

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Mouloud Mammeri
Faculté de Médecine
Tizi Ouzou

Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة مولود معمري

كلية الطب

تيزي وزو

قسم الصيدلة

ⵜⴰⵎⴰⵎⵓⵔⵉⵜ ⵜⴰⵎⴰⵎⵓⵔⵉⵜ
ⵜⴰⵎⴰⵎⵓⵔⵉⵜ

Mémoire de fin d'études

N° d'ordre : /FM/DP/2020

Présentée et soutenue publiquement le :
15 Juillet 2020

En vue de l'obtention du diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Etude physico-chimique et pharmaco-toxicologique
des effets du miel et du pollen

Réalisée par :

KAOU DJI Younes

NEHLIL Malek

SADADOU Amina

Encadrés par :

Pr. CHADER Henni

Dr. BELKAID Nawal

Composition du Jury :

Pr. MAMOU Marzouk	MCA	Faculté de Médecine	UMMTO	Président
Pr. CHADER Henni	MCA	Faculté de Médecine	Alger	Promoteur
Dr. BELKAID Nawal	MAHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Co-promotrice
Dr. TAZEKRITT Saliha	AHU	Faculté de Médecine	UMMTO	Examinatrice

Remerciements

A notre promoteur, Pr. H. Chader qui a accepté d'encadrer et d'initier ce travail pour une première fois à l'université de Tizi Ouzou et qui nous a accueilli et pris en charge dans son service. Nous vous remercions de nous avoir fait confiance dans la gestion de ce travail avec une certaine autonomie tout en inculquant en nous un esprit de chercheur afin de nous surpasser dans tout ce qu'on on a entrepris. On vous manifeste toute notre reconnaissance et notre profonde gratitude.

A notre co-promotrice Dr. N. Belkaid, qui nous a accompagné durant toute la période de notre étude en mettant à notre disposition tous les moyens nécessaires pour assurer le bon déroulement des travaux, merci de nous avoir guidé et orienté, d'avoir toujours été à notre écoute.

Au Pr. M. Mamou, merci d'avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation d'une partie de notre travail et de présider, aujourd'hui notre jury de soutenance. Nous vous remercions surtout de nous avoir accueilli, accompagné et chaperonné tout au long de nos 6 années d'études au niveau du département de pharmacie.

Aux membres de jury, merci pour le temps que vous avez accordé à la lecture et l'évaluation de ce travail.

Merci à tout le personnel du laboratoire de Chimie analytique du département de pharmacie de Tizi Ouzou pour leur aide et en particulier aux résidents dont le Dr. H. Abdenouri qui a su se montrer disponible et nous guider tout au long de notre travail.

Au Dr. S. Iboukhoulaf et au personnel du laboratoire d'hydrobromatologie, merci d'avoir accepté de nous accueillir et de nous encadrer dans la réalisation du contrôle qualité du miel.

A tout le personnel du laboratoire de contrôle qualité microbiologique et de physico-chimie de Biotic-Saidal et plus particulièrement à Mme. Chader, merci pour votre accueil, votre aide et votre disponibilité dans la réalisation de nos travaux d'évaluation microbiologique. Vous nous avez accordé toute votre confiance et nous espérons avoir été à la hauteur de celle-ci.

Aux résidents en pharmacologie et à tout le personnel de l'unité de pharmacotoxicologie du LNCPP, merci de nous avoir accueilli, formé et guidé tout au long de la réalisation de ce travail. Un remerciement particulier au Dr. H. Benouattas pour sa disponibilité, sa bonne humeur, ses conseils et son aide précieuse.

Au Dr. A. Bourahmoun et toute son équipe, merci pour toute l'aide et les encouragements que vous nous avez apporté.

Enfin, à toute personne ayant contribué directement et indirectement à la réalisation de ce modeste travail, ainsi que tous ceux qui nous ont accompagné durant tout notre cursus universitaire, vous avez toute notre gratitude.

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie Dieu, le tout puissant, qui m'a aidé et permis de suivre ce parcours universitaire qui m'a ouvert les portes vers mon avenir.

A ma chère maman, celle qui m'a donné la vie, m'a élevé, qui a tout sacrifié pour que j'ai la chance d'arriver là où je suis. Celle qui a toujours été présente pour moi, qui m'a toujours soutenu et qui m'a toujours poussé vers la réussite. Aucun mot ne pourrait exprimer tous les sentiments que je te porte.

A mon cher papa, qui est mon exemple dans la vie, celui qui n'a ménagé aucun effort dans mon éducation, qui m'a toujours appris et inculqué le vrai sens du travail et des responsabilités, tu as travaillé toute ta vie pour pouvoir nous assurer le meilleur avenir que nous puissions avoir. Aucune dédicace ne pourrait exprimer toute la considération et respect que j'ai pour toi.

A ma grand-mère Yamina, ma deuxième maman, celle qui m'a élevé aux cotés de mes parents, qui m'a dorloté et forgé, tu es un symbole de mon enfance et j'aurais tellement aimé que tu sois présente pour me voir franchir ce cap.

Mon oncle Smaïl, le meilleur oncle du monde et mon deuxième père, mon éducation n'aurait jamais pu être complète sans ta présence dans ma vie, merci pour toute la générosité dont tu fais part, d'avoir toujours œuvré à m'encourager et à aller de l'avant.

A ma petite sœur Yasmine, tu es le petit soleil de la maison, le meilleur cadeau de la famille, j'espère être un exemple pour toi et être à la hauteur dans ma contribution à ton éducation.

A mon petit frère Lamine, merci pour tout ce que tu es, j'espère avoir été un frère à la hauteur, je te souhaite tout le bonheur et la réussite dans tout ce que tu entreprends.

