de l'intestin chez les humains et les animaux à tous les stades de vie. La composition de la flore dominante chez l'humain change au cours des différents stades de vie. Chez un jeune enfant nourri au lait maternel, la flore intestinale est composée de 85-99 % de bifidobactéries et les principales espèces retrouvées sont *Bifidobacterium infantis* et *Bf. bifidum* (Baron, 1998).

Le lait maternel contient des facteurs, tels que des oligosaccharides comme le galactose, le fructose et le N-acetylglucosamine, qui stimulent la croissance des bifidobactéries (Bezkorovainy et Miller-Catchpole, 1989). L'absence de ces facteurs dans les préparations de laits pourrait expliquer la différence observée entre les flores des enfants nourris au lait maternel et ceux nourris au lait de vache (Tamime et al., 1995).

Les bifidobactéries ont été aussi trouvés dans les matières fécales des animaux tels que les lapins, les bovins, les souris ainsi que les insectes (tableau VII) (Matsukii et al., 1999).

**Tableau VII:** Les espèces de bifidobactéries et leurs origines.

Espèce	Origine
<i>Bf. adolescentis</i>	L'intestin de l'adulte
<i>Bf. bifidum</i>	Les excréments de l'enfant
<i>Bf. angulatum</i>	Les selles de l'Homme
<i>Bf. breve</i>	L'intestin de bébé
<i>Bf. dentium</i>	Carie dentaire
<i>Bf. lactis</i>	Yaourt
<i>Bf. animalis</i>	Les excréments des animaux
<i>Bf. pollurum</i>	Fèces de poulet
<i>Bf. cuniculi</i>	Fèces de lapin
<i>Bf. asteroides</i>	Hindgut d'abeille
<i>Bf. coryneforme</i>	Hindgut d'abeille
<i>Bf. indicum</i>	Hindgut d'abeille

Matsukii et al. (1999)

## V. Physiologie

### V.1. Croissance bactérienne

#### V.1.1. Sensibilité à l'oxygène

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies strictes. Mais la sensibilité à l'oxygène varie parmi les souches dans de grandes proportions. Les souches peu sensibles à l'oxygène pourraient disposer d'une faible activité catalasique détruisant les traces d' $H_2O_2$  formées. Une autre hypothèse explique l'absence de sensibilité par le fait que la NADH oxydase de ces souches ne forme pas de  $H_2O_2$  (Leveau, 1993).

Chez les moyennement sensibles à l'oxygène, on observe souvent une accumulation de  $H_2O_2$  qui bloque l'activité de la fructo-6-phosphate-phosphocetolase. Par contre, certaines extrêmement sensibles à l'oxygène n'accumulent pas d' $H_2O_2$ . L'oxygène réprimerait la prolifération microbienne par l'intermédiaire d'un potentiel d'oxydoréduction trop élevé (Leveau, 1993).

### V.1.2. pH/Température

La plupart des bifidobactéries d'origine humaine poussent à une température optimale de 36 à 38 °C. Alors que celles d'origine animale supportent des températures plus élevées (43-45°C). En dessous de 20°C, leur croissance n'est plus détectable, ainsi qu'à des pH inférieurs à 5,0 ou supérieurs à 8,0; l'optimum étant compris entre 6,6 et 7 (**Leveau, 1993**).

Le contenu en phosphore des lipides cellulaire de *Bf. bifidum* var. *pennsylvanicus* (souche Penn) est profondément influencé par la température d'incubation ; il en est de même pour les autres ions minéraux. Par exemple, les concentrations déterminées à 37 °C par rapport à celles trouvées à 29 °C sont inférieures pour le potassium alors qu'elles sont supérieures pour le sodium. Par contre, elle ne joue aucun rôle sur le contenu en galactose, en lipide ou sur la composition phospholipidique (**Leveau, 1993**).

## V.2. Les exigences nutritionnelles des bifidobactéries

### V.2.1. Besoins en acides aminés

Les bifidobactéries mises à part quelques espèces d'origine animale sont capables d'utiliser comme seule source d'azote les sels d'ammonium ; lorsqu'elles poussent en absence d'azote organiques elles sécrètent en générale de grandes quantités d'acides aminés tels que Thréonine, Alanine, Acide Aspartique, Valine (**Leveau, 1993**).

### V.2.2. Besoins en ions

Les besoins en ions sont surtout été étudiés *bifidobacterium bifidum*. Cette espèce requiert pour cultiver la présence de Fer, de magnésium et, à un moindre degré, de manganèse, le Fer peut être présent sous ses deux formes :

- Fer ferreux : le Fer ferreux est assimilé essentiellement à pH acide.
- Fer ferrique : *Bf. bifidum* ne l'incorpore qu'à pH neutre (**Leveau, 1993**).

### V.2.3. Besoins vitaminiques

Les besoins en vitamines des bifidobactéries ne dépendent pas de leur localisation écologique. Il n'y a pas d'exigence commune pour le genre et, même au sein des espèces humaines, les comportements sont très variables. Cependant, de nombreuses souches d'origine humaine sont capables de produire des vitamines qu'elles libèrent dans le milieu. Cette capacité est variable selon les

espèces. Distinguent ainsi trois groupes, sur la base de la production et la libération de : thiamine, acide nicotinique et acide folique. *Bf. bifidum* et *Bf. longum* et *Bf. infantis*, les accumulent en grande quantité alors que *Bf. breve* et *Bf. longum* sont de faibles producteurs. Parmi ces derniers, il existe des souches ne synthétisant aucune vitamine, comme c'est le cas pour *Bf. adolescentis* (Leveau, 1993).

### V.3. Métabolisme des sucres

#### V.3.1. Glucose

Les lactobacilles fermentent le glucose, soit par la voie d'Embden-Meyrhoff Paranas, soit par celle du shunt des hexoses monophosphates. Par contre, les bifidobactéries utilisent le glucose par le shunt du fructose-6-phosphate (fructose 6-p) (Leveau, 1993). C'est une voie tout à fait originale de dégradation des hexoses. Mais curieusement, l'enzyme clé, la fructo-6-phosphocetolase peut venir à manquer (Des Jardiny et al., 1990).

#### V.3.2. Galactose

*Bifidobacterium bifidum* exprime une activité galactokinase importante, quelle que soit la composition en sucre du milieu (glucose, galactose, lactose). La même galactokinase est produite en présence de glucose ou de galactose, elle est constitutive de la bactérie (Leveau, 1993).

## VI. Intérêts des Bifidobactéries

### VI.1. Intérêt prophylactiques et thérapeutiques

#### VI.1.1 Maintient à l'équilibre de la flore intestinale

Les bifidobactéries jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre de la flore intestinale, car l'administration de *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium longum* favorise l'installation de flore intestinale désirée et augmente le nombre des bifidobactéries (Yaechima, 1996).

La présence de bifidobactéries en grand nombre exclue la présence de micro-organismes intestinaux pathogène (Odile, 2009).

### VI.1.2. Prévention des infections entériques

Les bifidobactéries ont un rôle protecteur contre les infections entériques et la colonisation du tube digestif par les germes pathogène tels que : *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* et *Campylobacter* (**Gournier-Château, 1994**).

L'inhibition de la prolifération de ces germes s'exerce comme suit :

- La production d'acides acétiques lactique à partir du catabolisme des glucides de la ration alimentaire qui provoque l'abaissement du pH intestinal. L'inhibition peut se faire sous l'effet d'une substance antimicrobienne. (**Leveau, 1993**).
- Une bactériocine serait élaboré par *Bifidobacterium bifidum*, (bifidine) qui est thermorésistant (**Anand et al., 1985**).
- La compétition envers les sites d'adhésion sur les anthérocytes et pour les éléments nutritifs, qui ne seront plus disponibles pour les bactéries pathogènes (**Bernet et al., 1993**).

### VI.2. Effet hypocholestérolémiant

Les résultats de recherche sur les possibilités de contrôler par la micro flore intestinal, a étudié l'influence du *Bifidobacterium in vitro* sur le métabolisme du cholestérol des lymphocytes humaine, il a également administré ces bactéries à des rats recevant un régime hypocholestérolémique.

Et qui voit leurs taux de cholestérol diminuer, il a donc conclu que les bifidobactéries affectent l'activité de l'hydroxymethyl Réductase. (**Leveau, 1993**).

### VI.3. Effet anti-carcinogène

Des rapports de contrôle trouvent la consommation d'un lait fermenté avec les bifidobactéries réduit le risque de sein (**Vants Veer et al., 1989**).

### VI.4. Intérêt sur l'absorption minérale

Récemment, il était reporté que les bifidobactéries augmentent l'absorption des minéraux avec une combinaison qui est l'oligosaccharide.

### VI.5. Intérêt nutritionnels

Cette action qui n'est pas toujours spécifique des bifidobactéries est loin d'être négligeable .A nos jours nous connaissons :



- Une production de vitamines intéressantes telles que les vitamines B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> et acide folique (**Tamura, 1983**). Déjà en 1967 **Oyak** : avait montré que l'administration orale des bifidobactéries à des nourrissons de 1 à 2 mois, à raison de 10<sup>9</sup> cellules /jour, entraîne des concentrations sanguines et urinaires élevées en vitamines tel que la thiamine.
- Une production d'enzymes digestives tel que (caséine-phosphatase humaine) et lysozymes (**Tamura, 1983**).
- Une production d'acides aminés en quantités considérables .En effet *Bf. bifidum* peut produire jusqu'à 150mg/1 de milieu de culture, de thréonine. les autres acides aminés généralement sont l'alanine, valine et l'acide aspartique (**Odile, 2009**).
- Une production d'acide lactique de la forme L(+) :

Cette caractéristique du type fermentaire des bifidobactéries est à souligner car contrairement aux lactobacilles qui produisent de l'acide lactique de forme D(-) ou DI qui est très peu ou pas du tout métabolisée par le nourrisson alors que la forme (L+) est métabolisée complètement. Ceci entraîne une diminution des risques d'acides, de formation de méthémoglobines ou même de perturbation neurologique (**Romond, 1987**).

Il est également très important de noter qu'une des actions bienfaitantes des bifidobactéries est leurs capacités d'adhésion épithéliale. En effet, le biofilme de bactéries fixées sur les parois épithéliales, fait en sorte de maintenir efficace le mécanisme de production sur place de différents métabolites bactériens tels que l'acide organique, enzymes, vitamines, antibiotiques,.... Et il garantit en même temps, l'inoculation constante et abondante et de l'aliment de passage (**Odile, 2009**).

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# **Chapitre IV**

## **Matériel et méthodes**

Le présent travail a été réalisé durant la période allant du **03** février au **02** mai **2013**, au niveau des structures scientifiques suivantes:

- Laboratoire d'hygiène de référence de la wilaya de Blida.
- Laboratoire de bactériologie de l'EPH de **Boufarik**.
- Laboratoire Centrale de l'Institut Technique d'Elevage (ITELV) **Baba Ali**.

## I. Matériel

Le matériel utilisé dans notre étude est constitué par :

### I.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est représenté par : les abeilles, le miel, les souches bactériennes (souches testés), les bifidobactéries et le lait écrémé.

### I.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique représente l'appareillage, la verrerie, les milieux de cultures, et les réactifs (**annexe I**).

## II. Méthodes

### II.1. Echantillonnage

#### II.1.1. Le miel

Cinq échantillons de miel de l'année 2012 provenant de différentes régions mellifères du territoire national ont fait objet de cette présente étude.

Les miels sont classés selon leurs origines florales et leurs provenances (**Tableau VIII, Figure 14**).

**Tableau VIII:** Origine et dates de récolte des échantillons de miels étudiés.

N° d'Ech	Type de miel	Origine géographique	Date de récolte	Mode d'extraction	Poids
<b>01</b>	Agrumes	Bougara (Mitidja)	Mai 2012	Manuel	500g
<b>02</b>	Multi-fleurs	Bougara (Mitidja)	Mai 2012	Manuel	500g
<b>03</b>	Eucalyptus	Kolea (W. Tipaza)	Juillet 2012	Électrique	500g
<b>04</b>	Jujubier	Ain ouassara (W. Djelfa)	Juillet 2012	Électrique	500g
<b>05</b>	Montagne	Atlas Blideen	Juin 2012	Manuel	500g



**Figure 14:** Types de miels étudiés (Photographie originale).

### II.1.2. Les Souches microbiennes utilisées

Les souches utilisées dans l'étude de l'effet antimicrobien ont été fournis par le laboratoire de bactériologie de l'EPH de Boufarik.

Les souches sont :

#### ◆ Souches de références

- *Escherichia coli* ; ATCC 10536
- *Staphylococcus aureus* ; ATCC 6538
- *Staphylococcus epidermidis* ; ATCC 12228
- *Pseudomonas aeruginosa* ; ATCC 6811

#### ◆ Souches cliniques

Représenté par: *Bacillus* sp, *Enterococcus* sp, *Streptococcus* sp.

### II.1.3. Les abeilles (*Apis mellifera*)

Les abeilles (*Apis mellifera*) ont été sélectionné ou hasard au niveau d'un rucher privé situé à la commune de Bougara (W. Blida).

### II.1.4. Les bifidobactéries

Les bifidobactéries proviennent du tube digestif de l'abeille (*Apis mellifera*), après isolement et purification sur gélose Columbia.

### II.1.5. La poudre de lait

La poudre de lait utilisé est entreposée dans un hangar à température ambiante, protégée sur des palettes en bois pour éviter tout contact avec le sol et l'humidité.

Cette poudre est conditionnée dans des sacs en papiers polyéthylène de 25 kg doublés de sacs en papiers raft fermés hermétiquement.

Le prélèvement a été réalisé à partir d'un sac pris au hasard.

## II.2. Le plan expérimental

Nous avons adopté le protocole expérimental suivant :

- Analyses physico-chimiques des variétés de miels étudiées.
- Analyses microbiologiques des cinq (05) types de miels étudiées.
- L'étude de l'effet anti-microbien des cinq (05) types de miels.
- Isolement des bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille.
- Suivi du pouvoir acidifiant et de la croissance de *Bifidobacterium* sp dans le lait écrémé reconstitué et dans le lait écrémé additionné de miel.

## II.3. Analyses physico-chimiques

### II.3.1. Détermination du pH et de l'acidité libre (NFV05-108 de Juillet 1970)

Le pH et l'acidité libre ont été déterminés selon **Bogdanov et al. (2002)**.

Le pH a été déterminé par lecture directe par un pH-mètre de marque HANNA.

L'acidité libre a été déterminée par une titration avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH).

#### • Principe

Titration d'un mélange miel-eau avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1N, jusqu'à un pH de 8,30.

L'acidité libre est ainsi exprimée en milliéquivalents (meq) d'hydroxyde de sodium nécessaire pour neutraliser 1 kg de miel et ne doit pas dépasser 50 meq/kg selon le *Codex Alimentarius* (**Anonyme, 1981**).

#### • Mode opératoire

- Dissoudre 10g de l'échantillon de miel dans 75ml d'eau distillée, agiter la solution à l'aide d'un barreau magnétique.
- Etalonner le pH mètre avec deux solutions tampon (pH=4 et pH=7).
- Mesurer le pH de la préparation par une simple lecture directe de la valeur indiquée sur le pH-mètre.

- Titrer la préparation avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,1 N jusqu'à un pH de 8,30 (Ce point doit être obtenu dans un délai de 120 secondes du début de la titration).

- **Expression des résultats**

L'acidité libre est exprimée en milliéquivalents ou millimoles d'acide par kilogramme de miel :

$$\text{acidité libre} = V_1 \times 10$$

$V_1$  = : Volume de NaOH nécessaire pour avoir un pH de 8,30.

### II.3.2. Détermination de la teneur en eau

La technique la plus simple et la plus reproductible pour mesurer le taux d'humidité dans un miel est la réfractométrie selon **Bogdanov et al. (2002)**.

- **Principe**

Détermination de l'indice de réfraction du miel parfaitement liquéfié, la table de **CHATAWAY** indique la teneur en eau correspondante.

- **Mode opératoire**

Introduire dans un flacon quelques grammes de miel bien homogénéisé, fermer bien le flacon et le placer dans un bain Marie réglé à 50 ( $\pm 2$ ) °C pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre. Homogénéiser par agitation et laisser refroidir.

A l'aide d'une baguette en verre déposer rapidement une goutte de miel sur le prisme du réfractomètre Abbe, fermer l'appareil, lire l'indice de réfraction, et noter la température du prisme. Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20°C.

Si la température est au-dessus de 20°C : ajouter 0,00023 pour 1°C

Si la température est au-dessous de 20°C : soustraire 0,00023 pour 1°C

Lire la teneur en eau correspondante à partir de la table en **Annexe I**, bien nettoyer le prisme après usage.

$$\text{Matière sèche (MS)(100\%)} = 100 - \text{teneur en eau}$$

### II.3.3. Détermination de la conductivité électrique

La conductivité électrique a été déterminée selon **Bogdanov et al. (2002)**.

Utilisée en routine lors d'un contrôle de miel, la mesure de la conductivité électrique est un bon critère pour déterminer l'origine botanique d'un miel, et détecter si les abeilles ont été artificiellement nourries au sucre (**Sancho et al., 1991**).

- **Principe**

Il s'agit de la mesure de la résistance électrique d'un mélange à 20 % de miel et à 20°C.

- **Mode opératoire**

Pour la mesure de la conductivité électrique, il suffit de:

- Dissoudre 20 g de miel dans quelques millilitres d'eau distillée.
- Puis compléter jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.
- Plonger la pointe de l'électrode du conductimètre électrique de marque : (CORNING pH/ conductivitymeter 442) dans la solution à analyser.
- Lire directement sur l'écran la valeur de la conductivité électrique.

### II.3.4. Détermination de la couleur

- **But**

C'est pour déterminer la différence de couleur existe entre les différents types de miel.

- **Principe**

Lovibond c'est un petit appareil compact, construit en étalonné aux normes de *Pfund color grader*, il a été mis en point par la société Lovibond spécialisée dans la mesure de couleur des produits alimentaires.

- **Mode opératoire**

Le miel convenablement liquéfié, est coulé dans la cuve en verre. On fait défiler dans l'appareil la gamme colorée du disque choisi à côté de la cuve à échantillon. Avec chaque appareil sont livrés deux disques chromatiques ; l'un pour les miels clairs (honey A) ; l'autre pour les miels foncés (honey B). Chaque disque comporte 9 pastilles de verre coloré, d'intensité croissante, et étalonnées sur les références de Pfund.



Pour l'observation, le boîtier peut être tenu en main et dirigé vers une lumière naturelle (soleil). Quand la couleur observée au niveau de deux compartiments est intense, on note le numéro de la pastille correspondante.

- **Expression des résultats**

Les résultats sont traduits en l'indice de Pfund (**annexe I**).

### II.3.5. Détermination de la densité (AFNOR NET 75-111)

- **Principe**

La densité relative d'un corps est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique d'un corps pris comme référence à une température de 20°C. Le corps de référence est l'eau distillée pour les liquides et les solides.

- **Mode opératoire**

On pèse 5 ml d'eau distillée et on note le poids, également pour l'échantillon à analyser dont on note le poids aussi.

- **Expression des résultats**

La densité est exprimée par la relation:

$$D = \frac{M}{M'}$$

Où:

**M** : Masse volumique du miel;

**M'** : Masse de même volume d'eau distillée.

### II.3.6. Détermination de L'absorbance

La mesure de l'absorbance a été faite selon la méthode de la **FAO (1969)**. Peser 5g de miel et dissoudre dans 100 ml d'eau distillée pour une solution de 5% de concentration. La mesure de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 575 nm après avoir étalonner l'appareil avec de l'eau distillée.

### II.3.7. Détermination de la teneur en Hydroxymethyl furfural (HMF)

L'analyse a été effectuée selon la méthode de **White (1979)**.

- **Principe**

Le principe est basé sur la lecture de l'absorbance de l'HMF à une longueur d'onde de 284 nm puis à 336 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type CECIL.

- **Réactifs utilisés**

- Solution Carrez I: Dissoudre 15 g de potassium Hexacyanoferrate II dans 100ml d'eau distillée.
- Solution Carrez II: Dissoudre 30 g d'acétate de zinc dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution de bisulfite de sodium : à 0,2%.