Vous êtes tout ce dont j'ai de plus cher dans ce monde et j'espère vous avoir rendu à travers ce modeste travail une partie du bonheur et de fierté que vous m'aviez toujours apporté. Puisse Dieu vous garder pour moi.

A mes trois meilleures amies,

Narymane, tu as été la première que j'ai connue, je me souviens encore de notre table du lycée, tu as toujours été là pour moi et on a tant traversé. Reste ce que tu es tout en gardant toujours en toi cette âme d'enfant. Aussi exceptionnelle que sois-tu, je te souhaite de réaliser tes plus grands rêves.

Ryma, ma grande sœur, tu as aussi su m'accompagner depuis le lycée, mature et sage, tes conseils m'ont toujours permis de garder le cap et d'aller de l'avant. Aussi imprévisible que tu puisses être, tu restes l'amie qui a toujours su placer les bons mots à chaque fois qu'il le fallait, je te souhaite beaucoup de succès dans ta vie.

Yasmine, ton intégration au groupe à la fac n'a fait que renforcer les liens qui nous unissent, tu as toujours su trouver les mots à chaque situation, ton humour, ton expression et ta franchise font de toi une personne formidable, j'attends une dédicace en retour le jour où tu seras célèbre.

Vous êtes toutes les trois mes confidentes, les sœurs que je n'ai jamais eues, merci de m'avoir accompagné durant toute ces années, d'avoir toujours été là à mes côtés, merci pour les aventures, les fous rires, les sorties et toutes ces journées passées avec vous. Merci pour ces moments de bonheur, de joie et de souffrance et de déprime parfois, ces souvenirs seront gravés à jamais dans ma mémoire et j'espère vous avoir toujours dans ma vie, votre présence est indispensable ; Je vous souhaite plein de réussite et d'épanouissement dans vos vies respectives.

A tous mes amis, Nadir, Rezak, Malik, Ghiles A, Aghiles, Ghiles L, Slimane, Boussad, Mina, Dyhia, Kenza et Selma, merci pour tout ce que vous êtes et d'avoir toujours été là pour moi.

A toute l'équipe, Ghiles, Redouane, Massil et Nassim, mes frères d'armes, pour tous les moments que nous avons traversés.

A tous mes autres amis dont je n'ai pas cité le nom, car je ne pourrais tous les citer, ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin tout au long de ma vie et de mon parcours durant ces 25 années.

A l'association ASEPT Pharmavenir, celle auprès de laquelle j'ai passé une majeure partie de mon cursus, qui m'a tant donné et à qui je ne rendrais jamais assez, celle qui a été une deuxième famille pour moi, à toutes les personnes que j'ai pu connaître en son sein.

A mes binômes, Mina et Malek, merci pour toutes ces années de fac, tous les moments passés et partagés depuis la 1^{ère} année, merci d'avoir accompli ce travail avec moi, ce fut un long périple, mais la route en valait la peine, merci pour tous vos efforts, votre soutien, votre persévérance, votre implication et votre sérieux. Sans vous, ce travail n'aura pas pu voir la lumière du jour.

A toi, cette personne encore inconnue.

A tous mes oncles, tantes, cousins, mes grands-pères que je n'ai pas connus et tous les membres de ma famille.

Ainsi qu'à tous mes camarades et collègues pharmaciens que j'ai connu de près ou de loin.

Younes KAOUJJI

Dédicaces

A mes parents, grâce à qui je suis devenu la personne que je suis actuellement et envers qui je ne me suis pas toujours montré assez reconnaissant.

A mes frères sur qui j'ai pu et pourrai compter dans le futur, puissions-nous rester unis et solidaires.

A ma grand-mère qui a toujours été fière de ses petits-enfants et n'a jamais manqué une occasion de les encourager à accomplir de grandes choses.

A la mémoire de mon grand-père qui a toujours fait de l'éducation de ses enfants la première de ses priorités et dont les principes, la droiture et l'honneur ont toujours inspiré le respect. Puisse-t-il être fier de ce travail.

A mes binômes, Younes et Mina sans qui rien n'aurait été possible. Ces 6 années avec vous auront été ponctuées de rire, de joie, d'émotion mais surtout de grands accomplissements qui, sans vous, n'auraient jamais vu le jour. Ma modeste contribution à ce travail ne saurait exprimer toute la gratitude que je porte à vous qui aurez eu à me supporter plus que quiconque.

Au Dr. M. A. Akli qui aura été un modèle à suivre, un homme de principes, un pharmacien de grande compétence et une personne qui aura toujours été présente, n'aura jamais refusé d'aider quiconque et qui mérite gratitude et reconnaissance. Quiconque accomplira ce que tu as accompli dans la vie ne verra que motifs de satisfaction et j'espère un jour être à ta hauteur dans tous les domaines, mis à part l'âge.

A tous ceux dont je ne citerai pas le nom car en citer un m'en ferait oublier dix, à ceux qui m'ont accompagné durant ces 24 dernières années pendant plus ou moins de temps, à mes amis d'enfance que je n'aurai certainement plus l'occasion de revoir, à ceux avec qui j'aurai expérimenté la vie, à ceux qui m'ont aidé à me construire et arriver à maturité, à ceux vers qui je me suis tourné dans les moments difficiles et qui m'ont apporté support et conseil, à ceux avec qui j'ai partagé ces 6 dernières années, ceux que j'ai eu du mal à quitter ou ceux que j'aurais aimé apprendre à connaître, ceux qui m'ont appris ou ceux à qui j'ai transmis, ceux avec qui je me serais amusé ou ceux avec qui j'aurais travaillé, ceux qui m'auront aimé ou ceux qui m'ont détesté. Vous m'avez tous marqué d'une manière que je n'exprimerai probablement jamais et chacun de vous aura participé à façonner celui qui, aujourd'hui, n'a pas les mots pour vous remercier.