- **Mode opératoire**

Peser 5 g de l'échantillon de miel dans un Becher de 50 ml, dissoudre dans 25 ml d'eau distillée puis ajouter 0,5 ml de la solution Carrez I, bien mélanger, ajouter 0,5 ml de la solution Carrez II, mélanger puis compléter avec l'eau distillée jusqu'à 50 ml. Filtrer à travers d'un papier filtre, jeter les premiers 10 ml du filtrat (contact avec le filtre), puis récupérer le reste.

Pipeter 5 ml de cette solution dans 2 tubes à essai, ajouter 5 ml d'eau distillée dans les 2 tubes, puis ajouter 5ml de la solution de bisulfite de sodium à 0,2 % (détruit toute la quantité d'HMF présente dans l'échantillon) dans le second tube (blanc), mélanger bien.

Lire l'absorbance de la solution et le blanc à 284 et 336 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Visible, ne pas dépasser une heure. Si l'absorbance à 284 nm dépasse 0,6 il faut faire des dilutions.

- **Expression des résultats**

La teneur en HMF est exprimée en milligramme par kilogramme de miel :

$$\text{HMF} = (A_{284} - A_{336}) \times 149,7$$

Où:

$A_{284}$  = Absorbance à 284 nm.

$A_{336}$  = Absorbance à 336 nm.

$$149,7 = \frac{126 \times 1000 \times 1000}{16830 \times 10 \times 5} = \text{Constant.}$$

126 : Poids moléculaire de l'HMF.

1000 : Conversion du g au mg.

1000 : Conversion du g au Kg.

16830 : Absorbance molaire de l'HMF à  $\lambda = 284$  nm.

10 : Conversion du 5 à 50 ml.

5 : Prise d'essai.

### II.3.8. Détermination de la teneur en cendres (AFNOR NFV 03-760)

- **But**

La détermination de la teneur en matières minérales a pour but de calculé le pourcentage des cendre.

- **Principe**

La teneur en matières minérales est déterminée par l'incinération de l'échantillon dans un creuset en platine dans un four à moufle.

- **Mode opératoire**

-Incinérer le creuset vide, puis refroidi-le.

-Peser le creuset vide puis avec la prise d'essai.

-Après carbonisation avec précaution sur un bec bunsen, les résidus charbonneux sont incinérés complètement à une température ne dépassant pas 600°C, dans un four à moufle.

-Refroidir le creuset puis peser-le.

- **Expression des résultats**

La teneur en matières minérales « cendres » est exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$Cd\% = \frac{M_1 - M_2}{p} \cdot 100$$

Où :

**Cd%** = Le pourcentage de la matière minérale.

**M<sub>1</sub>** = Poids du creuset avec les cendres en g.

**M<sub>2</sub>** = Poids du creuset vide en g.

**P** = Prise d'essai en g.

## II.4. Analyses microbiologiques

L'analyse microbiologique comportera la recherche et le dénombrement des microorganismes contaminant le miel tels que : les coliformes totaux et fécaux, les *Clostridium* Sulfitoréducteurs, les germes aérobies mésophiles totaux, les levures et les moisissures.

### II.4.1. Préparation des suspensions mères et des dilutions décimales (J.O.R.A, 2004)

#### a. Solution mère

Introduire aseptiquement 25g de miel à analyser 'chaque type séparément' dans un flacon stérile contenant au préalable 225ml de diluant (TSE), homogénéiser pendant 6 à 8 minutes pour obtenir la dilution mère correspondant à la dilution  $10^{-1}$  (1/10).

#### b. Dilutions décimales

Introduire aseptiquement 1ml de la solution mère dans un tube a vis stérile contenant au préalable 9ml de diluant (TSE), on obtient la dilution  $10^{-2}$  (1/100). Mélanger soigneusement et doucement.

Prélever ensuite aseptiquement 1ml de la dilution  $10^{-2}$  et l'introduire dans un autre tube stérile contenant 9ml du même diluant (TSE), qui donnera la dilution de  $10^{-3}$  (1/1000) (**Figure 15**).

Les dilutions décimales sont réalisées en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume pour faciliter l'examen microbiologique (**J.O.R.A, 2004**).

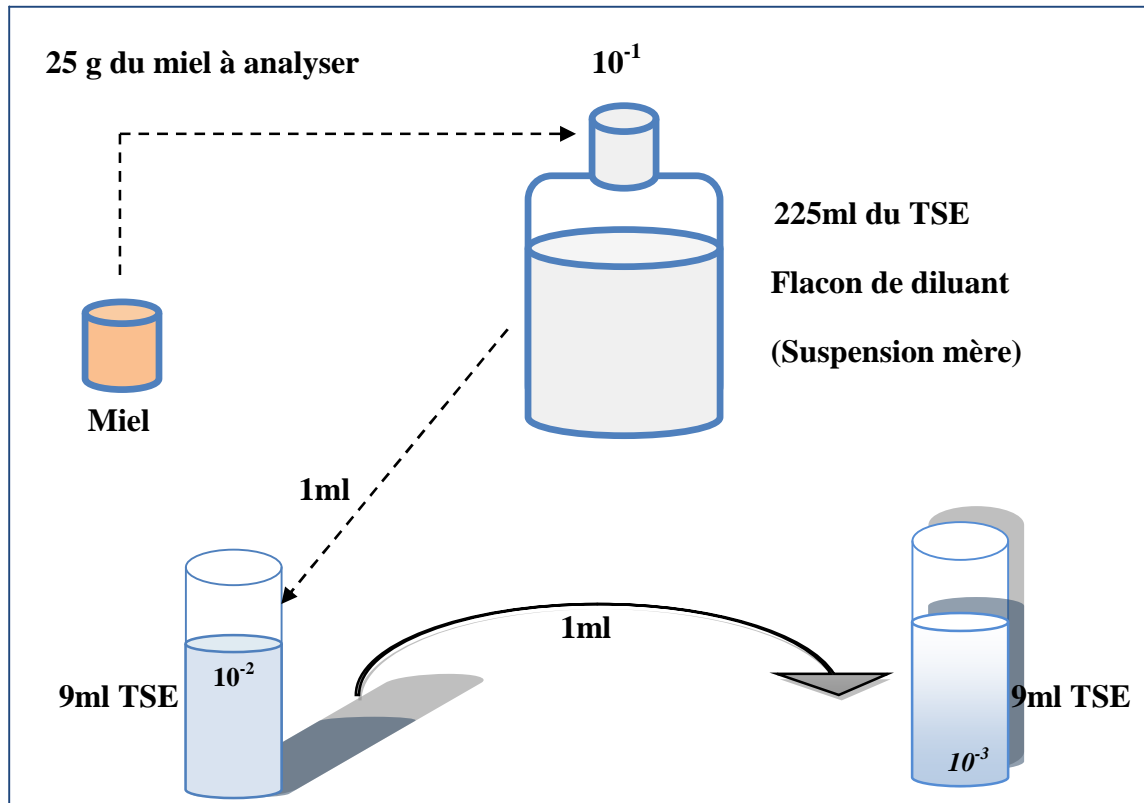


Figure 15: Réalisation des dilutions décimales.

#### II.4.2. Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT) (AFNOR, NF 08-051, 1991)

Les germes aérobies mésophiles totaux sont des micro-organismes capables de se multiplier en aérobiose, à des températures optimales de croissances comprises entre 20°C et 40°C (Leyral et *al.*, 2001).

##### ✓ Technique

A partir des dilutions décimales allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-3</sup> porter aseptiquement 1ml dans deux boîtes de Pétri vides, compléter en suite avec environ 15ml de Gélose « PCA » fondue puis refroidie à 45°C, faire ensuite des mouvements circulaires et de va et vient en forme de « 8 » pour permettre l'inoculum de se mélanger à la Gélose. Les boîtes sont mises à la température ambiante pour solidification (annexe I).

##### ✓ Incubation

Les boîtes seront incubées, couvercle en bas à 30°C pendant 72h.

**✓ Lecture**

La lecture se fait par comptage des colonies lenticulaires, jaunes ou blanchâtres en masse compris entre 30 et 300. On multiplie le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution. Les résultats finals sont exprimés en gramme de produit analysé (miel).

**II.4.3. Recherche et dénombrement des coliformes (NF V 08-050).****✓ Principe**

Cette méthode est basée sur le fait qu'une cellule, placée sur un milieu solide favorable : gélose VRBL donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible.

**✓ Mode opératoire****Ensemencement et incubation**

-A partir des dilutions décimales allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$ , porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans des boîtes de Pétri vides préparées à cet usage et numérotées.

- Couler ensuite chaque boîte avec la gélose VRBL, fondue puis refroidie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ .

- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose utilisée.

Une série de boîtes sera incubée à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes totaux.

L'autre série sera incubée à  $44^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes fécaux.

- Que se soit à  $37$  ou à  $44^\circ\text{C}$ , les premières lectures se feront au bout de 24 h et consistent à repérer les petites colonies rouges ayant poussé en masse mais fluorescentes, ce qui signifie que la lecture doit se faire dans une chambre noire et sous une lampe à UV. Les autres colonies non fluorescentes ne sont ni des coliformes totaux ni des coliformes fécaux (**annexe I**).

**Lecture et dénombrement**

- Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs de dilutions, de plus :

- Les colonies apparaissent rouges à violettes de 0,5 à 1mm de diamètre entourées d'un halo de précipité des sels biliaires.

- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies.

- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution.
- Il est impossible de trouver plus de coliformes fécaux que de coliformes totaux.

#### II.4.4. Recherche des levures et moisissures (NF V 08-059)

La présence de cette flore rend le produit impropre à la consommation, elle peut être essaimée grâce au courant d'air pollué.

##### ✓ Mode opératoire

- Couler dans les boîtes de Pétri 20 ml de la gélose OGA, (utiliser la technique d'ensemencement par étalement).
- Placer 4 gouttes de chaque dilution  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  à la surface du milieu solide OGA (3 boîtes par dilution).
- Etaler l'inoculum à la surface du milieu de culture, utiliser un râteau en verre stérile.
- Incuber à une température ambiante (22°C) durant 5 jours, en position renversée (**annexe I**).

##### ✓ Lecture et expression des résultats

La lecture et le dénombrement des levures et moisissures se fait quotidiennement et séparément car les moisissures se développent rapidement et peuvent envahir les colonies des levures.

Les colonies des levures sont brillantes, rondes et bombées, de couleur blanche avec une texture crémeuse, tandis que celles des moisissures sont épaisses, filamenteuses, pigmentées à aspect velouté.

En tenant compte de facteur de dilution il faut multiplier le nombre trouvé par l'inverse de la dilution correspondante, faire ensuite la moyenne arithmétique, puis exprimer le résultat final en g de produit à l'analyse (**Lebres, 2004**).

#### II.4.5. Dénombrement des spores d'anaérobies sulfitoréducteurs (AFNOR NF 08-061).

##### ❖ Principe

La méthodologie proposée permet la destruction des formes végétatives et le seul dénombrement des spores ayant résisté au traitement thermique. Les microorganismes anaérobies sulfitoréducteurs sporulent et sont capables de se développer en condition d'anaérobiose et de manifester des propriétés

sulfitoréductrices. Le milieu viande foie (VF) contient de l'amidon qui favorise la germination des spores, du sulfite qui est réduit en sulfure qui précipite avec les ions ferriques en formant un précipité noir. Outre la thermorésistance des spores, la sélection est basée sur la culture en anaérobiose stricte (**Guiraud, 1998**).

#### ❖ Mode opératoire

##### ▪ Préparation du milieu :

- Faire fondre un flacon de la gélose viande foie (VF) puis le refroidir à 45°C.
- Ajouter une ampoule d'alun de fer et une ampoule de sulfite de sodium.
- Mélanger soigneusement et aseptiquement.
- Maintenir le milieu dans une étuve ou au bain-marie à 45°C jusqu'au moment de l'utilisation.

##### ▪ Ensemencement et incubation :

- Porter aseptiquement 2 ml de chaque dilution ( $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ) en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre.
- Les tubes contenant les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  seront soumis, d'abord à un chauffage à 80°C pendant 8 à 10 minutes, puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet, dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.
- Puis ajouter environ 15 ml de gélose Viande Foie prête à l'emploi, dans chaque tube.
- Laisser solidifier sur paille pendant 30 minutes.
- Ces tubes seront ainsi incubés à 37°C pendant 16, 24 ou au plus tard 48 heures.

#### ❖ Lecture

La première lecture doit se faire impérativement à 16 heures car :

- D'une part les colonies de *Clostridium* Sulfitoréducteurs sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant alors l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse est à refaire.
- D'autre part, il faut absolument repérer toute colonie noire ayant poussée en masse et d'un diamètre supérieur à 0,5 mm.

Dans le cas où il n'y a pas de colonie caractéristique ré-incuber les tubes et effectuer une deuxième lecture au bout de 24 heures voir 48 heures.



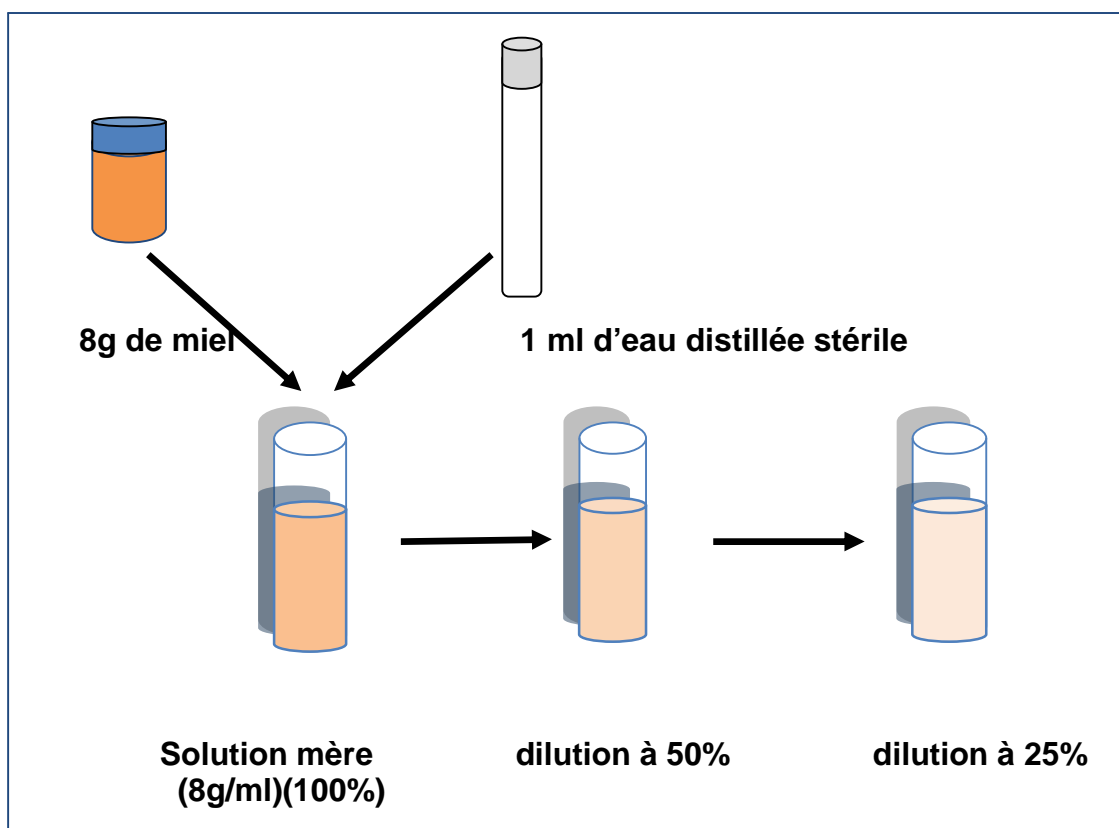
## II.5. Mise en évidence l'effet antimicrobien du miel

La technique de diffusion sur gélose a été utilisée pour l'étude du pouvoir antimicrobien des différents types de miels dans le but de déterminer la sensibilité ou non des différentes souches vis-à-vis du miel.

### II.5.1. Préparation des dilutions

Pour entamer l'étude de l'effet antimicrobien du miel, nous avons préparé plusieurs dilutions pour chaque variété du miel.

Les dilutions sont préparées à partir d'une solution mère dont la concentration est de 8g/ml (100%) et les dilutions sont 50%, 25% (**Figure 16**).



**Figure 16:** Préparation des différentes dilutions à partir de la solution mère du miel.

### II.5.2. Préparation des suspensions microbiennes

Avec des cultures jeunes de 18 à 24 heures que nous avons déjà préparés par ensemencement des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive pour les souches suivantes chacune séparément : *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, mais pour *Streptococcus* sp et *Enterococcus* sp l'ensemencement se fait sur gélose sang frais.

On prépare des suspensions des souches précédentes (chaque souche séparément) ;

- A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, on racle à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, 2 à 3 boucles de culture bien isolées et parfaitement identiques.
- On décharge l'anse ou la pipette pasteur dans 9 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne à l'aide d'un agitateur vortex (**Figure 17**), la densité lue à l'aide d'un densimètre (**Figure 18**) doit être équivalent à 0,5Mf (Mcfarland).



Figure 17: Un agitateur Vortex.



Figure 18: Un densitomètre.

### II.5.3. Méthode de diffusion sur gélose

#### ✓ But

Le but de cette méthode est l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

#### ✓ Principe

C'est une méthode qualitative qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque contenant la substance à tester (miel).

**✓ Mode opératoire****Ensemencement des boîtes de gélose**

On prend une boîte de Pétri stérile coulée précédemment par GMH (Gélose Muller Hinton) et incubée à 35°C pendant 24h pour garantir que ces boîtes ne sont pas contaminées et on l'ensemence par un écouvillon trempé dans la suspension d'*Escherichia coli*, de façon à couvrir toute la surface.

Les autres souches sont traitées de la même façon, sauf que *Streptococcus* sp et *Enterococcus* sp seront cultivés sur gélose Muller Hinton plus sang frais.

**Application des disques**

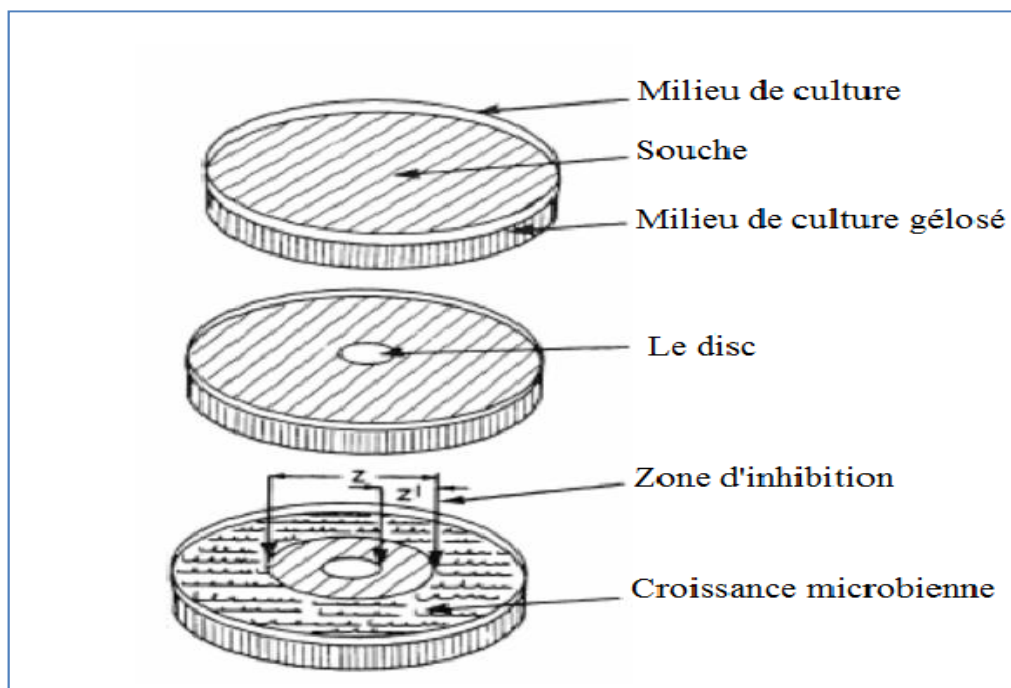
Les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman (ou autre type de papier buvard), avec un diamètre de 6 mm, ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'étuve.

- Une fois les géloses Muller Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de la solution mère de miel à 8 g/ml (100%) et les dilutions 50 et 25% (pour les cinq variétés de miel) sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen.

- On porte les boîtes à l'incubation à 37°C pendant 18h à 24h.

**✓ Lecture**

La lecture se fait à l'œil nue après le temps d'incubation par observation de l'existence de formation d'une zone franche d'inhibition et on mesure le diamètre des zones d'inhibition en millimètre (**Figure 19**).



**Figure 19:** Technique de diffusion sur gélose.

La mesure de diamètre des zones d'inhibition 'Z' est réalisé à l'aide d'un pied à coulisse, se qui nous permet d'estimer la sensibilité ou la résistance des différents germes testés aux miels.

En fonction du diamètre de destruction des germes, les différentes bactéries testées ont été classées :

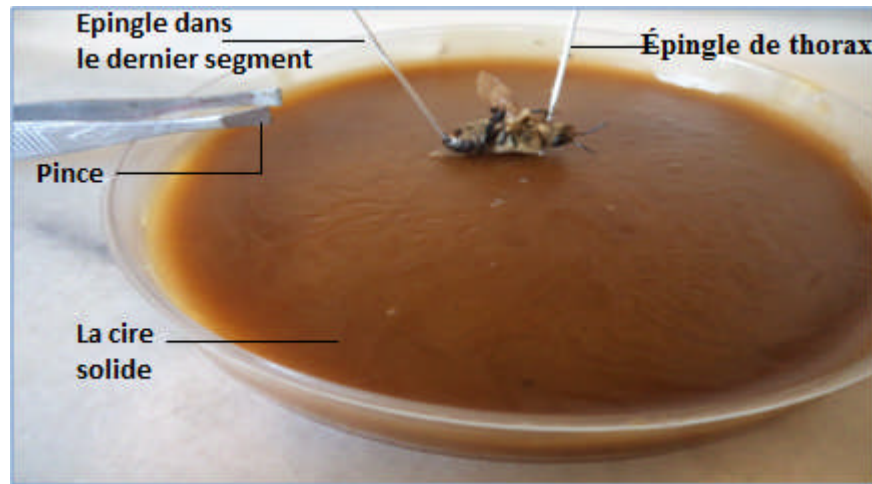
- Extrêmement sensibles si la zone d'inhibition est supérieure à 20 mm.
- Sensibles si la zone d'inhibition est comprise entre 12 et 19 mm.
- Modérément sensibles si la zone d'inhibition est comprise entre 7 et 11 mm.
- Résistantes si la zone d'inhibition est inférieur à 7 mm (**Rossant, 2011**).

## II.6. Isolement de bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille

- ✓ **La dissection de l'abeille (Selon la méthode de Daouar et Mekkrai, 2010).**

La dissection de l'abeille a été effectuée sous une loupe binoculaire. L'abeille ouvrière est fixée à l'aide d'aiguilles dans une boîte de pétri de 9 cm de diamètre contenant la cire solidifiée (**figure 20**).

Après la fixation on pratique une incision de chaque côté de l'abdomen par un ciseau pointu, et à l'aide de pince on enlève les huit segments abdominaux. Il apparaît une masse jaunâtre de l'intestin, le ventricule et le rectum.



**Figure 20:** La fixation de l'abeille (**Photographie originale**).

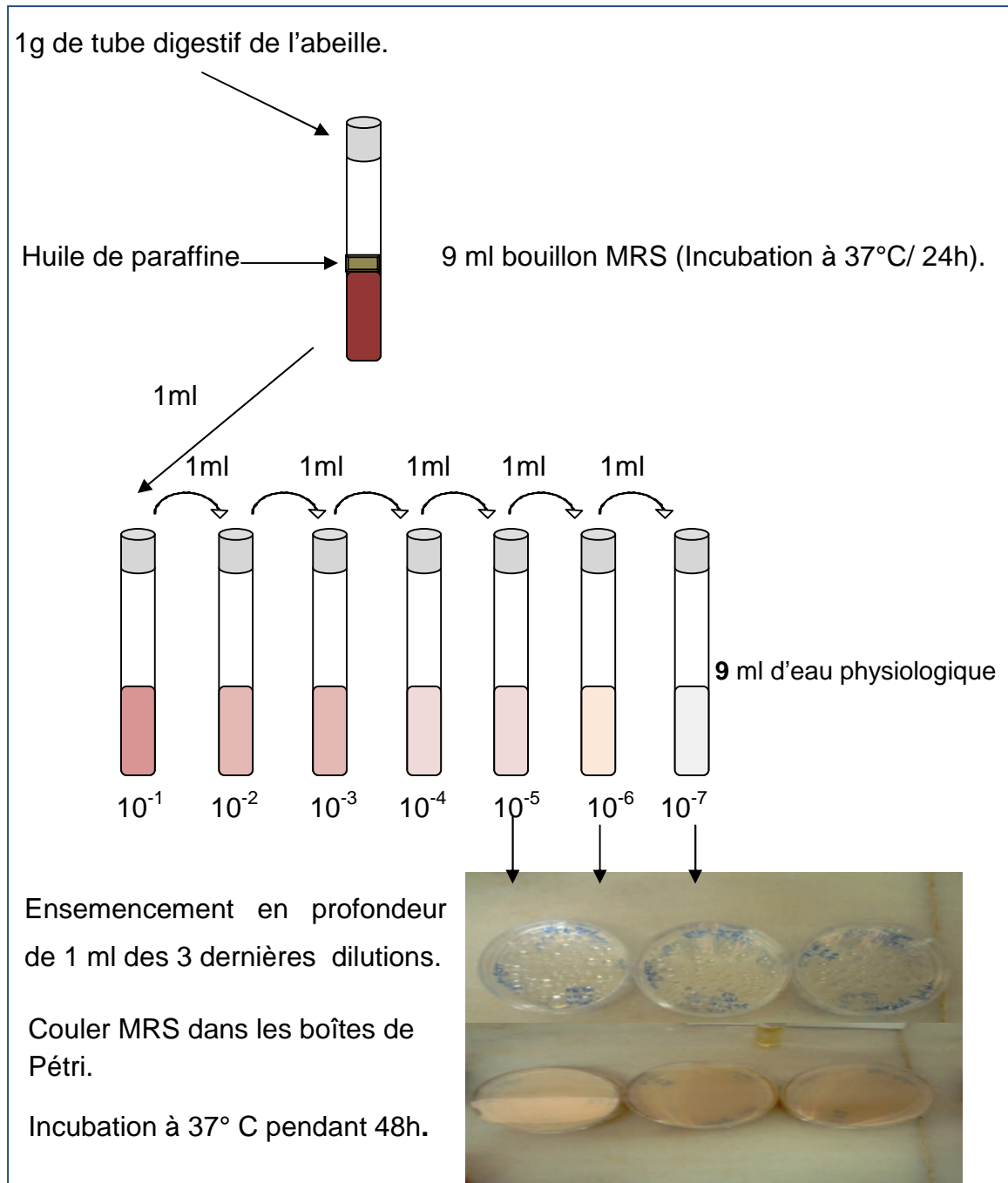
✓ **Mode opératoire**

Une fois la dissection de l'abeille est effectuée, 1g de tube digestif est prélevé stérilement est mélangé avec 9 ml de bouillon d'enrichissement MRS (Man Rogosa et Sharp). Le mélange qui est appelé solution mère est ensuite incubé en anaérobiose pendant 18 – 24 h à 37° C.

Après l'enrichissement on prépare 7 dilutions dans 7 tubes différents de façon à prendre 1 ml de la solution pré-enrichie et ainsi de suite. Chaque tube contient préalablement 9 ml d'eau physiologique. On obtient donc 7 tubes  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  de dilutions.

On prélève 1 ml, à l'aide de pipettes, de chaque tube des trois derniers dilutions :  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et on les ensemence aseptiquement dans 3 boîtes de Pétri stériles (ensemencement en profondeur), (**Figure 20**).

On chauffe la gélose Columbia dans un autoclave afin qu'elle devienne liquide à couler dans les boîtes de Pétri (gélose en surfusion à 50°C). On effectue un mouvement de « 8 » pour homogénéiser le milieu et l'inoculum. Une fois la gélose se solidifie on les incubent à l'étuve à 37°C pendant 48h.



**Figure 21:** Protocole d'isolement des bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille.

### II.6.1. Contrôle de pureté de la souche bifidobactéries

Les colonies sont sélectionnées selon leur aspect morphologique (observées grâce à une loupe binoculaire) ainsi que sur la base de leur mobilité, de leur forme, leur état frais, test de catalase et de la coloration de Gram. Les colonies des bifidobactéries sont repiquées sur le bouillon MRS. Puis les tubes sont incubés en anaérobiose (en ajoutant de l'huile de paraffine stérile à la surface du tube) pendant 24 h à 37°C. Ensuite les souches seront repiquées sur gélose

Columbia à pH 6,4. La purification est effectuée par quatre repiquages successifs d'étalement en milieu Columbia solide.

## II.6.2. Identification biochimique de la souche bifide

### a. Test de catalase

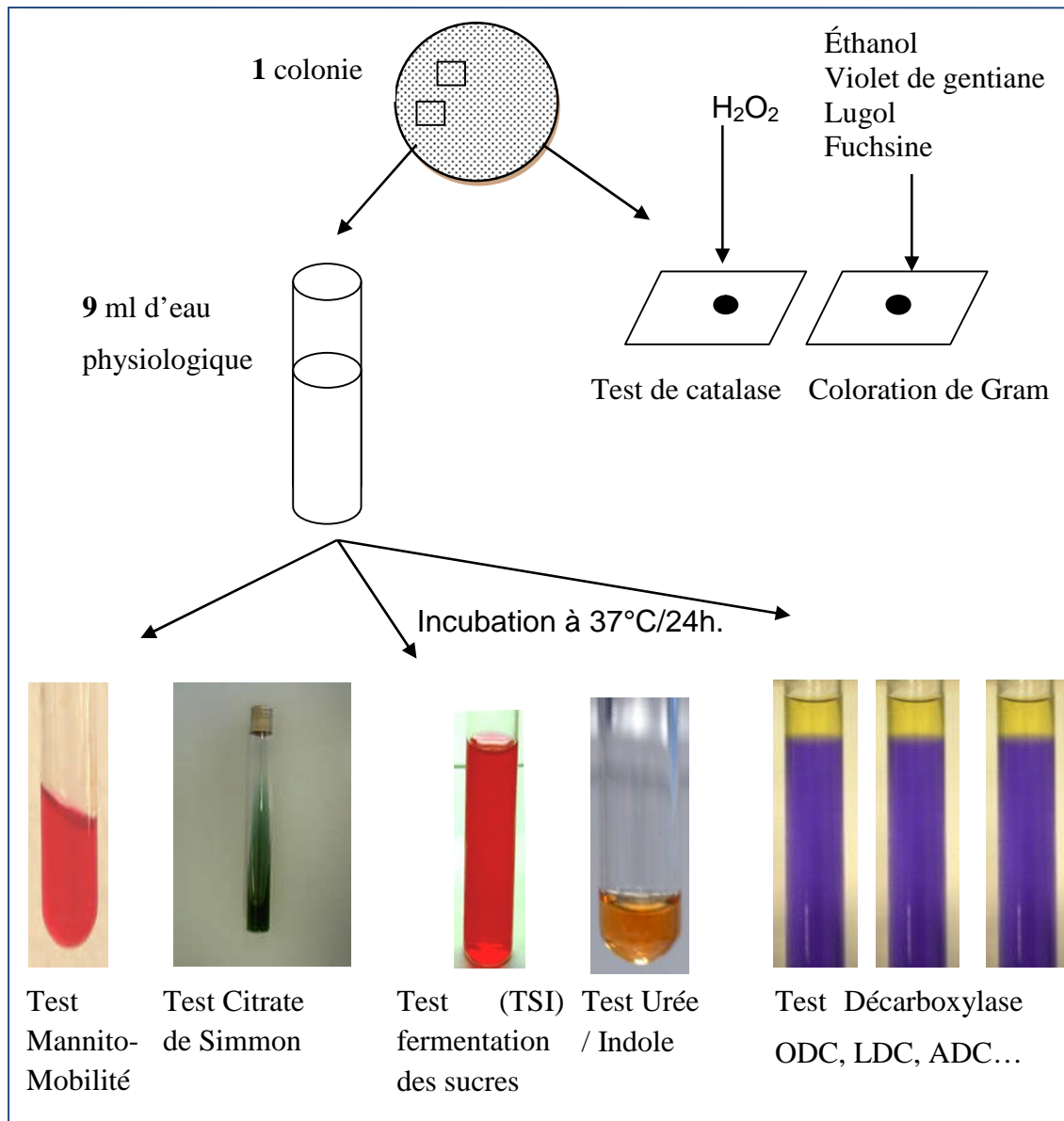
Une colonie d'une culture de moins de 24 heures de chaque isolat a été déposée *via* une anse sur une lame, une goutte de peroxyde d'hydrogène a ensuite été ajoutée. La présence de catalase se traduit par l'apparition d'une effervescence. Les isolats ne possédant pas de catalase sont incapables de dégrader le peroxyde d'hydrogène; ils sont catalase négatifs caractéristique des bifidobactéries.

### b. Coloration de Gram

Ce test a été réalisé sur des cultures jeunes de moins de 24 heures. Un frottis de cellules a été réalisé sur une lame. Des solutions de cristal violet et de lugol ont été respectivement appliquées sur le frottis pendant 1 min, suivi d'un lavage à l'eau. De l'éthanol à 90% a été appliqué sur le frottis, qui ensuite a été traité avec de la fuschine pendant 30 secondes. Le frottis a été observé au microscope photonique sous immersion au grossissement 100 X. Les isolats ayant une coloration violette sont Gram positif (+) tandis que ceux présentant une coloration rose sont Gram-négatifs (-).

La figure 21 résume les différentes étapes d'une galerie classique basées sur des critères biochimiques ;

- Test Décarboxylase ODC, LDC, ADC...
- Test Urée / Indole
- Test (TSI) fermentation des sucres
- Test Citrate de Simmon
- Test Mannito- Mobilité



**Figure 22:** Protocole d'identification de *Bifidobacterium* sp.

### II.6.3. Conservation de la souche bifide

Une seule colonie est récupéré et ensemencée sur milieu Columbia, 48 heures plus tard, après vérification de l'appartenance au genre *Bifidobacterium* par coloration de Gram et teste de catalase, on prend à nouveau une colonie et on l'ensemence dans un tube de 9ml de bouillon MRS, après 24 heure d'incubation ce tube sera congelé et conservé au réfrigérateur à - 18°C.



## II.7. Suivi de l'acidification et de la croissance de *Bifidobacterium sp* dans le lait écrémé reconstitué et dans le lait additionné de miel

Les essais ont été effectués sur un lait écrémé de 0% de matière grasse.

Nous avons préparé, une série de tubes chaque tube contient 9 ml de lait écrémé reconstitué, et d'autre série dont les tubes contient 9ml de lait écrémé reconstitué additionné de 10% de miel (mélange de 5 variétés étudiées).

Une pasteurisation à 110°C pendant 10mn est réalisée dont le but d'éliminer tous les germes pathogènes et indésirables, après refroidissement à 45°C nous avonsensemencé les deux séries de tubes avec 1ml de la culture pré-enrichi de *Bifidobacterium*.

L'incubation est effectuée à 37°C et en aérobiose pour respecter les conditions de fabrication pratiquées à l'échelle industrielle.

Pour chaque temps ( $T_0$ ,  $T_2$ ,  $T_4$ ,  $T_6$ ,  $T_8$ ,  $T_{24}$ ) nous avons suivi l'évolution du pH et de la flore *bifidobacterium* dans le lait seul et dans le lait additionné de 10% miel.

### ✓ **Dénombrement de *Bifidobacterium sp* sur gélose Columbia :**

Préparer 6 boîtes de Pétri stérile.

Pour chaque dilution ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , et  $10^{-7}$ ) dans 2 boîtes de Pétri 1 ml de chaque dilution estensemencé en profondeur sur gélose Columbia, fondu et refroidi à 45°C, bien homogénéiser le milieu et l'inoculum (mouvement de 8).

Après solidification du milieu, ajouter une deuxième couche du milieu Columbia (double masse) pour crée l'anaérobiose.

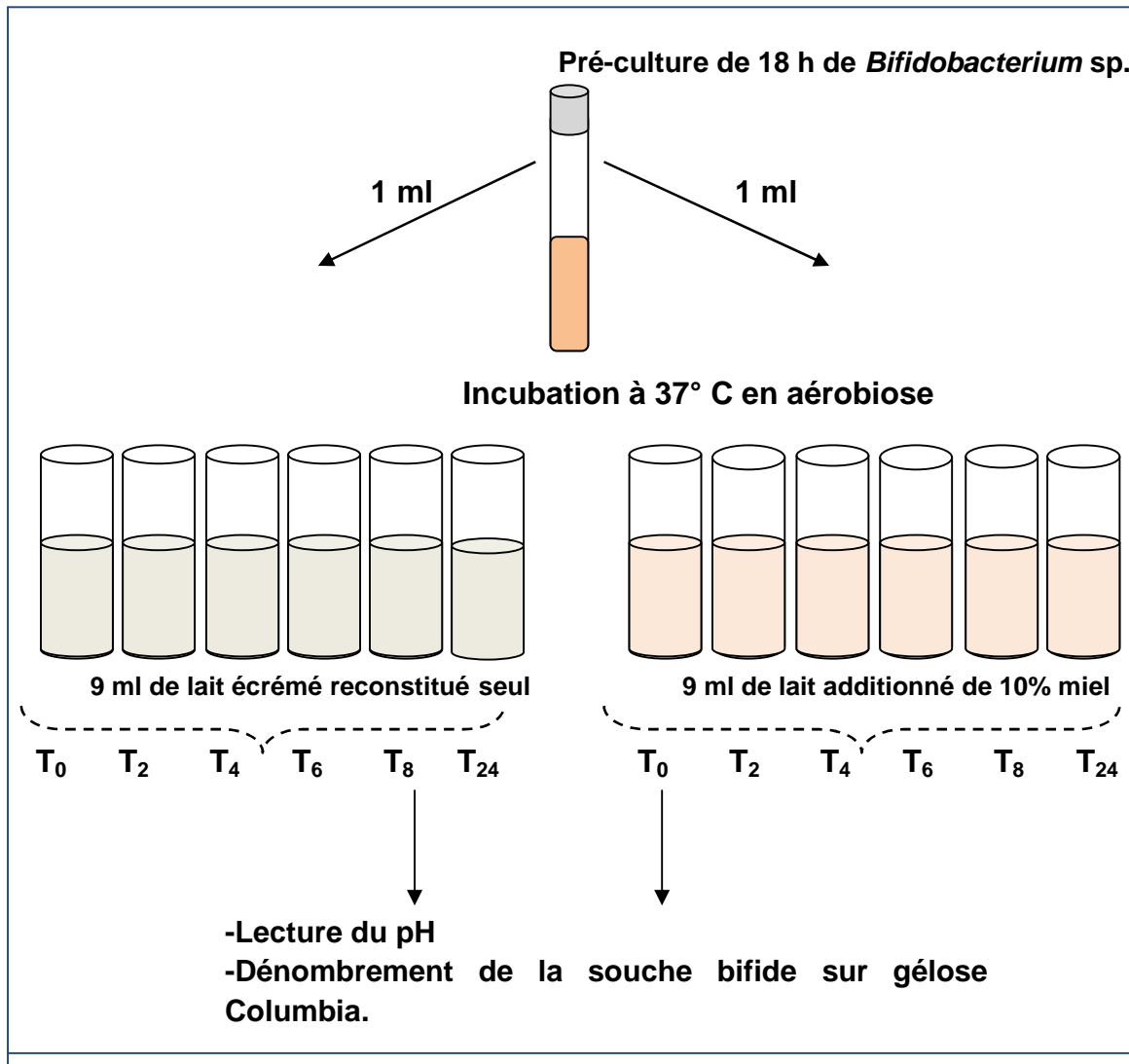
Incuber à 37°C pendant 02 jours.

### ✓ **Technique du dénombrement**

Examiner les boîtes, et choisir celles contenant entre 15 et 300 colonies (si possible....).

Compter avec soin les colonies en marquant au fur et à mesure, à l'aide d'un marqueur, sur le fond extérieur de la boîte.

Interpréter les résultats en faisant par exemple la moyenne des résultats obtenus pour les deux boîtes de la même dilution (**Joffin et Joffin, 2000**), (**figure 22**).