Enfin, à celle qui m'a tout appris, qui a toujours été ma seconde famille et souvent la première, qui m'a montré que l'Université était faite pour bien plus de choses qu'étudier, les 6 années que je lui aurai consacré ne suffiront jamais à lui rendre tout ce qu'elle m'a donné, à celle qui m'a fait vivre les plus belles aventures de mon cursus, qui m'a fait rencontrer nombre des personnes que je respecte le plus, qui m'a appris que le plus grand des honneurs était de servir sans se servir. A celle qui m'a formé à la vie quand je n'étais destiné qu'à la pharmacie. Longue vie à l'Association Pharmavenir.

Malek NEHLIL

Dédicaces

Je remercie le dieu tout puissant d'avoir fait que ce jour arrive et de m'avoir offert les personnes très chères à qui je dédie ce modeste travail.

A mes chers parents Mohand et Nadia, qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de me soutenir depuis mon premier jour de vie, votre présence à mes coté est ma source de force, je ne saurai vous remercier assez.

Que ce travail traduise ma gratitude et mon affection envers vous.

A mon petit frère Ali qui est toujours là pour moi, merci pour tout ce que tu es, je te souhaite toute la réussite du monde.

A mes très chères sœurs Nora et Dyhia qui m'accompagnent chaque jour, dans les meilleurs moments comme dans les moins bon, je ne saurai décrire ma vie sans vous à mes côtés.

Au plus adorable des neveux Yanni et à mon beau-frère Mustapha, votre soutien et bienveillance, même à des kilomètres m'est très précieuse.

A mes chères copines : Lilia, Siham, Sylia et le trio d'enfer Mina, Lydia et Kenza merci pour toutes ces années passées à vos côtés, votre aide, votre confiance et surtout votre folie, m'ont beaucoup aidé, que dieu préserve cette amitié.

A toute ma famille, mes oncles, mes tantes, ma grand-mère et tous les cousins et cousines,

A mes deux binômes Younes et Malek, merci pour cette merveilleuse aventure et cette incroyable expérience, Je vous souhaite le meilleur et le succès que vous méritez.

A l'association Pharmavenir, une deuxième famille qui a su nous apprendre des choses et nous réunir.

Je ne pourrai finir sans citer une personne très chère qui me soutient et me pousse à devenir meilleure jour après jour,

A l'homme de ma vie Menad, que ce travail soit un avant-gout de notre future réussite à deux.

Amina SADADOU

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	i
LISTE DES FIGURES	iv
LISTE DES TABLEAUX	v
INTRODUCTION ET OBJECTIFS	1
PARTIE THEORIQUE : REVUE DE LA LITTERATURE	

CHAPITRE I : LES PRODUITS DE LA RUCHE : LE MIEL ET LE POLLEN

1 Le Miel	5
1.1 Définition	5
1.2 Classification	5
1.2.1 Selon La source naturelle	5
1.2.2 Selon l'origine botanique	5
1.3 Récolte et transformation du miel, de la fleur à l'homme	6
1.3.1 Récolte par les abeilles	6
1.3.2 Récolte par l'apiculteur	7
1.4 Composition et propriétés physico-chimiques du miel	8
1.4.1 Caractéristiques organoleptiques	8
1.4.2 Propriétés Physiques	9
1.4.3 Composition chimique	12
1.5 Paramètres de contrôle qualité et normes internationales	16
1.5.1 Qualité d'un miel	16
1.5.2 Facteurs essentiels de composition et de qualité	16
1.5.3 Normes internationales relatives au miel	16
1.6 Histoire de l'emploi du miel en thérapeutique	19
2 Le pollen	20
2.1 Définition	20
2.2 Le pollen : de la fleur à l'homme	20
2.2.1 Pollinisation	20
2.2.2 Vecteurs de la pollinisation	21
2.2.3 Récolte du pollen par l'abeille	22
2.2.4 Récolte du pollen par l'homme	22
2.2.5 Transformation	23
2.2.6 Conditionnement et conservation	23

2.3	Composition chimique	24
2.3.1	Eau	24
2.3.2	Hydrates de carbone	24
2.3.3	Fibres	25
2.3.4	Protéines et acides aminés	25
2.3.5	Lipides	25
2.3.6	Sels minéraux et traces d'éléments	26
2.3.7	Vitamines	26
2.3.8	Composés phénoliques	26
2.3.9	Contaminants	26
2.4	Le pollen à travers l'histoire	27

CHAPITRE II : PRINCIPALES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DU MIEL ET DU POLLEN

1	Activité cicatrisante	29
1.1	Rappel sur la peau	29
1.2	Rappel sur la cicatrisation	30
1.3	Mécanisme d'action cicatrisante du miel	31
2	Activité antimicrobienne	32
2.1	Rappel sur les microorganismes	32
2.2	Rappel sur les infections	33
2.3	Mécanisme d'action antimicrobienne du miel et du pollen	34
3	Autres actions pharmacologiques	34
3.1	Miel	34
3.2	Pollen	35