**Figure 23:** Suivi de pouvoir acidifiant et de la croissance de *Bifidobacterium* sp dans le lait écrémé seul et dans le lait additionné au miel.

### II.7.1. Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification ( $V_{pH}$ ), du temps de génération ( $G$ ) et du taux de croissance ( $\mu$ )

L'évolution de la population bactérienne est déterminée par dénombrement sur milieu solide (nombre des UFC/ml).

L'activité acidifiante est caractérisée par quatre paramètres (**Zourari et Desmazeaud, 1991**):

- $V_m$ : vitesse maximale d'acidification exprimée en mUpH/h
- $T_m$ : temps où intervient  $V_m$  (en h).
- $pH_i$ : pH initial.
- $pH_f$ : pH final.

$$V_m = \Delta pH / \Delta T$$

La mesure de la croissance par dénombrement (UFC/ml) permet de calculer le temps de génération (G) ainsi que le taux de croissance ( $\mu$ ) (**Prescott et al., 2007**).

$$G = \frac{T \cdot \text{Log } 2}{(\text{Log } N_f - \text{Log } N_i)} \quad u = 1/G. \quad \text{TA} = \frac{\text{Log } N_f - \text{Log } N_i}{\text{Log } N_i} \times 100$$

**T** : temps.

**Log N<sub>f</sub>** : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps final (T<sub>f</sub>).

**Log N<sub>i</sub>** : logarithme du nombre des UFC obtenu au temps initial (T<sub>i</sub>).

**TA** : taux d'accroissement.

### III. Analyses statistiques

Nos résultats ont été traités par des analyses statistiques (**ANOVA**), en utilisant le **logiciel systat 7**.

Le but de ce test est de déduire s'il y a une différence significative entre les deux paramètres étudiés (Temps et type de lait).

**CHAPITRE V**

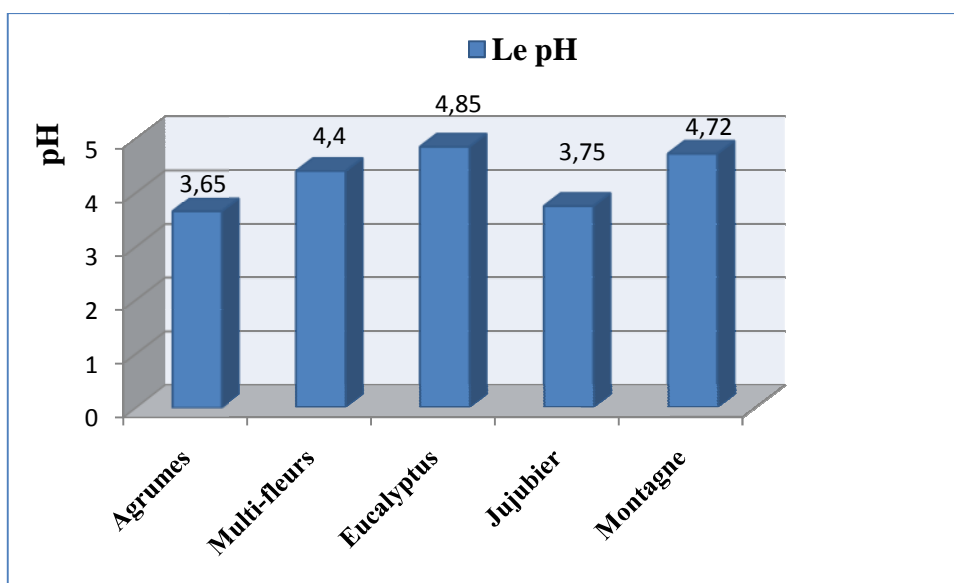
**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## I. Résultats des analyses physico-chimiques

Afin de caractériser les différentes qualités du miel, des analyses physico-chimiques ont été entreprises. Les résultats que nous avons obtenus sont illustrés sur les histogrammes ci-dessous;

### I.1. Le pH

Les valeurs du pH des échantillons des miels étudiés sont illustrées sur la **figure 24** et le **tableau IX (annexe II)**.



**Figure 24:** Les valeurs moyennes du pH des miels analysés.

Le pH des miels analysés est compris entre (3,65 et 4,85) comme montre la **figure 24**, Le miel d'agrumes et de jujubier sont les plus acides avec des valeurs de 3,65 et 3,75 respectivement.

Selon **Gonnet (1986)** et **Prost (1987)** un pH variant :

- Entre (3,5 et 4,5) pour les miels issus du nectar.
- Entre (4,5 et 5) pour les miels mixtes (nectar et miellat).
- Entre (5 et 5,5) pour les miels de miellat en raison de leur teneur plus élevée en sels à effet tampon.

Les miels d'agrumes, multi-fleurs et jujubier ont un pH compris entre (3,65 et 4,40) donc on peut dire que ces miels sont d'origine nectarifères, et les miels d'eucalyptus et de montagne ont un pH compris dans l'intervalle (4,5 et 5) donc ce sont des miels mixtes (mélange de nectar et de miellat).

Nous pouvons dire que les miels analysés sont de bonne qualité car selon **Prost (1987)**, les valeurs du pH d'un miel de bonne qualité oscillent de (3,2 et 5,5).

## I.2. L'acidité

L'acidité des miels étudiés est inversement proportionnelle au pH, elle varie de 15 à 32 milliéquivalents/Kg de miel (**figure 25**). Ces résultats sont en accord avec les recommandations du *Codex Alimentarius* (**Anonyme, 1981**) qui fixe une valeur maximale de 50 Milliéquivalents/Kg de miel. Une forte acidité est souvent associée à une fermentation (**Bogdanov, 2002**).

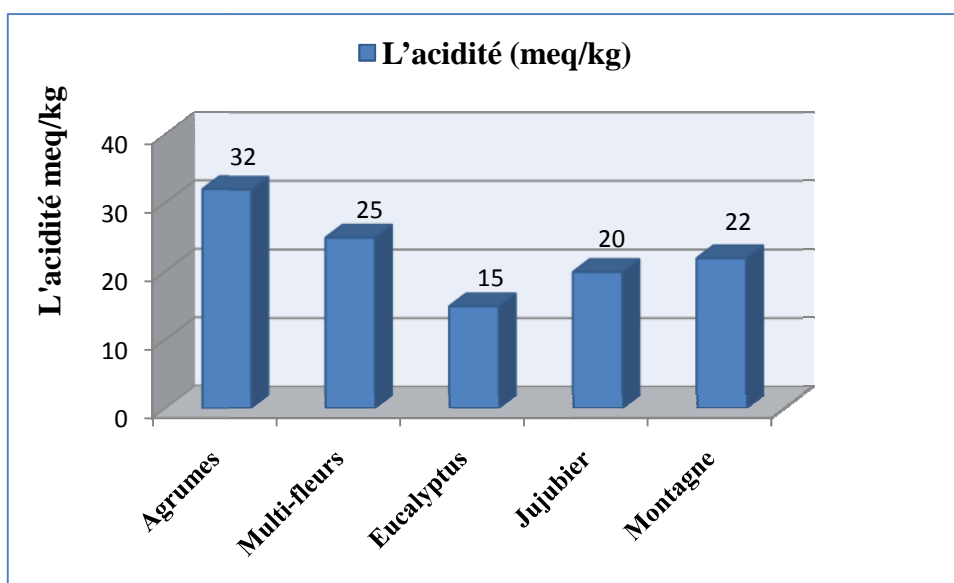


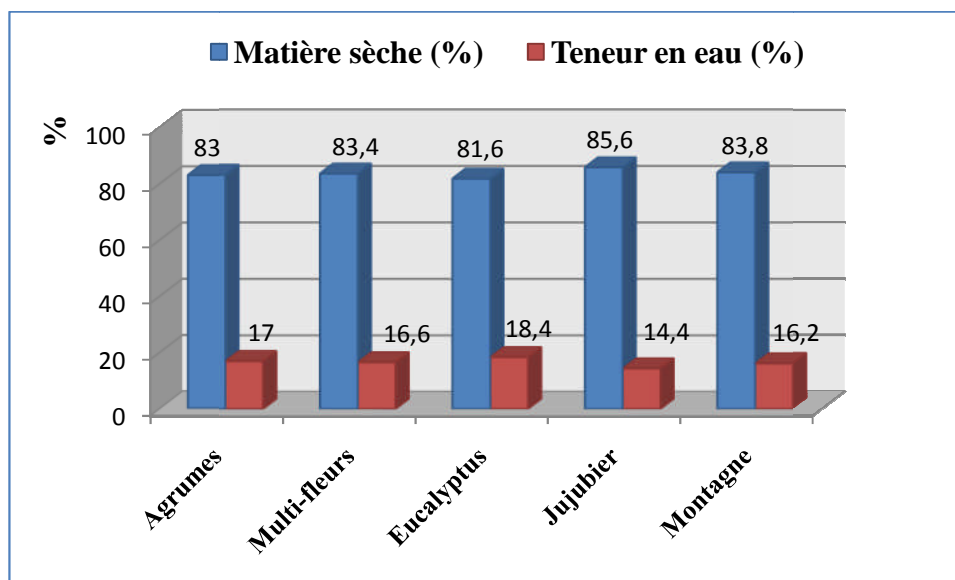
Figure 25: Acidité libre des cinq miels analysés.

Selon **Gonnet (1982) et Weiss (1985)**, l'acidité libre doit être supérieure à 10meq /kg et inférieure à 40meq/kg. Toute acidité dépassant 40meq/kg est considérée comme un facteur favorisant la dégradation du fructose en HMF, ces résultats sont soutenus par ceux de la mesure du pH.

Nous pouvons dire que nos résultats sont conformes aux recommandations du *Codex Alimentarius*.

### I.3. La teneur en eau

Les teneurs en eau exprimées en pourcent (%) des cinq variétés de miels sont données par la **figure 26** et le **tableau XI (Annexe II)**.



**Figure 26:** Teneur en eau et matière sèche des miels étudiés.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les miels étudiés présentent des teneurs en eau proches variant de 14 à 18% avec une moyenne de 16,52%. La teneur la plus élevée concerne le miel d'Eucalyptus (18,4%), alors que la plus faible valeur concerne le miel de Jujubier (14,4%).

Ces résultats sont largement en dessous de la limite maximale préconisée par les normes de *Codex Alimentarius* (**Anonyme, 1981**) qui ne doit pas dépasser 20%.

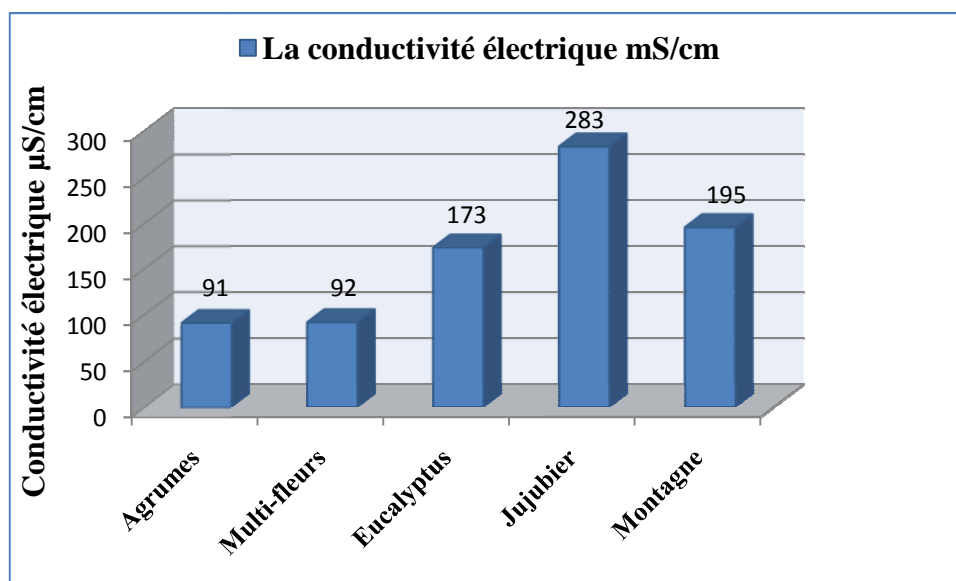
Par ailleurs la teneur en humidité de miel d'Eucalyptus (18,4%) est très proche de celles avancées par **Benaziza et al. (2010)**, qui ont trouvés des valeurs variant de 14,7 à 15% pour la même variété de miel (Eucalyptus).

Ces teneurs montrent que les miels étudiés sont très riches en matière sèche avec une moyenne de 83,46%.

**Lequet (2010)** rapporte que la teneur en eau des miels est en fonction du climat, de la saison et de l'humidité des plantes butinées par l'abeille. L'humidité du miel conditionne sa conservation; plus elle est élevée, plus le miel risque de fermenter (**Bieri et al., 1995**).

#### I.4. La conductivité électrique

Les conductivités électriques des miels étudiés sont représentées par **figure 27** et le **tableau XII (Annexe II)**.



**Figure 27:** Conductivité électrique des cinq variétés de miels étudiés.

La figure montre que les conductivités électriques des cinq échantillons de miels analysés s'échelonnent entre 91 et 283  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . La valeur la plus élevée a été enregistrée pour le miel de Jujubier et la valeur la plus faible appartient au miel d'Agrumes qui est de 91  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Ces valeurs correspondent à ceux recommandées par le *Codex*, ces dernières ne dépassent pas 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour les miels de nectar, et n'abaissent pas moins de 800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour les miels de miellat.

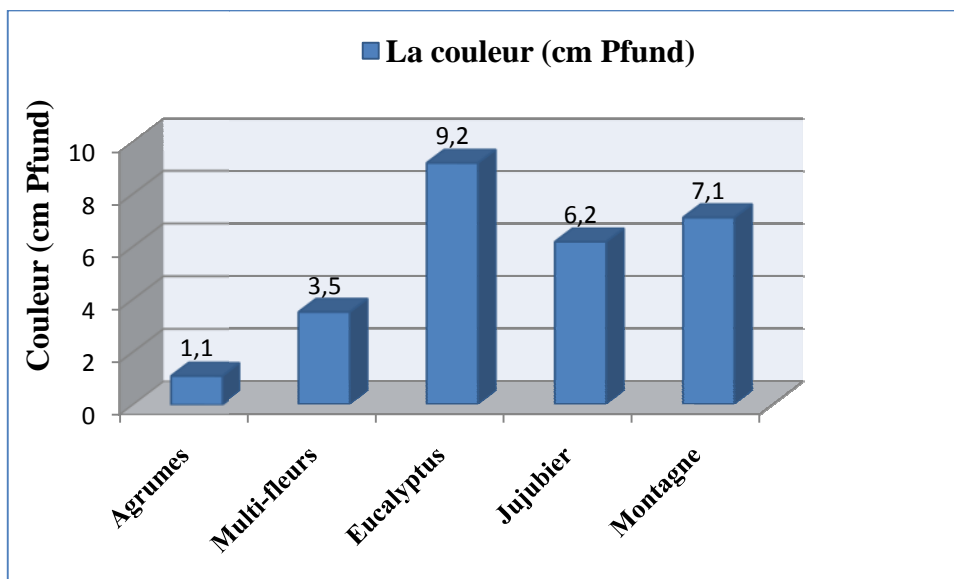
La conductivité électrique dépend de la teneur en éléments minéraux, plus ces derniers sont élevés et plus la conductivité correspondante est élevée; elle dépend aussi des acides organiques, protéines et de quelques sucres complexes (**Terrab et al., 2003**).

#### I.5. La couleur

La couleur varie selon l'origine florale, constatation prouvée par **Schwettzer (2001)** qui rapporte que la coloration est une caractéristique physique dépendant de l'origine du produit mais également un élément sensoriel qui détermine en partie le choix de consommateur.

Les résultats des indices de couleurs des miels analysés obtenus sont illustrés sur la **figure 28** et le **tableau XIII (annexe II)**.





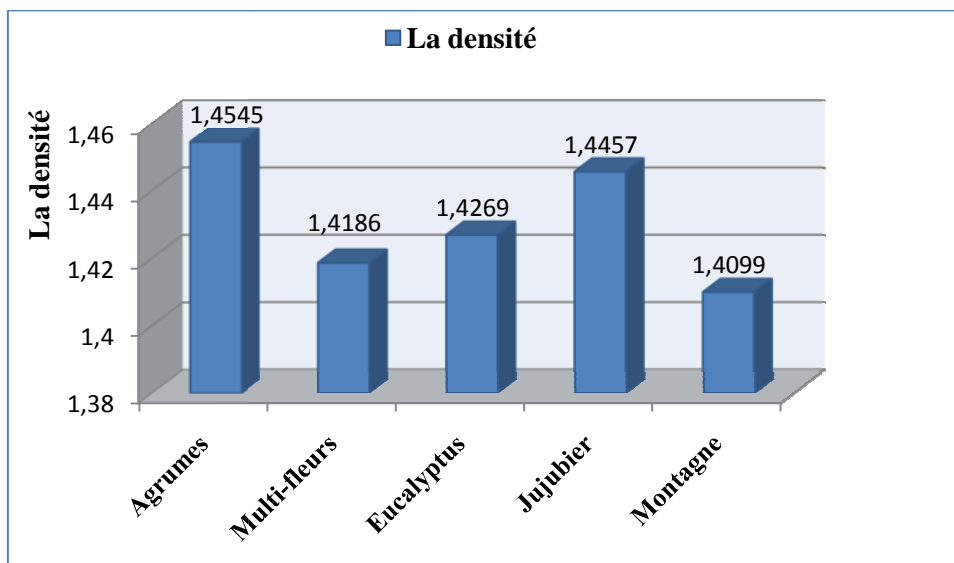
**Figure 28:** Les valeurs des indices de couleur des miels analysés.

Selon les normes Européennes, les valeurs des indices des miels clairs varient entre 1,1 et 6,2 cm Pfund et les miels foncés ont une coloration qui varie entre 6,2 à 14 cm Pfund. Nous avons enregistré 3 échantillons de miel dont la couleur est claire (Agrumes, Multi-fleurs et Jujubier) et 2 échantillons dont la couleur est nettement foncée (Eucalyptus et Montagne).

#### I.6. La densité

Les résultats de la densité des miels étudiés sont illustrés sur la **figure 29** et le **tableau XIV (annexe II)**:

Ces résultats montrent une densité qui varie de 1,4099 à 1,4545. Le miel de Montagne présente la densité la plus faible (1,4099), alors que la densité la plus élevée est structurée dans le miel d'Agrumes (1,4545).

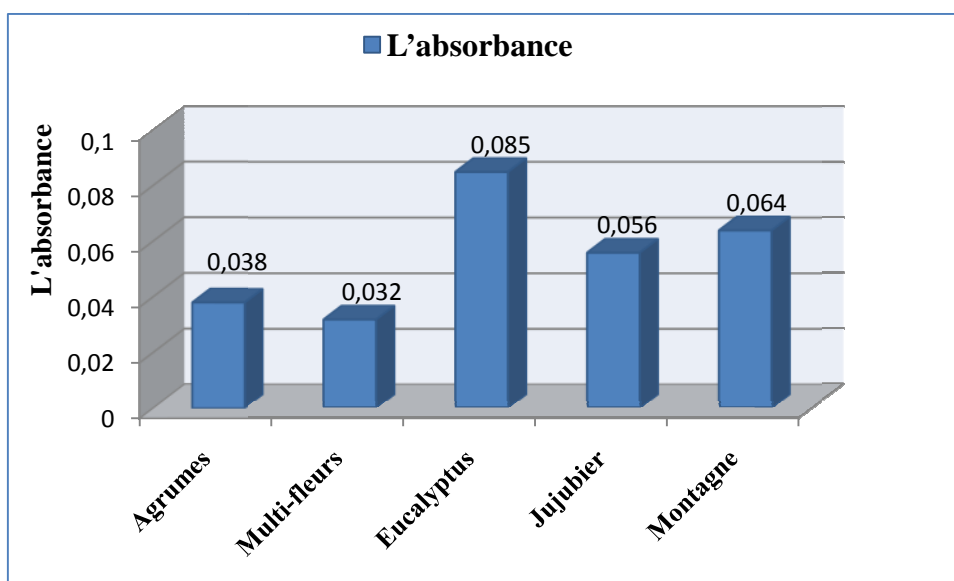


**Figure 29:** Les valeurs de la densité des miels analysés.

De là nous pouvons dire que tous les échantillons de miel répondent aux normes préconisées par l'Association française de normalisation et qui sont de 1,39 à 1,41 jusqu'à 1,52. **Louveaux (1985)** indique que les variations de la densité des miels proviennent surtout des variations de la teneur en eau. Plus un miel est riche en eau et moins il est dense.