PARTIE EXPERIMENTALE

1	Type d'étude	38
2	Lieu d'étude	38
3	Echantillonnage	39
3.1	Miel	39
3.2	Pollen	39
4	Matériel et méthodes	41

4.1	Matériel	41
4.1.1	Appareils	41
4.1.2	Verrerie et consommable	43
4.1.3	Réactifs et solutions	45
4.1.4	Animaux	48
4.1.5	Matériel biologique	48
4.2	Méthodes	49
4.2.1	Miel	49
4.2.2	Pollen	73
5	Résultats	81
5.1	Miel	81
5.1.1	Analyse physico-chimique	81
5.1.2	Activité cicatrisante	83
5.1.3	Activité antibactérienne	86
5.1.4	Activité antifongique	92
5.2	Pollen	95
5.2.1	Test de toxicité aigue	95
5.2.2	Apport nutritionnel	96
5.2.3	Extractions et dosage des polyphénols	96
5.2.4	Identification des polyphénols	98
6	Discussion	103
6.1	Miel	103
6.1.1	Analyse physico-chimique	103
6.1.2	Activité cicatrisante	107
6.1.3	Activité antibactérienne	110
6.1.4	Activité antifongique	111
6.2	Pollen	112
6.2.1	Test de toxicité aigue	112
6.2.2	Apport nutritionnel	112
6.2.3	Extractions et dosage des polyphénols	113
6.2.4	Identification des polyphénols	114
	CONCLUSION	116

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : degrés Celsius

AC : Acidité combinée :

AL : Acidité libre

ALAT : Alanine Aminotransférase

ASAT : Aspartate Aminotransférase

AT : Acidité totale

ATC : Correction Automatique de la Température

ATCC : American Type Culture Collection

B° : degré baumé

BBT : Bleu de Bromothymol

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

C : Carbone

Cal : Calorie

CARI : Le centre apicole de recherche et d'information

Cl : Chlore

cm : centimètre

Cu : Cuivre

d : densité

DL50: Dose létale 50

dm : décimètre

DO : densité optique

E : Extrait

EAG : équivalent d'acide galique

EPPI : Eau pour préparation injectable

Fe : Fer

FFP2: Filtering Facepiece Particles

g : gramme

h : heure

H₂O : molécule d'eau

HDL : High density lipoprotein

HMF : Hydroxyméthylfurfural

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IHC : International Honey Commission

IL : Interleukin

K: Potassium

Kg: Kilogramme

LDL: Low density lipoprotein

LNCPP : Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques

M: masse molaire

meq : milliéquivalent

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

Mn : Manganèse

N : normalité

Na : sodium

nm : nanomètre

O : Oxygène

OCDE : Organisation de coopération et de développement économique

OMS : Organisation mondiale de la santé

P : Phosphore

PAL: Phosphatase alcaline

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PGE₂ : prostaglandine E₂

PGI₂ : prostaglandine I₂

Ph : potentiel d'Hydrogène

pHe : potentiel d'Hydrogène équivalent

PP : Polyphénols

R-HPLC : Reverse HPLC (HPLC en phase inverse)

S : Siemens

T+ : Témoin positif

T- : Témoin négatif

TGF : Transforming Growth Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

tr : tour

UE : Union Européenne

UFC : unités formant les colonies

UHPLC : Ultra HPLC

UMMTO : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

UV : Ultra-violet

Veq : Volume équivalent

Zn : Zinc

µm : micromètre

Liste des figures

Figure 1 Refractomètre _____	50
Figure 2 Visualisation des résultats au refractomètre _____	52
Figure 3 Conductimètre _____	54
Figure 4 pHmètre _____	56
Figure 5 Couleurs obtenues lors du titrage _____	57
Figure 6 Protocole d'excision et de traitement des rats _____	67
Figure 7 Zone de travail _____	69
Figure 8 Dilutions de miel préparées _____	70
Figure 9 Suspensions bactériennes préparées _____	70
Figure 10 Milieu de culture ensemencé par méthode de Kirby-Bauer _____	71
Figure 11 Dépôt d'un disque d'antibiotique _____	72
Figure 12 Mesure des diamètres d'inhibition _____	72
Figure 13 Gamme étalon _____	77
Figure 14 Evolution de la surface des plaies des rats des groupes Test et Témoins + et - _____	83
Figure 15 Plaies des rats traités avec du miel et des témoins + et - _____	84
Figure 16 Evolution du taux de cicatrisation des rats des groupes Test et Témoins + et - _____	85
Figure 17 Diamètres obtenus avec l'antibiotique de référence (Primazol®) _____	87
Figure 18 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Bacillus subtilis</i> _____	88
Figure 19 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Escherichia coli</i> _____	88
Figure 20 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	89
Figure 21 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Salmonella sp</i> _____	89
Figure 22 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Staphylococcus aureus</i> _____	90
Figure 23 Diamètres d'inhibition obtenus avec le miel en fonction de la souche bactérienne _____	90
Figure 24 Diamètres d'inhibition du miel comparés à ceux du Primazol® _____	91
Figure 25 Diamètres obtenus avec l'antifongique de référence (Lamidaz®) _____	93
Figure 26 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Aspergillus brasiliensis</i> _____	93
Figure 27 Diamètres obtenus avec le miel sur <i>Candida albicans</i> _____	94
Figure 28 Diamètres d'inhibition du miel comparés au Lamidaz® _____	94
Figure 29 Evolution du poids moyen des 3 souris traitées à 5000 mg/kg _____	95
Figure 30 Evolution du poids moyen des souris des groupes Test et Témoin _____	96
Figure 31 Comparaison des rendements totaux et en polyphénols selon la méthode d'extraction _____	97
Figure 32 Chromatogramme obtenu à partir du mélange de standards _____	98
Figure 33 Chromatogramme obtenu à partir de E1 _____	99
Figure 34 Chromatogramme obtenu à partir de E2 _____	99
Figure 35 Chromatogramme obtenu à partir de E3 _____	100