### 1.7. L'absorbance

La figure ci-après, nous donne les résultats de l'absorbance obtenue des différents échantillons et qui varie de 0,032 à 0,085 avec une moyenne de 0,055.



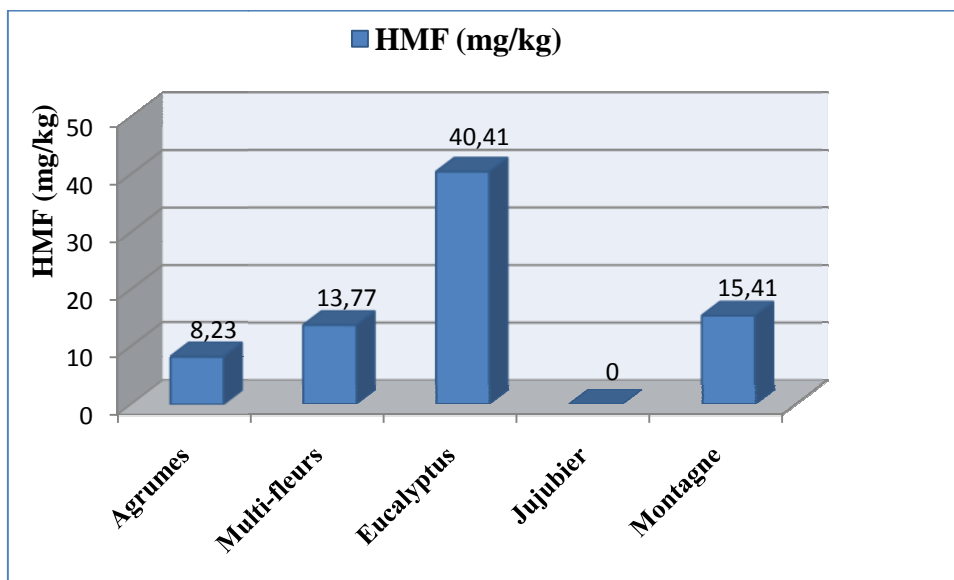
**Figure 30:** Les valeurs de l'absorbance des miels analysés.

Les miels d'eucalyptus et de montagne présentent respectivement une absorbance de 0,085 – 0,0640 cela est dû à leur couleur très foncée. Cette couleur pourra être expliquée par la présence de certaine quantité de miellat.

**Louveaux (1968)** indique que la couleur du miel est liée à la teneur en matière minérale et en protéines. Ainsi les miels foncés sont plus riches en cendres, en protéines, et en colloïdes.

### I.8. L' Hydroxymethyl furfural (HMF)

D'après **Marceau et al. (1994)** le principal critère d'évaluation mesurable de la qualité des miels est en générale la concentration en Hydroxymethyl furfural (HMF).



**Figure 31:** Les valeurs de la teneur du HMF des miels analysés.

Les valeurs obtenues pour l'Hydroxymethyl furfural sont très différentes, elles se situent entre 0 mg/Kg (miel de Jujubier) et 40,41 mg/Kg (miel d'Eucalyptus). Les recommandations du *Codex Alimentarius* (**Anonyme, 1981**) fixent un maximum de 40 mg d'HMF/Kg de miel.

Les travaux de **Bogdanov (2001)** indique que la teneur en HMF est presque nulle au moment de la récolte.

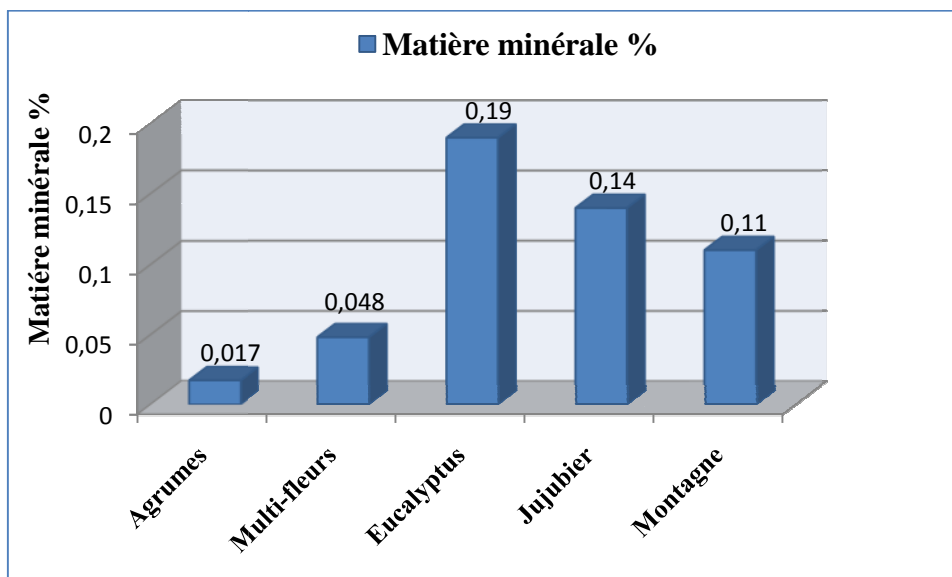
Pour le miel d'eucalyptus les résultats montrent qu'il possède une teneur élevée d'HMF (40,14 mg/kg) Ceci pourrait être expliqué probablement par :

- La teneur élevée en eau qui favorise la transformation du sucre en HMF, nous avons enregistré une teneur en eau de 18,40 %.
- Le chauffage excessif lors du conditionnement et de la conservation.

Pour la santé, l'ingestion d'un miel à concentration élevée de HMF (40 ou 80 mg/kg) ne présente pas de risques (**Bogdanov, 2004**).

### I.9. La teneur en cendres

La composition en matière minérale des miels étudiés est représentée dans la figure 32 et le tableau XVII (annexe II).



**Figure 32:** Les valeurs de la teneur en matière minérale des miels analysés.

Selon **White et al. (1962)** la teneur en matières minérales des miels est comprise entre 0,020% et 1,028% avec une moyenne de 0,169%. D'un autre côté, ont confirmé l'existence d'une relation entre la couleur des miels et la teneur en matières minérales ; d'une façon générale les miels clairs sont nettement moins riches en matières minérales que les miels foncés. C'est le cas de miel d'agrumes et multi-fleurs qui sont clair avec un pourcentage de cendres de 0,017% et 0,048% respectivement. Par contre, les miels d'Eucalyptus, Jujubier et de Montagne sont les plus foncés ont la teneur en matières minérales la plus élevée (soit 0,19%, 0,14% et 0,11% respectivement).

Selon **Bogdanov et al. (1997)** la matière minérale détermine l'origine botanique du miel. Ainsi les miels provenant des nectars ont une teneur en matière minérale ne dépassent pas 0,60% tant dis que celle des miellats, seuls ou en mélange avec le miel de nectar, doivent être inférieurs à 1%.

## II. Résultats des analyses microbiologiques

Pour estimer le degré de contamination des échantillons, nous avons procédé au dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT), levures, moisissures, coliformes totaux, coliformes fécaux et *Clostridium* sulfito-réducteurs.

Comme tout produit d'origine animale, le miel possède une flore microbienne qui lui est propre. Elle fait partie intégrante du produit et dépend de ses propriétés physico-chimiques. Elle est représentée par la flore mésophile totale (bactéries qui croissent à des températures comprises entre 25 et 40°C) (**Blanc, 2010**).

D'après **Luquet (2010)** la flore mésophile totale est sans pouvoir pathogène pour l'homme et n'a pas d'action néfaste sur le miel. Elle est constituée presque exclusivement de *Bacillus* qui sont souvent retrouvés sous forme de spores. Cette flore provient des pattes, langues, et jabots des abeilles, et des pollens et nectaires floraux.

Le tableau XVII résume les résultats des analyses microbiologiques des miels analysés ;

**Tableau XVIII:** Les résultats des analyses microbiologiques.

Germes Échantillons	GAMT	Coliformes totaux et fécaux	Spores d'anaérobies sulfitoréducteurs	Levures et moisissures
Agrumes	<b>800</b>	Absence	<b>Absence</b>	Absence
Multi-fleurs	<b>585</b>	Absence	<b>Absence</b>	Absence
Eucalyptus	<b>300</b>	Absence	<b>Absence</b>	Absence
Jujubier	<b>Absence</b>	Absence	<b>Absence</b>	Absence
Montagne	<b>Absence</b>	Absence	<b>Absence</b>	Absence
Normes (AF)*	<b>&lt;10<sup>4</sup>germes/g</b>	Absence	<b>Absence</b>	<b>&lt;30germes/g</b>

\*AF : AFNOR (1996).

Les résultats montrent que les germes aérobies mésophiles totaux ont plus au moins une faible capacité de développement dans le miel. Le miel d'Agrumes est la variété la plus chargée en GAMT estimés à 800 (UFC)/g de miel, tandis que la variété de miel d'Eucalyptus a présenté une faible charge (300 UFC/g de miel). Les GAMT sont totalement absents dans le miel de Jujubier et de Montagne. Ces résultats peuvent être expliqués par une contamination due à une mauvaise manipulation du miel par l'apiculteur lors de différents traitements et manipulations, comme ils peuvent également dus aussi à de mauvaises ou insuffisantes conditions d'hygiène lors du stockage.

Concernant les coliformes (totaux et fécaux), levures et moisissures et les *Clostridium sulfito-réducteurs* nous observons une absence totale dans les cinq (05) variétés étudiés.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'activité antimicrobienne de miel dû à son pH, sa haute teneur en sucre et à la présence de substances antibactériennes spécifiques.

### III. Résultat de l'effet anti-microbien

L'effet antimicrobien du miel a été testé sur les germes suivants : *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* sp et *Streptococcus* sp.

Les résultats des mesures des diamètres des zones d'inhibition ont montré que tous les miels testés n'ont aucun effet inhibiteur sur *Enterococcus* sp, *Streptococcus* sp, ce qui s'explique par l'absence des zones d'inhibition.

#### III.1. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard d'*Escherichia coli*

Les résultats de l'effet antimicrobien sur *Escherichia coli* des 05 types de miels à différentes concentrations sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau XIX:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur *Escherichia coli*.

<i>E. coli</i> Miels	Diamètres de destruction des germes (mm)		
	100%	50%	25%
Agrumes	14	10	8
Toutes-fleurs	12	10	7
Eucalyptus	18	14	9
Jujubier	25	22	12
Montagne	21	15	11

D'après le tableau XIX, nous remarquons que tous les miels testés ont une activité antimicrobienne sur *E. coli* à des concentrations de 25%, 50% et 100% ceci est justifié par l'apparition des zones d'inhibitions, dont le plus grand diamètre a été enregistré pour le miel de Jujubier (25mm), Montagne (21mm) et Eucalyptus (18mm), viennent ensuite le miel d'Agrumes et de Toutes-fleurs avec des valeurs de 14 mm et 12 mm respectivement (**figure 33**).



**Figure 33:** Effet antimicrobien de miel de jujubier et de multi-fleurs sur *E. coli* (Photographie originale).

### III.2. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de *Bacillus* sp

Les résultats de l'effet antimicrobien sur *Bacillus* sp des 05 types de miels à différentes concentrations sont mentionnés dans le **tableau XX**.

**Tableau XX :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur *Bacillus* sp.

<i>Bacillus</i> <i>sp</i>	Diamètres de destruction des germes (mm)		
	100%	50%	25%
Miels (--): aucun effet			
Agrumes	13	10	--
Toutes-fleurs	13	10	--
Eucalyptus	16	13	7
Jujubier	20	15	11
Montagne	16	12	8

D'après le **tableau XX**, nous remarquons que tous les miels testés ont une activité antimicrobienne sur *Bacillus* sp à des concentrations de 25%, 50% et 100% mais pour le miel d'Agrumes et Toutes-fleurs les zones sont absentes à la dilution 25%. Le plus grand diamètre a été enregistré pour le miel de Jujubier (20mm), Montagne et Eucalyptus (16 mm) viennent ensuite le miel d'Agrumes et de Toutes-fleurs avec une valeur de 13 mm (**figure 34**).



**Figure 34:** Effet antimicrobien de miel de Montagne et d'Eucalyptus sur *Bacillus* sp (Photographie originale).



### III.3. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats de l'effet antimicrobien sur *Pseudomonas aeruginosa* des 05 types de miels à différentes concentrations sont mentionnés dans le **tableau XXI**.

**Tableau XXI :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Miels \ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Diamètres de destruction des germes (mm)		
	100% 25%	50%	
Agrumes	12	8	--
Toutes-fleurs	13	11	--
Eucalyptus	15	12	9
Jujubier	22	17	13
Montagne (--): aucun effet.	22	16	11

D'après le tableau XXI, nous remarquons que tous les miels testés ont une activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* à des concentrations de 50% et 100%, ceci est justifié par l'apparition des zones d'inhibitions, dont le plus grand diamètre a été enregistré pour le miel de Jujubier et Montagne (22mm) viennent ensuite le miel de d'Eucalyptus, Toutes-fleurs et d'Agrumes avec des diamètres de 15 mm, 13 mm, 12 mm respectivement (**figure 35**).

Par contre à la dilution 25%, les miels de Toutes-fleurs et d'Agrumes n'ont aucun effet inhibiteur (absence de zone d'inhibition) sur *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 35:** Effet antimicrobien de miel de Montagne et d'Agrumes sur *Pseudomonas aeruginosa* (Photographie originale).

#### III.4. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'effet antimicrobien sur *Staphylococcus aureus* des 05 types de miels à différentes concentrations sont mentionnés dans le **tableau XXII**.

**Tableau XXII :** Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur *Staphylococcus aureus*.

S. <i>aureus</i>	Diamètres de destruction des germes (mm)		
	100%	50%	25%
100l. Montagne	22	15	11
300l. Agrume	16	12	9
Toutes-fleurs	13	7	--
Eucalyptus	18	14	10
Jubier	26	18	12

(--): aucun effet.

D'après le tableau XXII, nous remarquons que tous les miels testés ont une activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* à des concentrations de 25%, 50% et 100%, ceci est justifié par l'apparition des zones d'inhibitions, dont le plus grand diamètre a été enregistré pour le miel de Jubier (26 mm) de Montagne (22mm) viennent ensuite le miel d'Eucalyptus, d'Agrumes et Toutes-fleurs avec des diamètres de 18 mm, 16 mm, 13 mm respectivement (**figure 36**).

A la dilution 25%, seul le miel Toutes-fleurs qui n'a aucun effet inhibiteur (absence de zone d'inhibition) sur *Staphylococcus aureus*.



**Figure 36:** Effet antimicrobien de miel de Jujubier et d'Agurmes sur *Staphylococcus aureus* (Photographie originale).

### III.5. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de *Staphylococcus epidermidis*

Les résultats de l'effet antimicrobien sur *Staphylococcus epidermidis* des 05 types de miels à différentes concentrations sont mentionnés dans le **tableau XXIII**.

**Tableau XXIII:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des miels étudiés sur *Staphylococcus epidermidis*.

S. <i>epidermis</i> Miels	Diamètres de destruction des germes (mm)		
	100%	50%	25%
Agrumes	12	10	--
Toutes-fleurs	22	18	16
Eucalyptus	17	13	11
Jujubier	26	18	16
Montagne	19	14	--

(--): aucun effet.

D'après le tableau XXIII, nous remarquons que tous les miels testés ont une activité antibactérienne sur *Staphylococcus epidermidis* à des concentrations de 50% et 100%, ceci est justifié par l'apparition des zones d'inhibitions, dont le plus grand diamètre a été enregistré pour le miel de Jujubier (26 mm) de Toutes-fleurs (22mm) viennent ensuite le miel de Montagne, d'Eucalyptus et d'Agrumes avec des diamètres de 19 mm, 17 mm, 12 mm respectivement (**figure 37**).

Par contre à la dilution 25%, les miels de Montagne et d'Agrumes n'ont aucun effet inhibiteur (absence de zone d'inhibition) sur *Staphylococcus epidermidis*.



**Figure 37:** Effet antimicrobien de miel de Jujubier et de Toutes-fleurs sur *Staphylococcus epidermidis* (**Photographie originale**).

D'après ces résultats, on conclut que :

- L'activité antibactérienne des miels de Jujubier et de Montagne est plus grande que celle des miels d'Agrumes, Eucalyptus et de Multi-fleurs.
- La souche *Bacillus* sp est la plus résistante au miel par contre les souches *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* sont les plus sensibles au miel.
- L'existence d'une zone claire aussi bien sur les boîtes de *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus* que sur celles des autres bactéries indique que le miel quelque soit sa variété, a diffusé son principe actif tout autour du disque et a freiné le développement des bactéries testées.
- L'évolution du développement des bactéries sensibles au miel est inversement proportionnelle à la progression de la concentration de miel.

D'après **Prost (1987)** les propriétés antibactériennes du miel sont dues grâce à une Inhibine et à des substances provenant des plantes butinées. L'élément essentiel de cette activité antibiotique du miel, une enzyme la gluco-oxydase, provoquant un dégagement d'eau oxygénée.

En effet, **Lavie (1968)** a découvert que les substances antibactériennes se trouvent dans les ruches, le pollen, la gelée royale, la propolis ainsi que sur le corps des reines et des ouvrières. Ces substances antibiotiques sont d'origines diverses : certaines viennent du nectar, du pollen ou de la propolis ; d'autres sont sécrétées par les glandes hypo-pharyngiennes des ouvrières et par les glandes mandibulaires des reines.

#### IV. Résultat de l'isolement de *Bifidobacterium* à partir du tube digestif de l'abeille

##### IV.1. Caractères biochimiques

Les caractères biochimiques des bifidobactéries isolés à partir du tube digestif de l'abeille sont présentés dans le **tableau XXIV**:

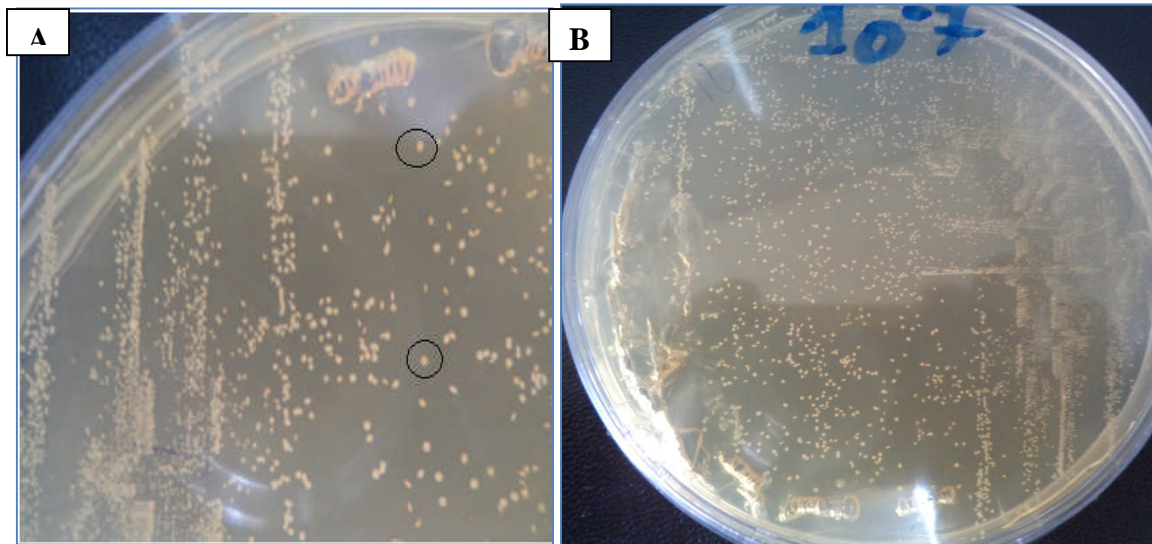
**Tableau XXIV** : Caractères biochimiques des bifidobactéries isolés.

Test	Résultat
<b>Coloration de Gram</b>	<b>+</b>
<b>Test de catalase</b>	<b>-</b>
<b>Mannitol</b>	<b>-</b>
<b>Mobilité</b>	<b>-</b>
<b>Citrate</b>	<b>-</b>
<b>Urée</b>	<b>-</b>
<b>Indole</b>	<b>-</b>
<b>Test Décarboxylase ; ODC</b>	<b>-</b>
<b>ADH</b>	<b>+</b>
<b>LDC</b>	<b>+</b>
<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>-</b>
<b>Production du gaz</b>	<b>-</b>
<b>Fermentation des sucres (TSI)</b>	<b>+</b>

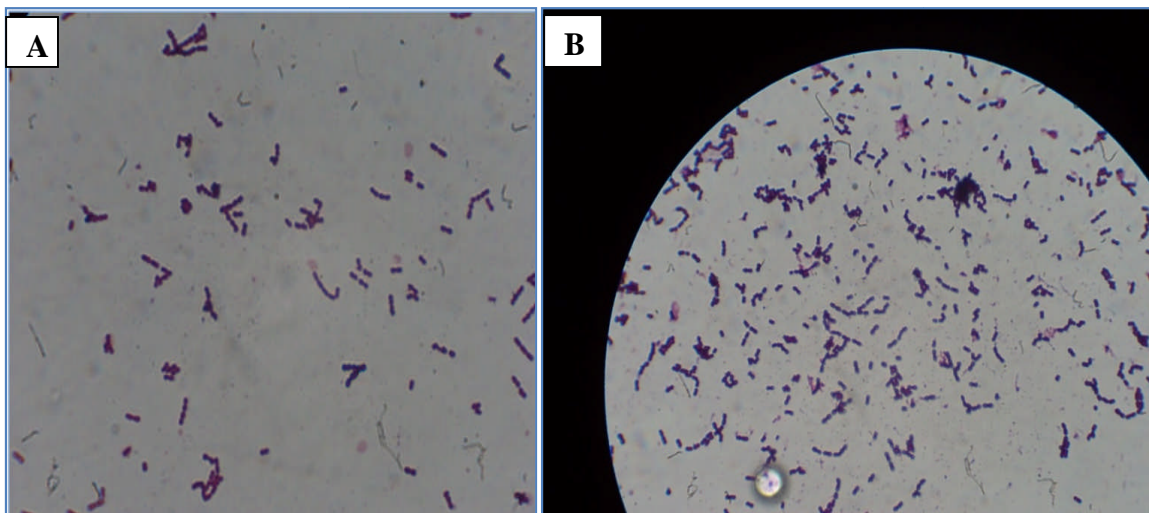
##### IV.2. La forme

Les bifidobactéries isolées sont des colonies de couleur crème de 0,5 à 1 mm de diamètre, nous avons observé deux formes ; V et Y (**figure 38, 39**).





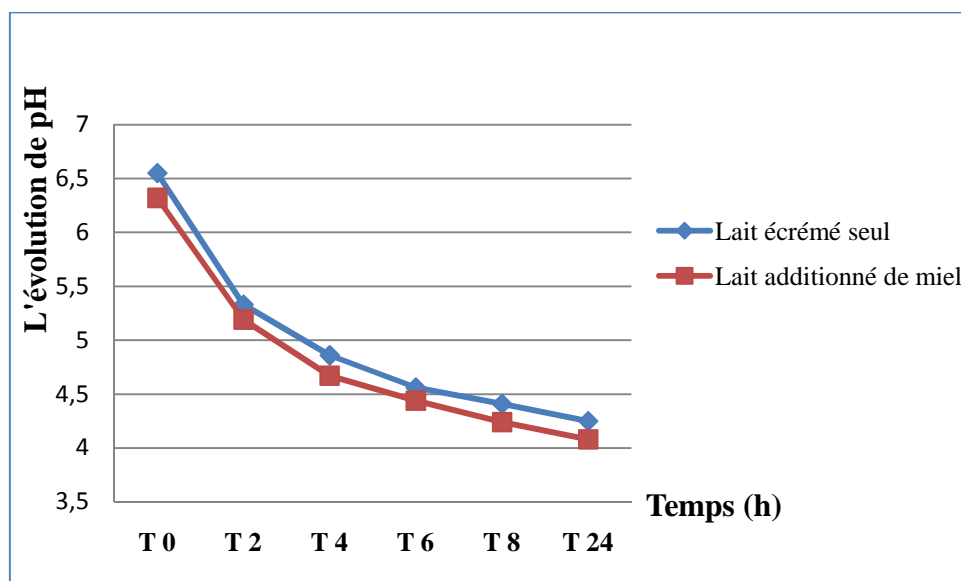
**Figure 38(A, B):** Aspect macroscopique des colonies obtenues à partir du tube digestif de l'abeille (**Photographie originale**).



**Figure 39 (A, B):** *Bifidobacterium* sp vu au microscope photonique **G** (10 x 100) (**Photographie originale**).

## V. Résultats de l'évolution du pH dans les deux types de lait

Le suivi de l'évolution du pH dans le lait écrémé (0 % MG) seul et enrichi en miel, au cours d'incubation nous a permis de tracer la courbe illustrée dans la figure 40.



**Figure 40:** Courbe d'évolution du pH dans le lait écrémé seul et dans le lait additionné de 10 % miel au cours d'incubation.

Une diminution progressive des valeurs du pH dans les deux types de lait où il atteint une valeur de 4,25 pour le lait sans miel et une valeur de 4,08 pour le lait enrichi en miel.

Cette diminution de pH ou l'augmentation de l'acidité s'explique par l'activité microbienne qui met en évidence la production d'acide lactique par fermentation du lactose qui correspond à la croissance des bifidobactéries.

Après 8 heures de fermentation le pH du lait seul et enrichi en miel atteint des valeurs de 4,41 et 4,24 respectivement, dont la diminution en valeur de pH était de l'ordre de 2,14 et 2,08 unités avec une vitesse d'acidification de 0,2675 mUpH/h et de 0,26 mUpH/h respectivement (tableau **XXVI**).

**Tableau XXVI:** Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification ( $V$  pH), du temps de génération ( $G$ ) et du taux de croissance ( $\mu$ ).

Type de lait	$\Delta$ pH	$V$ pH (mUpH/h)	$G$ (min)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	TA (%)
Lait seul	2,14	0,2675	101,2	0,59	18,86
Lait enrichi en miel	2,08	0,2600	93,46	0,64	20,47

Selon **Mahaut et al. (2000)** l'acidification résulte de la dégradation du lactose en acide lactique et aussi de l'activité protéolytique et lipolytique des

bifidobactéries qui libèrent des acides aminés et des acides gras, aboutissant à la diminution du pH.

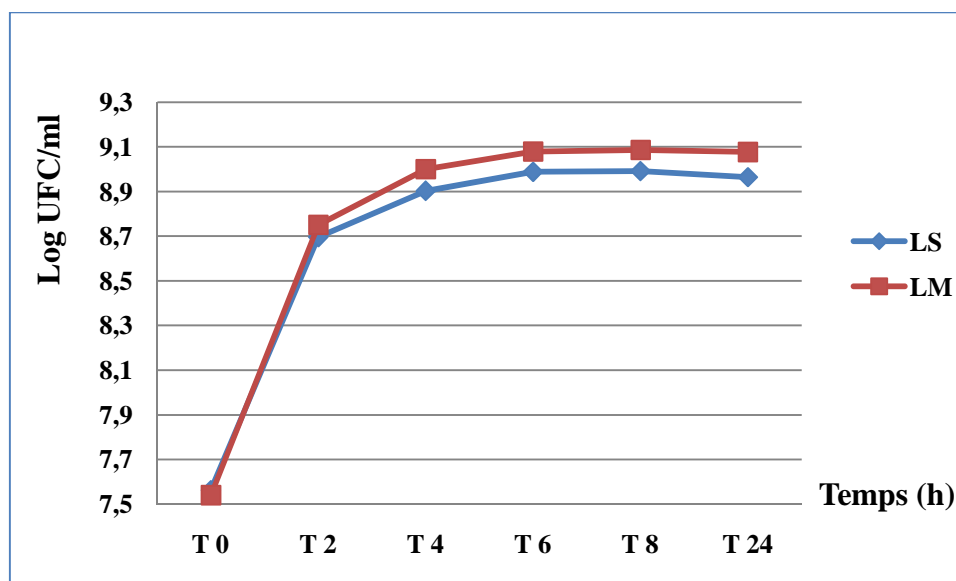
**Vierling (1999)** ajoute que cette acidité est bénéfique pour les produits laitiers, car l'acide lactique inhibe le développement des germes pathogènes et constitue une bonne protection pour ces produits.

## VI. Résultats de l'évolution de la flore bifide dans le lait seul et enrichi

Le lactose comme substrat, est très bien métabolisé, car c'est une bonne source de carbone et d'énergie pour les bifidobactéries (**Bielecka et al., 2002**).

Les laits fermentés contenant les bifidobactéries possèdent de nombreux avantages nutritionnels et technologiques : un goût doux et la formation de l'acide lactique L(+) physiologiquement désirable (**Riazi et Ziar, 2010**).

Les résultats obtenus sont montrés dans la **figure 41** et le **tableau XXVI** (annexe II).



**Figure 41:** Evolution de la croissance de *Bifidobacterium* sp durant la période T<sub>0</sub>–T<sub>24</sub> des le lait seul et enrichi.

Les bifidobactéries étudiés dans le lait seul et dans le lait enrichi par le miel, ont réagit positivement et semble plus important dans le lait enrichi.

Le suivi de l'évolution de la croissance de la flore bifide montre un comportement différents de cette flore bactérienne, ou au début la croissance est



plus accélérée pour le lait écrémé enrichi par rapport à celui observés dans le lait seul ; ce qui montre que l'apport du miel fait accélérer la croissance de cette flore.

Selon les résultats obtenus, la cinétique de croissance des bifidobactéries au cours de 2h ( $T_2$ ) de fermentation augmente et semble plus importante pour le lait enrichi par le miel que pour le lait seul, cette croissance peut être expliquée par l'apport des nutriments contenus dans les deux types de lait.

Après 4 h ( $T_4$ ) d'incubation, la courbe de croissance montre une croissance très importante dans les deux types de lait cette croissance peut être expliquée par l'apport des nutriments contenus dans les deux différents types de lait.

À ( $T_8$ ) un très léger gain de croissance est observé, nous avons enregistré des taux d'accroissement de (18,86 et 20,47 %) pour le lait seul et pour le lait enrichi en miel respectivement.

Après 24h ( $T_{24}$ ) d'incubation, la courbe de la croissance présente une allure décroissante, les quantités de biomasse atteintes en fin de fermentation sont de 8,96 LogUFC/ml pour le lait seul et de 9,07 LogUFC/ml pour le lait additionné de miel.

D'après **Mahaut et al., (2000)** la diminution des souches bifides peut être expliquée par:

-L'acidité du milieu.

-Appauvrissement du milieu en substances de croissance surtout en lactose par sa transformation en acide lactique.

-L'auto-inhibition des bifidobactéries par les valeurs basses du pH.

Dans ces conditions la flore bifide ne se multiplie pas mais conserve néanmoins une activité métabolique (**Hernier et Accolas, 1990**).

La diminution progressive de la flore bifides montre une faiblesse du milieu par les nutriments qui sont peut être :

- Consommé par les bifidobactéries.
- Ou par raison de sensibilité de ces bactéries à l'acidité et le pH du milieu (**Hernier et Accolas, 1990**).

Il y a lieu de remarquer qu'à 10%, le miel améliore plus la croissance des souches bifides sur milieu lait. Le miel utilisé à la concentration de 10% améliore

la capacité des souches bifides à se multiplier et ne présente aucun effet inhibiteur.

L'effet stimulateur du miel a été attribué à son contenu en fraction fructo-oligosaccharides (FOS) qui se trouve encore renforcé par les taux élevés de glucose et de fructose. Selon (**Kajiwara et al., 2002**) le miel stimule la croissance des bifidobactéries tout comme les FOS, les galacto-oligosaccharides (GOS) et l'inuline.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Chick et al. (2001)** et **Ustunol et Gandhi (2001)**.

## VII. Résultats des analyses statistiques

### VII.1. Analyse de la variance de pH en fonction de temps et de la nature du lait

Les résultats des analyses statistiques de la variation du pH dans les deux types de lait en fonction de temps et la nature de lait illustré dans le **tableau XXVIII** et la **figure 42**.

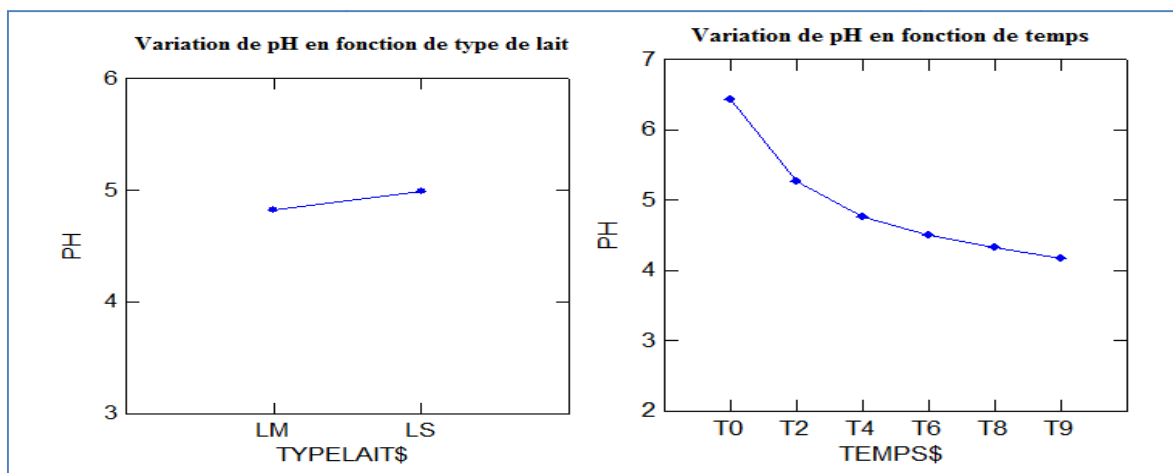
**Tableau XXVIII:** L'analyse de la variance de pH en fonction de temps et la nature de lait.

Source	somme des carrés écarts	ddl des	carrés moyens	F-ratio	p	la signification
<b>Temps</b>	7,069	5	93,836	93,836	0,000	<b>significative</b>
<b>variation résiduelle</b>	0,09	6	0,015	/	/	/
<b>type de lait</b>	0,087	1	0,087	0,123	0,734	<b>non significative</b>
<b>variation résiduelle</b>	7,073	10	0,707	/	/	/

Nous avons enregistré une probabilité significative (**p=0.000**) pour le pH entre les deux types de lait (lait écrémé seul et lait enrichi en miel), donc il y'a une différence de pH entre les deux type de lait.

Contrairement, nous avons enregistré une probabilité non significative (**p=0,734**) pour le pH en fonction de temps ( $T_0$  - $T_{24}$  pour chaque type de lait). Ce qui s'explique par la différence entre la composition de chaque milieu, le lait enrichi en miel est plus riche en acide lactiques et des anions que le lait seul.

Le miel utilisé à 10% permet aux souches bifides de faire diminuer le pH du lait à 4,67 après 4 h de fermentation. Selon **Mahaut et al. (2000)** l'activité protéolytique et lipolytique des ferments lactiques qui libèrent des acides aminés et des acides gras, aboutissant à la modification des pH.



**Figure 42:** La variation du pH en fonction de temps et le type de lait.

## VII.2. Analyse statistique de variation de LogUFC en fonction de temps et type de lait

Les résultats des analyses statistiques de la variation de LogUFC sont indiqués dans **tableau XXIX** et la **figure 43**.

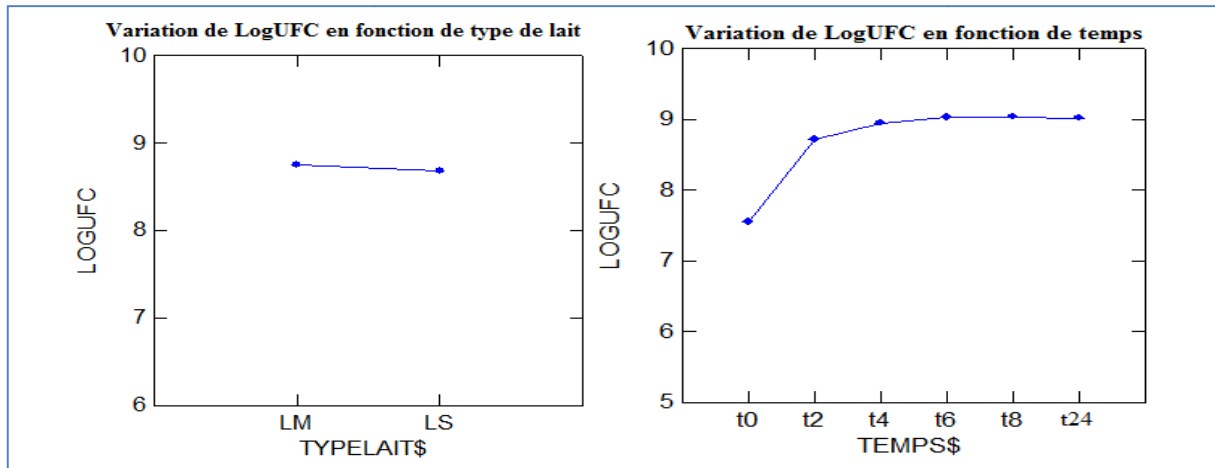
**Tableau XXIX:** L'analyse de la variance de LogUFC en fonction de temps et de la nature de lait.

Source	somme des carrés des écarts	ddl	carrés moyens	F-ratio	p	la signification
<b>Temps</b>	7,069	5	93,836	93,836	0,000	<b>significative</b>
<b>variation résiduelle</b>	0,09	6	0,015	/	/	/
<b>type de lait</b>	0,087	1	0,087	0,123	0,734	<b>non significative</b>
<b>variation résiduelle</b>	7,073	10	0,707	/	/	/

Nous avons enregistré une probabilité significative (**p=0,000**) pour la variation de Log UFC de *Bifidobacterium* dans les deux types de lait, donc il y'a une différence de la croissance de bactéries entre les deux types de lait.

Cette différenciation indique que le miel est accéléré la multiplication des bifidobactéries, par sa richesse en éléments nutritive nécessaire a la croissance et la survie de ces bactéries.

Contrairement, nous avons enregistré une probabilité non significative  $p=0,734$  pour la croissance de *Bifidobacterium* en fonction de temps ( $T_0 - T_{24}$  pour chaque type de lait).



**Figure 43:** Variation de LogUFC en fonction de temps et de type de lait.

**NB :**

**LS :** lait écrémé seul.

**LM :** lait enrichi en miel.

### Conclusion

Concernant le miel, les résultats obtenus sont en concordance avec la plupart des études sur le miel des différentes régions d'Algérie et du monde, par rapport à la composition chimique.

Ainsi, les miels algériens ont une composition chimique variée, ce qui est en relation directe avec la diversité florale du pays, ceci sera comme une perspective pour faire un balayage sur tout le territoire algérien.

Sur le plan microbiologique, les miels présentent une bonne qualité, grâce aux capacités des colonies d'abeilles d'éliminer les germes pathogènes et non pathogènes présents dans leur environnement, également à l'effet antibactérien et aux caractéristiques physico-chimiques du miel.

Le miel inhibe effectivement la croissance bactérienne aussi bien des Gram(+) (*Bacillus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) que des Gram(-) (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), cet effet montre des sensibilités importantes avec des concentrations différentes des cinq variétés de miel étudiées. Par contre, on n'a pas trouvé un effet antimicrobien sur *Enterococcus* sp et *Streptococcus* sp.

L'isolement de *Bifidobacterium* à partir du tube digestif de l'abeille consiste à suivre leurs évolutions dans un lait écrémé seul et enrichi au miel et mettre en évidence l'étude de deux paramètres technologiques: le pH et la croissance au cours de fermentation de T<sub>1</sub> jusqu'au T<sub>24</sub>. Les conclusions suivantes ont été notées:

- Une diminution progressive des valeurs du pH dans les deux types de lait où il atteint une valeur de 4,25 pour le lait sans miel et une valeur de 4,08 pour le lait enrichi en miel. Cette diminution de pH ou l'augmentation de l'acidité s'explique par l'activité microbienne qui met en évidence la production d'acide lactique par fermentation du lactose qui correspond à la croissance des bifidobactéries.
- Le suivi de la cinétique de croissance des bifidobactéries, montre un comportement différent de cette flore bactérienne ou au début la croissance

est plus accéléré pour le lait écrémé additionné de miel par rapport à celui observé dans le lait seul; ce qui montre que l'apport du miel accélère la croissance de la flore bifide.