Liste des tableaux

Tableau I Normes de qualité relatives au miel	17
Tableau II Appareils utilisés	41
Tableau III Verrerie, petit matériel et consommable utilisés	43
Tableau IV Réactifs et solutions utilisés	45
Tableau V Animaux utilisés	48
Tableau VI Matériel biologique utilisé	49
Tableau VII Préparation des solutions de référence et échantillon	65
Tableau VIII Préparation de la gamme étalon	77
Tableau IX Résultats de l'analyse physico-chimique du miel	81
Tableau X P-valeurs obtenues par test de Student sur les surfaces des plaies	83
Tableau XI P-valeurs obtenues par test de Student sur les taux de cicatrisation	85
Tableau XII Diamètres d'inhibition obtenus avec le Primazol [®]	86
Tableau XIII Effet bactéricide ou bactériostatique du miel vis-à-vis des souches testées	91
Tableau XIV Diamètres d'inhibition obtenus avec le Lamidaz [®]	92
Tableau XV Rendement massique et en polyphénols selon la méthode d'extraction	97
Tableau XVI Détails des pics des différents standards	98
Tableau XVII Détails des pics identifiés à partir de E1	99
Tableau XVIII Détails des pics identifiés à partir de E2	100
Tableau XIX Détails des pics identifiés à partir de E3	100

Introduction et objectifs

Introduction

Les produits de la ruche comprennent le miel, le pollen, la gelée royale, la propolis, la cire et le pain d'abeille. Ils ont, depuis toujours, suscité beaucoup d'intérêt grâce à leurs propriétés thérapeutiques et diététiques. De nos jours, l'usage par l'homme de ces produits à des fins médicinales constitue un domaine d'études à part entière qui est l'apithérapie [1].

Parmi ces produits, le miel et le pollen sont les plus étudiés et les plus utilisés.

Ainsi, le miel est depuis des millénaires exploité par l'homme. Il a toujours été apprécié, d'une part pour ses qualités gustatives et d'autre part, pour ses nombreuses vertus thérapeutiques démontrées à plusieurs reprises par des études scientifiques. Ses usages empiriques ont traversé les siècles mais l'avènement de la chimie moderne les a progressivement fait tomber dans l'oubli [2].

Quant au pollen, il représente le produit le plus précieux de la ruche car il constitue l'aliment principal de l'abeille. Il est riche en nutriments et en substances actives et est très énergétique en raison de sa forte teneur en hydrates de carbone et en protéines. Il contient tous les acides aminés essentiels que l'organisme ne peut synthétiser et compense donc parfaitement les insuffisances que nous impose notre alimentation moderne déséquilibrée [3].

Aujourd'hui, de nombreux travaux redécouvrent les bienfaits thérapeutiques du miel et du pollen. Cependant, leur usage reste limité à la médecine traditionnelle et peine à s'imposer comme une alternative crédible auprès du corps médical [4].

C'est dans la perspective d'encourager le recours à l'apithérapie que nous présentons ce travail qui se veut être une étude physico-chimique et pharmaco-toxicologique du miel et du pollen.

Pour ce faire, nous avons organisé notre manuscrit en deux parties :

1. Une revue bibliographique présentant le miel, le pollen et leurs propriétés thérapeutiques
2. Une deuxième partie expérimentale où sont décrites les méthodes utilisées au cours de notre travail ainsi que les résultats obtenus, leur discussion et leur confrontation à des travaux préexistants.

Objectifs

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer les activités cicatrisante et antimicrobienne du miel et l'apport nutritionnel de la supplémentation alimentaire en pollen.

Les objectifs secondaires sont :

- L'analyse et le contrôle physico-chimique du miel ;
- L'évaluation de la toxicité aigüe du pollen ;
- L'optimisation d'une méthode d'extraction des polyphénols du pollen et l'identification de ces derniers.

Revue de la littérature

Chapitre I

LES PRODUITS DE LA RUCHE : LE MIEL ET LE POLLEN

1 Le Miel

1.1 Définition

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes, de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou 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 secrètent elles-mêmes, déposent, déshydratent, emmagasinent et laissent affiner et mûrir dans les rayons de la ruche [5].

1.2 Classification

1.2.1 Selon La source naturelle

1.2.1.1 Miel de nectar

Il s'agit du miel provenant directement des nectars de plantes. Ce dernier est recueilli dans les fleurs au niveau des petites glandes végétales nommées nectarifères. Sa production dépend de l'âge, de la taille, de la position de la fleur, de l'humidité relative de l'air, de la durée de la floraison, du sexe des fleurs, de leur espèce et du milieu environnant [6].

1.2.1.2 Miel de miellat

Il s'agit du miel provenant principalement d'excrétions d'insectes butineurs homoptères (Hemiptera) laissées sur les parties vivantes de plantes ou de sécrétions de parties vivantes de plantes et appelé miellat. Le miellat est un liquide épais et visqueux, plus dense que le nectar, plus riche en azote, en acides organiques, en minéraux et sucres complexes. Il est récolté par les abeilles en complément ou en remplacement du nectar et produit un miel plutôt sombre, moins humide que le miel de nectar [7].

1.2.2 Selon l'origine botanique

1.2.2.1 Miels monofloraux

Les miels dits « monofloraux » sont élaborés à partir d'une seule espèce végétale. Ils sont relativement difficiles à obtenir car pour que les abeilles s'intéressent à une variété en particulier, il faut que sa floraison soit abondante et localisée sur une étendue suffisante. Pour qu'un miel soit considéré comme monofloral, il doit être composé à 80 % d'une même espèce

végétale. Afin d'obtenir ce résultat, les ruches doivent être placées près de l'espèce végétale considérée, au cours de sa floraison, et la récolte doit avoir lieu dès la fin de la miellée.