- Le miel utilisé à la concentration de 10% améliore la capacité des souches bifides à se multiplier et n'est pas inhibiteur.

En perspectives il serait intéressant d'étudier les points suivants:

- Déterminer le CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des miels étudiés.
- Etudier l'effet du miel sur d'autres germes pathogènes.
- Etudier la viabilité des bifidobactéries au cours de la conservation dans un lait fermenté enrichi en le miel.
- Etudier la cinétique de croissance d'autres bifidobactéries tels que : *Bf. infantis*, *Bf. animalis* ; etc., pendant la fermentation et au cours du stockage.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

### Références bibliographiques

- **Adam F., 1985.** Les croisements et l'apiculture de demain. Paris : SNA, 1985, 127p.
- **Adam F., Hadorn H et Maurizio A., (1974)** - Livre des denrées alimentaires suisse. Miel et miel artificiel, 34 p.
- **AFNOR (1996).** Association Française de Normalisation.
- **Anand S.K., Srinivasan R.A. and Rao L.K., 1985.** "Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*" *J. Cult. Dairy Prod.* 19, pp. 6 – 8.
- **Anonyme (1981).** Codex STAN 12,. Codex norme pour le miel. Norme adoptée en 1981.Révisions en 1987 et 2001, 1-10 pp.
- **Anonyme (2003).** Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales: Algérie.
- **Anonyme, (2006).** Bilan annuel des productions apicoles nationales en Algérie. ITELV, 54p.
- **Antinelli J.F ; Clément M.C ; Moussa I ; Cordella C et Faucon J.P, (2001).** Détection de canne à sucre dans les miels par analyses isotopique et microscopique : étude et comparaison. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, 94, (954), 13-22 pp.
- **Benaziza-Bouchema D, Schweitzer P, (2010).** Caractérisation des principaux miels des régions du Nord de l'Algérie, *Cah Agric*, vol. 19 N° 6, 432-438 pp.
- **Bendahou H., Hasnat N., (2005).** Contribution à l'étude de l'influence de durée de conservation sur la qualité du miel dans la wilaya de Mascara.
- **Bernet M-F, Brassart D., Neeser J-R., Servin A-L., 1993.** Adhesion of human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogens cell intraction. *APPL, Microbiol.*, 59: 4121-4128.
- **Blanc M., (2010).** Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Faculté de Médecine et de Pharmacie. France.
- **Biri M., (1999):** Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Edition vecchi S.A paris. 260p.



- **Bielecka M., Biedrzycka E., Majkowska A., (2002).** Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness, Food Research International, 35 125–131.
- **Bieri K., Bogdanov S., Figar M., et Zurcher K, (1995).** Miel: Définition et Directives pour l'Analyse et l'Appréciation. Livre Suisse des Denrées Alimentaires, OCFIM, 1–26 pp.
- **Bogdanov S, Martin P et Lüllmann C, (1997).** Harmonized methods of the European Honey Commission. Apidologie, Extra issue, 1-59 pp.
- **Bogdanov S. (2002).** Harmonized methods of the international honey commission, 61 p.
- **Bogdanov S. (2004).** Produits apicoles, 23A Miel, Revus par le groupe d'experts « Produits apicoles », 37p.
- **Bogdanov S. (2001):** Qualité du miel et norme international relative au miel. Rapport de la commission international du miel. Abeille Cie N° 71-4.1 2p.
- **Bradbear N. (2010).** Le rôle des abeilles dans le développement rural. Manuel sur la récolte, la transformation et la commercialisation des produits et services dérivés des abeilles, revue produits forestiers non ligneux FAO, N° 19, 238 p.
- **Bruneau E. (2002).** Les produits de la ruche. In Le traité rustica de l'apiculture. Paris, Rustica, p. 354-384.
- **Cherpunoj I. (1984).** La cristallisation du miel, Pchelovodstvo n°12.
- **Chanaud P. (2010).** Les miels. Variétés, bienfaits, recettes. Edisud, Aix-en-Provence, 192 p.
- **Chick H., Shin H., et Ustunol Z. (2001).** Growth and acid production by lactic acid bacteria and Bifidobacteria in skim milk containing honey, Journal of Food Science, 66 (2001) 478-481.
- **Clément H. (2009).** L'abeille sentinelle de l'environnement. Paris, Alternatives, 2009, 144 p.
- **Daouar N. et Mekkrai Z. (2010).** Etude de développement ovarien chez l'abeille ouvrière "*Apis Mellifera*". Université Hassiba Benbouali de Chlef Algérie – Thèse Master.
- **Des Jardiny, M.-L.Roy, D. et Goulet, J. 1990.** Growth of Bifidobacteria and their enzyme profile. J. Dairy Sci. 73, 299-307 pp.

- **Dafni A. (2005).** Practical pollination biology. Enviroquest, Cambridge Canada.
- **Djerd A. (2008).** Contrôle de qualité des miels de la région de Djelfa, comparaison avec des miels nationaux et des miels importés. Thèse d'Ingéniorat en biologie, Université de Djelfa.
- **Donadieu Y. (1984).** Le miel thérapeutique naturelle 3 édition. Paris, 61p.
- **Donadieu Y (1985).** Les produits de la ruche, source de santé et de vitalité, Les Fiches d'Apithérapie, Donadieu Editions.
- **Emmanuelle R. (1996) :** Le marché mondial du miel, Centre d'Economie Sociale, Université de Liège. 9p.
- **FAO, 2010.** Food and agriculture organization.
- **Gonnet M., (1982).** Le miel ; composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture. Pp : 1-18.
- **Gonnet M., (1986).** L'analyse des miels. Description de quelques méthodes de contrôle de qualité. Bul. Tech. Apic, 54, 13(1). Pp 17-36.
- **Gonnet M., Lavie P. (1960).** Influence du chauffage sur le facteur antibiotique présent dans les miels. Ann. Abeille, 3, (4), 349-364.
- **Gout J. (2009).** Le miel. Editions Jean-Paul Gisserot, Paris, 64 p.
- **Gournier .C.N ; Larpent.J.P ; Maria.I et Larpent.J.L, 1994.** Les probiotiques alimentaires animales et humaines. Pp 89-96 Paris, France.
- **Guerriat H. (1996).** Mieux comprendre le concept de « race » Application à l'abeille noire (suite). *Mellifica*, 2008, n°84, 6-7.
- **Hernier, J et Accolas, J.P. (1990).** Techniques d'analyses et de contrôle dans les IAA, édition Apria, 589 pages.
- **Hooper T (1980).** Les abeilles et le miel : Guide de l'apiculture. Ed Delachaux et Niestle. P 39.
- **Hoyet C (2005).** Le miel : de la source à la thérapeutique, thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, présentée à université Henri Poincare - Nancy I, 96 p.
- **J.O.R.A, 2004.** Journal Officielle de la République Algérienne. Article N°35 daté du 27 Mai 2004.

- **JOFFIN C., et JOFFIN J-N. (2000)** - Microbiologie alimentaire .Ed. CNDP d'Aquitaine, 2ème édition, Tome 2, chapitre 9, 299p.
  
- **Kajiwara S., Hasand G., et Ustunol Z. (2002)**. Effect of honey on growth and acid production by intestinal *Bifidobacterium* spp: An *in vitro* comparison to commercial oligosaccharides and inulin, *Journal of Food Protection*, 65. 214-218.
  
- **LaGange V., Hoppa D., Mupoperi C. (1991)**. US food industry is “sweet” on honey. *American Bee Journal* (1991), 131 (7): 447-458.
  
- **Lavie P. (1968)**. Les substances antibactériennes dans la colonie d'abeille. Thèse Sci. Nat., Paris. 190p, *In : Ann. Abeille*, 3(2), 103-305.
  
- **Lefief-Delcourt A. (2010)**. Le miel malin. Paris, Leduc .s, 2010, 176 p.
  
- **Leveau, J-Y. et Bouix, M., 1993**. Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Tec et Doc Lavoisier, Paris, France pp 375-388.
  
- **Logiciel systat 7:S.P.S.S. Inc., 1997**. SYSTAT 7 for Windows, statistics and graphics.
  
- **Louveaux J. (1968)**. Composition, propriétés et technologie du miel pp 276-324 in *Traité de biologie de l'abeille*. Tome3, les produits de la ruche.
  
- **Louveaux J. (1985)** - Les abeilles et leurs élevages. Ed. Hachette. Paris. 340 p.
  
- **Le conte Y. (2002)**. La vie sociale de la colonie. In *Le traité rustica de l'apiculture*. Paris, Rustica, 2002, p. 54-83.
  
- **Lequet L. (2010)**. Du nectar a un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques a l'intention de l'apiculteur amateur. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur Vétérinaire, école nationale vétérinaire de Lyon.194 p.
  
- **Mahaut M., Jeaut R., Brule G., Schuck P. (2000)**. Les produits industriels laitiers. Technique et documentation, Lavoisier, Pris: 178p.
  
- **Marceau J, Noreau J et Houle E, (1994)**. Les HMF et la qualité du miel. *L'abeille* volume 15 numéros 2. Fédération des Apiculteurs du Québec. 10p.
  
- **Matsukii T., Tanaka R., Fukuda M. (1999)**. Distribution of *Bifidobacteria* species in human intestinal microflora. *APPL microbial*. 4503-4512.

- **Megherbi M. (2006)**. Analyse des polysaccharides dans les miels en vue du contrôle de leur qualité [poster en ligne] Adresse URL :<http://www.sca.cnrs.fr/sca/rub/recherche/posters /mmegherbi%20.pdf>
- **Marchenay P. et Berard L. (2007)**. L'homme, l'abeille et le miel. Editions De Borée, Romagnant, 224 p.
- **Nagai T., Inoue R, Kanamori, N. Suzuki, T. Nagashima (2006)**. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat, Food Chemistry, 97. 256-262.
- **Odile G. M., 2009**. Propriétés immunostimulantes du genre Bifidobacterium. Pp 570.
- **Orla-Jensen S., 1924**. La classification des bactéries lactiques. Lait 4, 468-474, CopenHagen.
- **Ouadghiri M., 2009**. Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « Lben » et « Jben » d'origine marocaine. Thèse de doctorat Université Mohammed V. Rabat. Maroc.
- **Pham-Délégue M.-H. (1999)**. Les abeilles. Genève, Minerva, 1999, 206 p.
- **Prost F. (1987)**. *Le miel ; composition, propriétés, conservation*. INRA station expérimentale d'apiculture. Pp : 1-18.
- **Rey M. (2012)**. La disparition des abeilles (Colony Collapsus Disorder) Etat des lieux, analyse des causes et des conséquences. Des abeilles et des hommes, une lune de miel en péril. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Victor Segalen – Bordeaux 2.
- **Riazi A. et Ziar H. (2010)**. Croissance et viabilité des Bifidobactéries dans le lait écrémé additionné de miel d'abeille. Département de Biotechnologie, Université Abdelhamid Ibn Badis BP 300, Mostaganem. Algérie.
- **Rossant A. (2011)**. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges. France.
- **Romond C., 1987**. Application des bifidobactéries dans les industries agro-alimentaires annals du colloque biocatalyseurs et IAA: 121-131 pp Paris France.
- **Sancho M.T., Muniategui S., Huidobro J.F., Simal J. (1991)**. Correlation between the electrical conductivity of honey in humid and in dry matter. Apidologie, 22, (3), 221-227.

- **Schramm et al., 2003.** Botulisme et Miel. L'Abeille de France, 910, 18-20pp.
- **Schwetzer S. (2001).** Caractérisation des principaux miels des régions du Nord de l'Algérie, Cah Agric, vol. 19 N° 6, 432-438 pp.
- **Tamime A.Y., Marshall V.M.E. et Robinson R.K. (1995).** "Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria". *J. Dairy Res.* 62, pp. 151 – 187.
- **Tamura S. (1983).** Neutriology of Bifidobacteria micro-flora: 3-16 pp.
- **Terrab A, Diez MJ, Heredia FJ. (2003).** Palynological, physicochemical and colour characterization of Moroccan honeys. Orange (Citrus sp.) honey. *Int J Food Sci Technol* ; 38 : 383-7.
- Toullec A. (2008).** Abeille noire, *Apis mellifera* historique et sauvegarde. Thèse de doctorat. École nationale vétérinaire d'Alfort. France.
- **Tomczak C. (2010).** Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Revue bibliographique. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.
- **VIERLING E., (1999)** - Aliments et boissons filières et produits, science des aliments série dirigée par Guy Leyrao : 270p.
- **Ustunol Z., et Gandhi H. (2001).** Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in honey-sweetened skim milk, *Journal of Food Protection*, 64(11): 1775-1779.
- **Watterlot, L., 2010.** Analyse des effets de souches probiotiques anti-inflammatoires. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). France (48,7Ko).
- **White J.W, Subers M.H et Scepartz A.L, (1962).** The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta*, (73), 57-70 pp.
- **White J.W. (1979).** Spectrophotometric method for Hydroxymethylfurfural in honey, *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 62, 509p.
- **Yaechima T. (1996).** Benefits of Bifidobacteria to human health. *International dairy federation*: 313 pp.
- **Zourari A. et Desmazeaud M.J. (1991).** "Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées des yaourts artisanaux grecs-II Souche de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* en culture mixte avec *Streptococcus salivarius* susp *thermophilus*". *Lait*, 71, 4, pp. 463 – 482.

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : généralités sur l'abeille</b>	
I. Historique .....	3
II. L'abeille ( <i>Apis mellifera</i> ) dans la classification systématique .....	3
III. Morphologie .....	4
III.1. La tête .....	4
III.2. Le thorax .....	4
III.3. L'abdomen .....	4
IV. Anatomie interne de l'abeille <i>Apis mellifera</i> .....	5
IV.1. Le système circulatoire .....	5
IV.2. Le système nerveux .....	5
IV.3. Le système respiratoire .....	5
IV.4. Le système digestif .....	5
V. La vie sociale de la colonie d'abeilles <i>Apis mellifera</i> .....	7
V.1. La reine ou mère .....	7
V.2. Le mâle .....	8
V.3. L'ouvrière .....	9
VI. Durée de vie des abeilles .....	10
VII. L'importance des abeilles .....	10
VII.1. Rôle biologique (la pollinisation) .....	10
VII.2. Rôle économique .....	11
<b>Chapitre II : Le miel</b>	
I. Généralités sur le miel .....	12
I.1. Définition .....	12
I.2. L'origine de miel .....	12
I.2.1. A partir du nectar .....	13
I.2.2. A partir du miellat .....	15
II. Composition chimique moyenne du miel .....	15
II.1. Les éléments majeurs .....	15
II.2. Les éléments mineurs .....	16
III. Les propriétés du miel .....	19
III.1. Propriétés physico-chimiques .....	19
III.1.1. La Densité .....	19
III.1.2. La Viscosité .....	20
III.1.3. La Conductibilité thermique .....	20
III.1.4. La Conductibilité électrique .....	20
III.1.5. L'indice de réfraction .....	20
III.1.6. Le pH .....	21
III.1.7. La coloration .....	21
III.1.8. La turbidité .....	21
III.1.9. La solubilité .....	21
III.1.10. La Cristallisation .....	21
III.1.11. La fermentation .....	22

III.2. Propriétés organoleptiques .....	22
III.2.1. La couleur .....	22
III.2.2. L'odeurs .....	22
III.2.3. Les goûts .....	23
III.3. Propriétés biologiques .....	23
III.3.1. Propriété nutritionnelle .....	23
III.3.2. Propriété anti-bactérienne .....	23
III.3.3. Propriété anti oxydante .....	24
III.3.4. Propriétés thérapeutiques du miel .....	24
IV. Production du miel .....	26
IV.1. Dans le monde .....	26
IV.2. En Algérie .....	26
V. Technologie du miel .....	27
V.1. La récolte du miel .....	27
V.1.1. La récolte des hausses .....	28
V.1.2. La désoperculation et l'extraction du miel .....	28
V.1.3. Filtration .....	29
V.1.4. La maturation de miel .....	29
V.1.5. Conditionnement de miel .....	30
V.1.6. Pasteurisation de miel .....	30
V.1.7. Emballage et étiquetage .....	31
VI. Actions frauduleuses .....	31
VI.1. Fraudes par adultération .....	31
VI.2. Fraudes par non-conformité .....	32
VI.3. Fraudes par contamination .....	32
<b>Chapitre III : Les bifidobactéries</b>	
I. Découverte et historique .....	33
II. Taxonomie .....	33
III. Morphologie .....	33
IV. Ecologie .....	34
V. Physiologie .....	35
V.1. Croissance bactérienne .....	35
V.1.1. Sensibilité à l'oxygène .....	35
V.1.2. pH/Température .....	36
V.2. Les exigences nutritionnelles des bifidobactéries .....	36
V.2.1. Besoins en acides aminés .....	36
V.2.2. Besoins en ions .....	36
V.2.3. Besoins vitaminiques .....	36
V.3. Métabolisme des sucres .....	37
V.3.1. Glucose .....	37
V.3.2. Galactose .....	37
VI. Intérêts des bifidobactéries .....	37
VI.1. Intérêt prophylactiques et thérapeutiques .....	37
VI.1.1 Maintient à l'équilibre de la flore intestinale .....	37
VI.1.2. Prévention des infections entériques .....	37
VI.2. Effet hypocholestérolémiant .....	38
VI.3. Effet anti-carcinogène.....	38
VI.4. Intérêt sur l'absorption minérale .....	38
VI.5. Intérêt nutritionnels .....	38

## Chapitre IV : Matériel et méthodes

I. Matériel .....	40
I.1. Matériel biologique .....	40
I.2. Matériel non biologique .....	40
II. Méthodes .....	40
II.1. Echantillonnage .....	40
II.1.1. Le miel .....	41
II.1.2. Les Souches microbiennes utilisées .....	41
II.1.3. Les abeilles ( <i>Apis mellifera</i> ) .....	41
II.1.4. Les bifidobactéries .....	41
II.1.5. La poudre de lait .....	41
II.2. Le plan expérimental .....	42
II.3. Analyses physico-chimiques .....	42
II.3.1. Détermination du pH et de l'acidité libre .....	43
II.3.2. Détermination de la teneur en eau .....	44
II.3.3. Détermination de la conductivité électrique .....	44
II.3.4. Détermination de la couleur .....	42
II.3.5. Détermination de la densité .....	45
II.3.6. Détermination de l'absorbance .....	45
II.3.7. Détermination de la teneur en Hydroxymethylfurfural .....	45
II.3.8. Détermination de la teneur en cendres .....	47
II.4. Analyses microbiologiques .....	47
II.4.1. Préparation des suspensions mères et des dilutions décimales .....	48
II.4.2. Recherche et dénombrement des GAMT .....	49
II.4.3. Recherche et dénombrement des coliformes .....	49
II.4.4. Recherche des levures et des moisissures ... ..	50
II.4.5. Dénombrement des spores d'anaérobies sulfitoréducteurs .....	51
II.5. Mise en évidence l'effet antimicrobien du miel .....	53
II.5.1. Préparation des dilutions .....	52
II.5.2. Préparation des suspensions microbiennes .....	53
II.5.3. Méthode de diffusion sur gélose .....	54
II.6. Isolement de bifidobactéries à partir du tube digestif de l'abeille .....	56
II.6.1. Contrôle de pureté de la souche bifidobactéries .....	58
II.6.2. Identification biochimique de la souche bifide .....	59
II.6.3. Conservation de la souche bifide .....	60
II.7. Suivi de l'acidification et de la croissance de <i>Bifidobacterium</i> sp .....	61
II.7.1. Calculs des variations de pH, des vitesses d'acidification du temps de génération (G) et du taux de croissance ( $\mu$ ) .....	62
III. Les analyses statistiques .....	63

## Chapitre V : Résultats et discussions

I. Résultats des analyses physico-chimiques .....	64
I.1. Le pH .....	64
I.2. L'acidité .....	65
I.3. La teneur en eau .....	65
I.4. La conductivité électrique .....	66
I.5. La couleur .....	67
I.6. La densité .....	68
I.7. L'absorbance .....	69



I.8. L' Hydroxymethylfurfural (HMF) .....	70
I.9. La teneur en cendres .....	71
II. Résultats des analyses microbiologiques .....	72
III. Résultat de l'effet anti-microbien .....	73
III.1. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard d' <i>Escherichia coli</i> .....	74
III.2. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de <i>Bacillus</i> sp .....	75
III.3. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de <i>P. aeruginosa</i> .....	76
III.4. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de <i>S. aureus</i> .....	77
III.5. Etude de l'activité antimicrobienne à l'égard de <i>S. epidermidis</i> .....	78
IV. Résultat de l'isolement de <i>Bifidobacterium</i> .....	80
IV.1. Caractères biochimiques .....	80
IV.2. La forme .....	80
V. Résultats de l'évolution du pH dans les deux types de lait.....	81
VI. Résultats de l'évolution de la flore bifide .....	83
VII. Résultats des analyses statistiques .....	85
VII.1. Analyse de la variance de pH en fonction de temps et de la nature du lait .....	85
VII.2. Analyse statistique de variation de LogUFC en fonction de temps et type de lait .....	86
<b>Conclusion</b> .....	87
<b>Références bibliographiques</b> .....	90
<b>Tables des matières</b> .....	96
<b>Annexes</b> .....	100

# **Annexes**

**ANNEXE I :**

Table de CHATAWAY (1935).