Toutefois, le butinage n'étant pas une science exacte, seule une analyse en laboratoire peut certifier le caractère monofloral d'un miel [8].

1.2.2 Miels multifloraux

Les miels multifloraux ou polyfloraux, sont, comme leur nom l'indique, issus de plusieurs espèces végétales différentes. Ils sont donc, en règle générale, désignés soit par leur origine géographique (région, massif, etc.) : « Miel de haute montagne » ; soit par un type de paysage floral : « Miel de forêt ».

On trouve également les appellations « Miel toutes fleurs » ou « Miel de printemps », qui se composent, le plus souvent, de colza mélangé à d'autres types floraux [8].

1.3 Récolte et transformation du miel, de la fleur à l'homme

1.3.1 Récolte par les abeilles

Les abeilles butineuses aspirent le nectar des fleurs ou le miellat qu'elles stockent dans leurs jabots. Une fois dans la ruche, les abeilles butineuses transfèrent le nectar prédigéré à des abeilles receveuses. Celles-ci, à tour de rôle, régurgiteront et réingurgiteront ce nectar en le mêlant à de la salive et des sucs digestifs, ce qui complètera le processus de digestion des sucres (trophallaxie). D'individu en individu, la teneur en eau s'abaisse en même temps que le liquide s'enrichit de sécrétions salivaires riches en enzymes [9].

Au fil des échanges entre les abeilles, la composition de la miellée évolue : des sucres se scindent, d'autres s'assemblent afin de former de nouveaux sucres plus complexes. Les ouvrières complètent ainsi la transformation et miel ainsi formé, est ensuite stocké dans des alvéoles où il est déshumidifié par brassage à l'aide de leurs pièces buccales et par ventilation avec les ailes des ouvrières ventileuses qui créent un courant d'air permettant l'évaporation de l'eau jusqu'à ce que le miel atteigne une teneur en eau inférieure à 18 %. Le miel est alors emmagasiné dans d'autres alvéoles, qui, une fois remplies, seront operculées. Ce processus permet à la colonie de disposer d'une réserve d'aliment hautement énergétique, stable, de longue conservation et peu sensible à la fermentation [10].

1.3.2 Récolte par l'apiculteur

La récolte du miel peut se pratiquer dès la fin de la miellée quand les cadres des hausses sont remplis de miel operculé. La période idéale est généralement le mois d'août qui correspond à la fin de la saison de culture [9].

1.3.2.1 Récolte des hausses

Une ruche est divisée en différentes parties : un toit, une hausse, un couvre cadres, un corps et un plancher.

Le corps est la partie inférieure qui contient de hauts cadres dans lesquels les abeilles stockent du miel et du pollen et c'est aussi dans cette section que se trouve le couvain. L'apiculteur ne prélève pas le miel qui y est entreposé ; celui-ci servira de nourriture aux jeunes larves et permettra à la colonie de passer la mauvaise saison.

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 (moitié moins hauts que ceux du corps) destinés à recevoir le surplus de miel. A la fin de la miellée quand les cadres de la hausse sont remplis de miel et operculés, l'apiculteur ramasse les hausses des ruches et les ramène dans sa miellerie afin d'extraire le miel [9].

1.3.2.2 Désoperculation et extraction

L'apiculteur peut désoperculer les alvéoles des cadres par différents outils manuels et mécaniques, notamment : le couteau à désoperculer, la herse ou la machine Caillas.

Les cadres sont ensuite mis dans un extracteur qui est une sorte de centrifugeuse manuelle ou automatisée, grâce à la force centrifuge qui fait alors sortir le miel des alvéoles qui sera projeté sur les parois et qu'on retrouvera au fond de la machine [9].

1.3.2.3 Maturation et mise en pot

Après extraction, le miel est versé dans un maturateur qui est un récipient de décantation surmonté d'un filtre destiné à retenir les impuretés pouvant y être contenues (fragments de cire,

bulles d'air, ...). Les impuretés remontent à la surface au bout de deux jours et sont donc éliminées. Le maturateur doit être placé dans un endroit propre et sec.

Le miel peut enfin être récupéré et conditionné dans des pots [9].

1.3.2.4 Conservation

La conservation du miel a pour but de garder sa qualité, chose tout à fait possible pendant des années. Mais comme la plupart des denrées alimentaires, il peut subir des transformations au fil du temps, des modifications de ses caractéristiques physico-chimiques.

Le miel doit être conservé dans un endroit sec et à l'abris de la lumière, à une température inférieure à 16 degrés, le miel liquide faisant exception à température ambiante.

Il doit garder une teneur en eau inférieure à 21% comme limite. Selon le codex Alimentarius (ensemble de normes alimentaires internationales sur la qualité et l'innocuité des aliments élaborées par la Commission mixte Food and Agriculture Organisation - Organisation mondiale de la santé), la présence d'une quantité importante en eau favoriserait la prolifération de microorganismes qui produisent un effet de fermentation [9].

1.4 Composition et propriétés physico-chimiques du miel

1.4.1 Caractéristiques organoleptiques

Le miel récolté peut varier par sa couleur, sa consistance et son arôme.

1.4.1.1 Couleur

Le miel peut se présenter sous différentes couleurs, celle-ci peut varier en fonction de son origine florale et géographique. Il existe des miels allant d'une couleur claire, limpide jusqu'à des couleurs plus foncées se rapprochant du noir.

1.4.1.2 Texture et aspect

Le miel peut avoir de nombreux aspects : liquide, cristallisé, dur, souple et même pâteux, selon le mode de stockage et le degré de cristallisation.

La cristallisation du miel est cependant un phénomène naturel qui se produit pendant son stockage, le taux et la vitesse de cristallisation va varier selon de nombreux facteurs, parmi lesquels l'origine botanique, la quantité de glucose, de fructose et d'eau, la température de conservation, la viscosité et le niveau de sursaturation en glucose [11].

La composition en sucre du nectar va influencer la teneur en glucose d'un miel. C'est ce sucre simple qui va constituer la base cristalline du miel. Plus un miel sera riche en glucose et plus il cristallisera vite [12].

1.4.1.3 Goût et arômes

Le miel présente une grande variété de saveurs et d'arômes différents. Le centre apicole de recherche et d'information (CARI) a réalisé une roue des odeurs et des arômes qui permet de décrire les différentes sensations perçues lors de la dégustation d'un miel [13].

1.4.2 Propriétés Physiques

1.4.2.1 Densité

La densité d'un miel est le rapport, exprimé en décimal, de la masse volumique de ce miel à la masse volumique de l'eau pure à 4°C (exprimée en Kg/dm³). Elle varie en fonction de la température, de la teneur en eau et de la composition chimique du miel. A 35°C, tous les miels sont fluides. La densité du miel varie entre 1,14 et 1,435 g/cm³, ce qui fait de lui un produit relativement dense [14].

1.4.2.2 Viscosité

La viscosité est définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence qui se produit dans la masse d'une matière. La majorité des miels ont une viscosité normale, c'est-à-dire qu'ils suivent les lois de Newton sur l'écoulement des fluides. Tout comme pour la densité, la viscosité du miel dépend aussi de trois facteurs qui sont, sa teneur en eau, sa composition chimique et sa température. Elle est très élevée à basse température et décroît à hautes températures [15].

1.4.2.3 Potentiel d'hydrogène « pH »

Le pH ou « potentiel hydrogène », encore appelé indice de « Sorensen », est la mesure du coefficient caractérisant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Il représente la concentration des ions H^+ d'une solution [16].

Les miels de fleurs possèdent le plus souvent des valeurs pH faibles (3,3 à 4,6). Exception : les miels de fleurs de châtaignier ont une valeur pH relativement élevée allant de 5 à 6. Les miels de miellat ont, en raison de leur teneur plus élevée en sel à effet tampon, des valeurs pH en moyenne plus élevées (4, 2 à 5, 5). Le miel s'acidifie en vieillissant [17].

1.4.2.4 Acidité

L'acidité du miel dépend de la quantité d'acides organiques et de lactones dans le miel ainsi que de sa composition en minéraux.

L'acidité est un critère de qualité important qui sert à détecter les fermentations indésirables, en raison de son influence sur la texture et la stabilité du miel. Cette acidité provient d'acides organiques dont certains sont libre et d'autres combinés sous forme de lactones. Certains de ces acides proviennent du nectar ou du miellat mais leur origine principale provient des sécrétions salivaires de l'abeille ; le principal acide dérive du glucose sous forme d'acide gluconique. Sa formation s'accompagne de dégagement d'eau oxygénée [18].

D'après le Codex Alimentarius, l'acidité libre du miel ne doit pas dépasser 50meq d'acide par 1000g [5].

1.4.2.5 Conductivité électrique

La conductibilité électrique est la propriété d'un corps de permettre le passage du courant électrique. C'est donc l'inverse de la résistivité [19].

Elle est liée à la teneur en minéraux, faisant partie des paramètres de contrôle de qualité du miel et souvent une méthode de détermination de son origine botanique. La conductivité électrique est exprimée en Siemens par centimètre (S/cm) et la valeur maximale approuvée pour le miel comestible est de 0,8mS/cm comme stipulé par la directive de l'UE [20, 21].

1.4.2.6 Conductivité thermique

La conductivité thermique est la mesure de transfert de chaleur, désignée aussi avec le terme d'indice thermique. Elle est relativement faible dans le miel, elle s'élève à $12 \cdot 10^{-4}$ cal/cm·s·degré pour un miel liquide et à $12,9 \cdot 10^5$ cal/cm·s·degré pour un miel cristallisé [17].

Le miel conduit mal la chaleur et est donc un bon isolant thermique [22].

1.4.2.7 Le pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des miels concerne leur action sur la lumière polarisée. La majorité des miels sont lévogyres, c'est-à-dire qu'ils font tourner à gauche la lumière polarisée, mais il existe des miels dextrogyres, qui par conséquent font tourner le plan de polarisation à droite, cette différence est due aux divers sucres qu'il contient qui ont tous un pouvoir rotatoire différent [23].

Cette propriété est utilisée pour distinguer entre les miels de nectar et les miels de miellat mais aussi pour la détermination de l'origine botanique du miel [14].

1.4.2.8 Turbidité

Lorsque les miels sont sous forme liquide, ils sont généralement très transparents. Ils contiennent cependant des éléments en suspension qui leur confèrent une certaine turbidité (levures, poussières, grains de pollen, colloïdes, particules de cire et de propolis etc.)

La néphélogométrie est une des techniques de mesure de la teneur en particules en suspension ou de la turbidité d'un milieu. Elle fait partie de la photométrie des milieux troubles.

Elle consiste à mesurer la lumière diffusée à 90° d'angle par rapport à la lumière incidente grâce à un néphélomètre. Il est généralement constitué d'une source de lumière blanche ou de lumière infrarouge [24].