Table de CHATAWAY (1935)					
Indice de réfraction (20°C)	Teneur en eau (%)	Indice de réfraction (20°C)	Teneur en eau (%)	Indice de réfraction (20°C)	Teneur en eau (%)
1.5044	13.0	1.4935	17.2	1.4835	21.2
1.5038	13.2	1.4930	17.4	1.4830	21.4
1.5033	13.4	1.4925	17.6	1.4825	21.6
1.5028	13.6	1.4920	17.8	1.4820	21.8
1.5023	13.8	1.4915	18.0	1.4815	22.0
1.5018	14.0	1.4910	18.2	1.4810	22.2
1.5012	14.2	1.4905	18,4	1.4805	22.4
1.5007	14.4	1.4900	18.6	1.4800	22.6
1.5002	14.6	1.4895	18.8	1,4795	22.8
1.4997	14.8	1.4890	19.0	1.4790	23.0
1.4992	15.0	1.4885	19.2	1.4785	23.2
1.4987	15,2	1.4880	19.4	1.4780	23.4
1.4982	15.4	1.4875	19.6	1.4775	23.6
1.4976	15.6	1.4870	19.8	1.4770	23.8
1.4971	15.8	1.4865	20.0	1.4765	24.0
1.4966	16.0	1.4860	20.2	1.4760	24.2
1.4961	16.2	1.4855	20.4	1.4755	24.4
1.4956	16.4	1.4850	20.6	1.4750	24.6
1.4951	16.6	1.4845	20.8	1.4745	24.8
1.4946	16.8	1.4840	21.0	1.4740	25.0
1.4940	17.0				

Figure : L'échantillon d'abeilles *Apis mellifera*.



Le rucher qui a fourni les abeilles.



Boite de Pétri contient la cire solidifiée.



Epingles entomologiques.

**Matériels, milieux et réactifs**

<b>A) Appareillages</b>	<b>B) Verrerie et accessoires</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitateur vortex.</li> <li>• Balance de précision</li> <li>• Balance analytique</li> <li>• Centrifugeuse.</li> <li>• Titrimètre.</li> <li>• Etuve.</li> <li>• Autoclave.</li> <li>• Incubateur</li> <li>• Microscope optique.</li> <li>• pH-mètre.</li> <li>• Réfrigérateur.</li> <li>• Réfractomètre.</li> <li>• Spectrophotomètre UV- visible.</li> <li>• Densitomètre.</li> <li>• <i>Pfund Color</i></li> <li>• Loupe binoculaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anse de platine.</li> <li>• Bécher.</li> <li>• Bec bunsen.</li> <li>• Boîtes de Pétri.</li> <li>• Burette.</li> <li>• Ciseaux, Pincés</li> <li>• Creuset en platine.</li> <li>• Ecouvillons stériles à usage unique.</li> <li>• Entonnoir et Erlenmeyer.</li> <li>• Filtres de 22µm.</li> <li>• Fiole conique et Fiole jaugée.</li> <li>• Pipettes graduées et Pipettes pasteur.</li> <li>• Seringues stériles.</li> <li>• Lames et lamelles.</li> <li>• Epingles entomologiques.</li> </ul>

**C) Réactifs, solutions**

- Hydroxyde de sodium (NaOH).
- Potassium Hexacyanoferrate II.
- Acétate de zinc.
- Bisulfite de sodium
- Alcool 95°.
- Eau distillée.
- Formaldéhyde
- Fushine.
- Huile d'immersion.
- Lugol.
- Violet de Gentiane.

**Compositions des milieux de culture**❖ **Milieu gélosé glucosé à l'oxytétracycline (OGA)**

- Extrait de levure ..... 5 g
- Glucose .....10 g
- Agar.....18 g

- Eau distillée.....1000 ml
- pH = 6,8

❖ **Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL)**

- Extrait de levures..... 3 g
- Peptone de viande.....7 g
- désoxycholate de sodium .....1,44 g
- Lactose..... 10 g
- Sels biliaires.....2g
- NaCl.....5 g
- Rouge neutre .....30 mg
- Cristal violet .....2 mg
- Gélose.....11g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1000 ml
- pH = 7,4.

❖ **Milieu Plate Count Agar (PCA)**

- Tryptone.....5,0g
- Extrait de levure .....2,5g
- Glucose .....1g
- Agar agar .....18 g
- Eau distillée.....1000 ml
- pH = 7,0 ± 0,2.

❖ **Milieu viande foie (VF)**

- Base viande foie ..... 30g
- Glucose.....2g
- Amidon.....2g
- Agar-agar.....6g
- Eau distillée.....1000 ml
- pH= 7,4 à 7,6.

❖ **Milieus MRS**

- Peptone .....10g
- Extrait de viande ..... 10g
- Glucose .....5g
- Extrait de levure.....5g
- Phosphate dipotassique .....2g
- Tween 80 .....1ml
- Acétate de sodium .....5g
- Citrate triamonique .....2g
- Sulfate de Mg .....0,2g
- Sulfate de Mn .....0,05g

- H2O distillée .....1000ml
- p..... 6,5

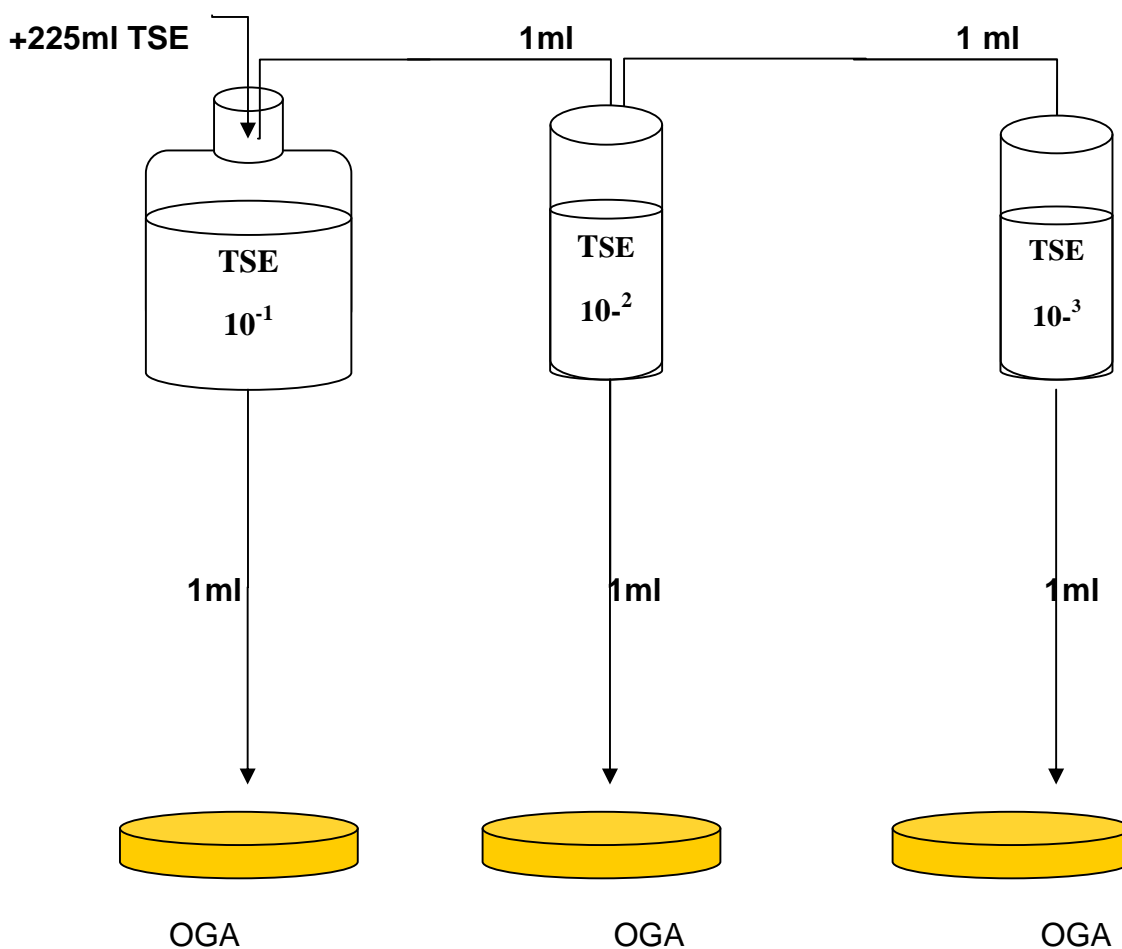
❖ **TSE (Tryptophane-sel-eau)**

- Tryptone ..... 1g
- Chlorure de sodium..... 8,5g
- Eau distillée ..... 100g
- pH=.....7,2

❖ **Gélose Columbia:**

- Peptone..... 23g
- Amidon..... 1g
- Chlorure de sodium..... 5g
- Agar ..... 10g
- Sang ..... 50g
- pH= 7,3.

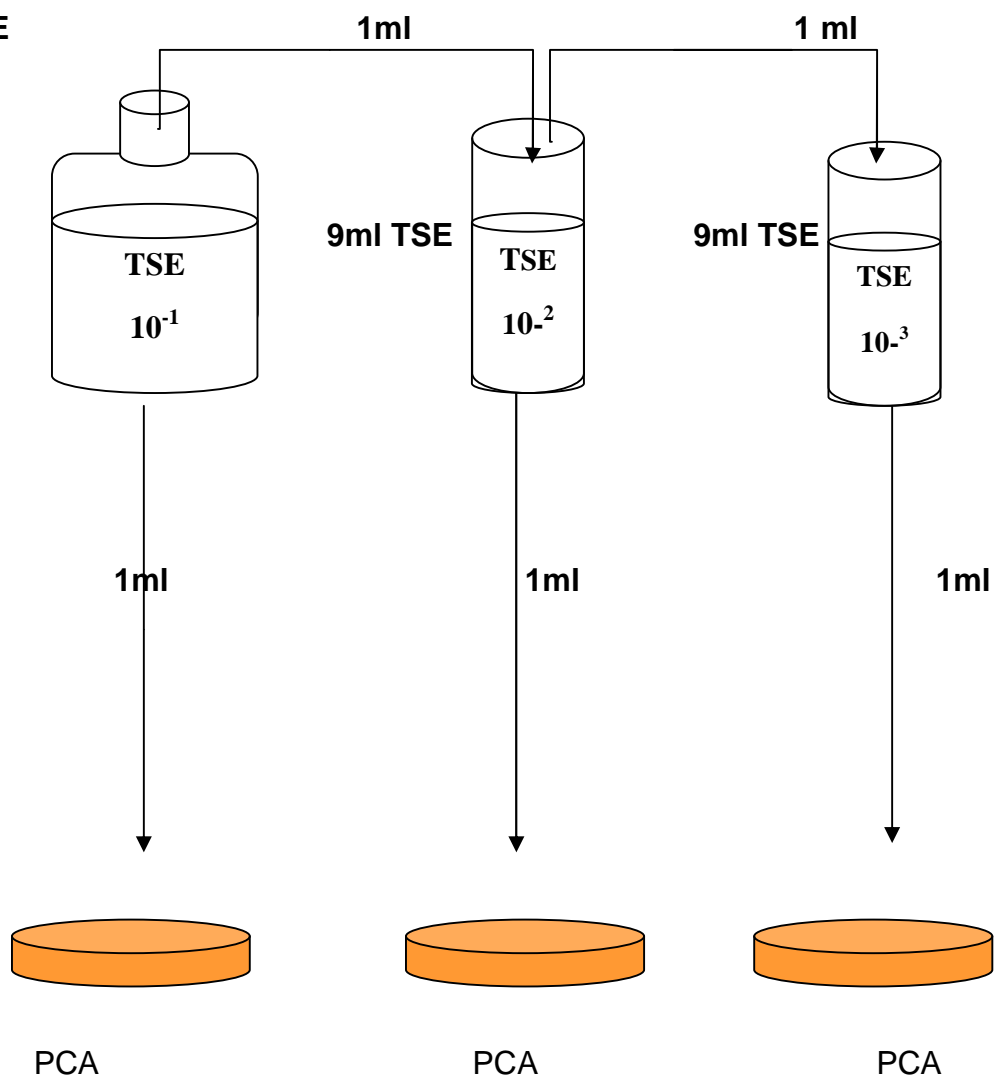
**25g d'échantillon**



**Figure:** Recherche et dénombrements des levures et moisissures.

25g d'échantillon

+225ml TSE



**Figure** : Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles.



25g d'échantillon

+225ml TSE

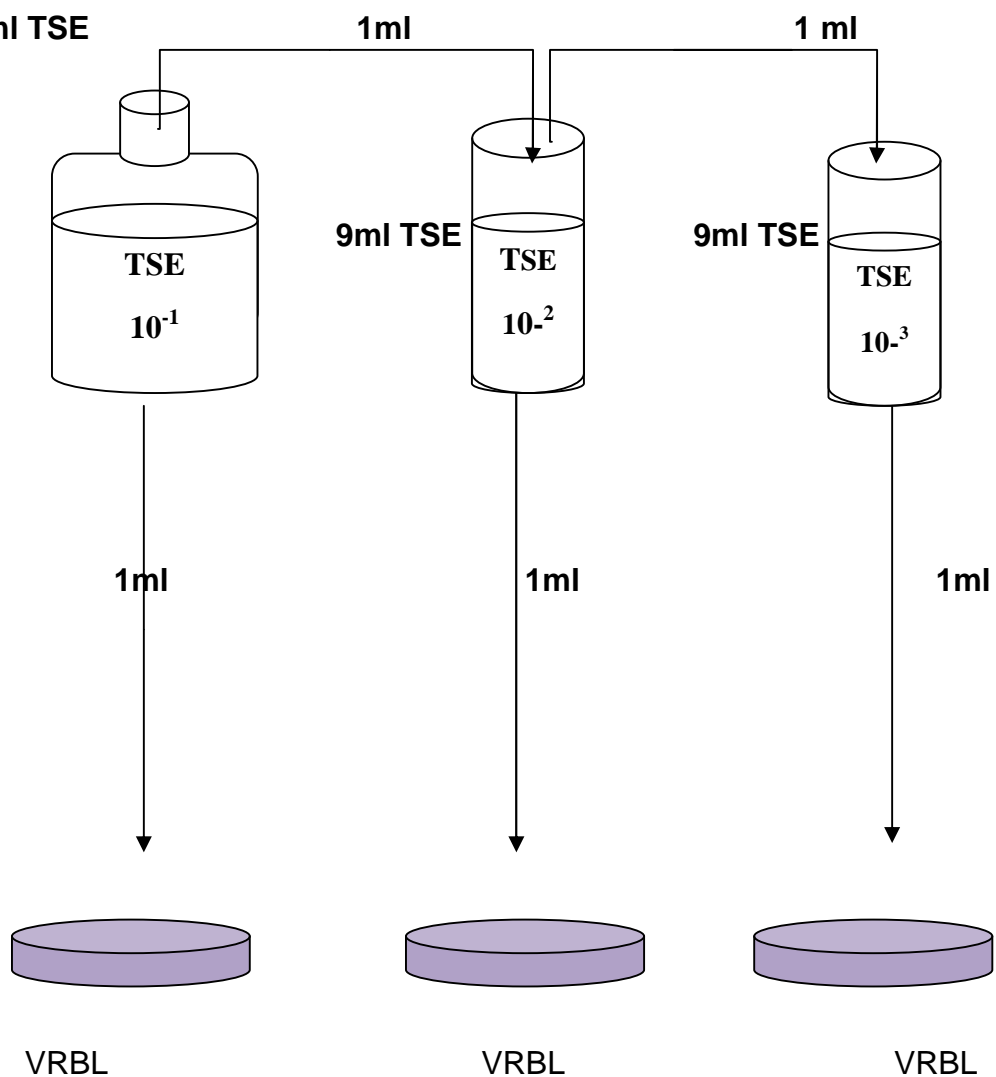


Figure : Recherche et dénombrement des coliformes.

**Annexe II :****Tableau. IX :** Résultat du pH des miels étudiés.

Types de miel	Le pH
Agrumes	$3,65 \pm 0,005$
Multi-fleurs	$4,40 \pm 0,005$
Eucalyptus	$4,85 \pm 0,005$
Jujubier	$3,75 \pm 0,005$
Montagne	$4,72 \pm 0,005$

**Tableau X :** Résultat de l'acidité des miels étudiés.

Types de miel	L'acidité (meq/kg)
Agrumes	32
Multi-fleurs	25
Eucalyptus	15
Jujubier	20
Montagne	22

**Tableau XI :** Résultat de la teneur en eau des miels étudiés.

Types de miel	Teneur en eau (%)
Agrumes	17
Multi-fleurs	16,6
Eucalyptus	18,4
Jujubier	14,4
Montagne	16,2

**Tableau XII :** Résultat de la conductivité électrique des miels étudiés.

Types de miel	La conductivité électrique mS/cm
Agrumes	91
Multi-fleurs	92
Eucalyptus	173
Jujubier	283
Montagne	195

**Tableau. XIII:** Résultat de la couleur des miels étudiés.

Types de miel	La couleur (cm Pfund)
Agrumes	1,1
Multi-fleurs	3,5
Eucalyptus	9,2
Jujubier	6,2
Montagne	7,1

**Tableau XIV** : Résultat de la densité des miels étudiés.

Types de miel	La densité
Agrumes	1,4545
Multi-fleurs	1,4186
Eucalyptus	1,4269
Jujubier	1,4457
Montagne	1,4099

**Tableau XV** : Résultat de l'absorbance des miels étudiés.

Types de miel	L'absorbance
Agrumes	0,038
Multi-fleurs	0,032
Eucalyptus	0,085
Jujubier	0,056
Montagne	0,064

**Tableau XVI**: Résultat de la teneur en HMF des miels étudiés.

Types de miel	HMF (mg/kg)
Agrumes	8,23
Multi-fleurs	13,77
Eucalyptus	40,41
Jujubier	0
Montagne	15,41

**Tableau. XVII**: Résultat de la teneur en cendres des miels étudiés.

Types de miel	Matière minérale %
Agrumes	0,017
Multi-fleurs	0,048
Eucalyptus	0,19
Jujubier	0,14
Montagne	0,11

**Tableau XXV** : Résultat de l'évolution du pH dans les deux types de lait.

Temps	Lait écrémé seul	Lait additionné de miel
T <sub>0</sub>	6,55 ± 0,02	6,32 ± 0,01
T <sub>2</sub>	5,33 ± 0,02	5,19 ± 0,03
T <sub>4</sub>	4,86 ± 0,01	4,67 ± 0,02
T <sub>6</sub>	4,56 ± 0,03	4,44 ± 0,03
T <sub>8</sub>	4,41 ± 0,01	4,24 ± 0,02
T <sub>24</sub>	4,25 ± 0,03	4,08 ± 0,01

**Tableau XXVII** : Résultat de l'évolution de la flore bifide dans les deux types de lait.

Temps/LogUFC	Lait écrémé seul	Lait additionné de miel
T <sub>0</sub>	7,563481085	7,540329475
T <sub>2</sub>	8,696006715	8,750739751
T <sub>4</sub>	8,903089987	9
T <sub>6</sub>	8,988246723	9,0791812446
T <sub>8</sub>	8,991226076	9,086359831
T <sub>24</sub>	8,964212473	9,076713245