1.4.2.9 Chaleur spécifique

La chaleur spécifique d'un corps est la quantité de chaleur nécessaire pour élever d'un degré Celsius la température d'une unité de poids de ce corps. La petite calorie se définit comme la quantité de chaleur nécessaire pour élever de 1°C (entre 14 et 15°) la température de 1 g d'eau pure. Celle du miel n'est que de $0,54$ à 20° pour une teneur en eau de 17% . Ce qui veut dire

qu'il faut environ deux fois moins de calories pour chauffer du miel que pour chauffer la même masse d'eau [25].

1.4.2.10 Indice de réfraction

Il s'agit d'une propriété optique. Tout corps transparent est caractérisé par un certain indice de réfraction. C'est une constante qui dépend de la nature chimique du corps. Lorsque le corps en question est en solution dans l'eau, l'indice de réfraction varie régulièrement entre l'indice de l'eau pure et l'indice du corps pur. La mesure de l'indice de réfraction permet donc de connaître facilement la teneur en eau d'un produit en solution tel que le miel. Cette mesure se fait au moyen d'un réfractomètre, une goutte de miel parfaitement liquéfié écrasée entre les prismes de l'appareil suffit pour une mesure.

L'indice de réfraction donne la correspondance directe et teneur en eau grâce aux tables de Chataway. Il est inversement proportionnel à l'humidité du miel [25].

1.4.3 Composition chimique

La composition du miel dépend de nombreux facteurs dont l'espèce végétale butinée, la source de récolte, les conditions environnementales, ...

Il se compose essentiellement d'un mélange d'hydrates de carbone et des substances mineures telles que les acides organiques, les acides aminés, les protéines, les minéraux, les vitamines et les lipides. D'autres substances sont également présentes telles que les enzymes, les caroténoïdes et les polyphénols [26].

1.4.3.1 Eau

La teneur en eau est l'un des critères de pureté, d'intégrité et de stabilité du miel. Elle est en moyenne de 17 à 18 %.

Elle influence directement ses propriétés physiques, telles la viscosité et la cristallisation et plus cette teneur est élevée plus y a un risque de fermentation. Elle dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions météorologiques lors de la production, l'humidité dans la ruche, ainsi que les conditions de récolte [27, 28].

1.4.3.2 Sucres

Les hydrates de carbone constituent la partie la plus importante du miel. Ils sont présents en grande quantités (78 à 80%), les principaux sucres sont des monosaccharides dont le glucose et le fructose qui prédominent, la présence de ces derniers est due au résultat d'une enzyme sur le saccharose : l'invertase. D'autres sucres peuvent être présents tels que le saccharose, le maltose et leur présence dépend des plantes qui ont été butinées [27].

1.4.3.3 Acides organiques

Le miel contient une vingtaine d'acides organiques qui sont responsables de son acidité, notamment l'acide gluconique avec ses lactones (esters internes) qui représente à lui seul 70 à 90 % de la teneur en acides organiques. Il est produit à partir du D-glucose dans une réaction catalysée par l'enzyme connue sous le nom de glucose oxydase.

On retrouve aussi d'autres acides tels que : l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide butyrique et l'acide succinique. On peut aussi retrouver de l'acide chlorhydrique, phosphorique et formique à l'état de traces [29].

1.4.3.4 Sels minéraux et oligoéléments

Le miel apporte une trentaine d'oligo-éléments qui sont indispensables à la santé humaine. Le potassium est majoritairement présent, mais on retrouve également du phosphore, du calcium, du soufre, magnésium, cuivre, manganèse, fer, silicium, zinc, bore et baryum plus ou moins en grandes quantités.

La teneur en minéraux peut varier de 0,02 à 1,03 %, cette variation dépend de l'origine botanique et géographique du miel. Les miels de miellats et de coloration foncée contiennent en général plus de minéraux [30].

1.4.3.5 Protéines

Le miel est une substance assez pauvre en protides avec un taux de 0,26%. Il s'agit essentiellement de peptones, d'albumines, de globulines et de quelques acides aminés tels que la proline, la trypsine, l'histidine et l'alanine à l'état de traces qui proviennent de la plante ou des sécrétions de l'abeille.

La teneur en proline est un indicateur de qualité car le miel non falsifié a en général, un taux qui dépasse les 183mg/Kg [9, 31].

1.4.3.6 Enzymes

Il existe de nombreuses enzymes dans le miel : l'invertase, l'amylase, la glucose oxydase, une catalase et une phosphatase. Leur origine peut être végétal (nectars) ou animal (secrétions salivaires des abeilles).

L'invertase est responsable de l'hydrolyse des disaccarides (saccharose en fructose et en glucose), les α et β amylases (couramment appelées diastases) dégradent l'amidon en glucose et la glucose oxydase donne du peroxyde d'hydrogène et de l'acide gluconique à partir du glucose.

La thermolabilité de ces enzymes fait d'elles un indicateur de surchauffe du miel et donc un paramètre de control de qualité [9, 24].

1.4.3.7 Lipides

Ils sont présents en faibles quantités, on y retrouve majoritairement des stérols, des triglycérides et des acides gras. Leur présence pourrait être expliquée par le besoin important du métabolisme des abeilles en lipides [30].

1.4.3.8 Vitamines

Les vitamines sont présentes en infimes quantités mais on y retrouve plusieurs, essentiellement des vitamines du groupes B : acide pantothénique (B5), acide folique (B9), acide nicotinique (B3). On y retrouve aussi de la vitamine C, ainsi que les vitamines A, D et K [9, 14].

1.4.3.9 Composés phénoliques et caroténoïdes

Les composés phénoliques sont principalement retrouvés dans la propolis, ils proviennent des sécrétions des bourgeons et des exsudats des plantes.

On distingue trois familles : les acides benzoïques, les acides cinnamiques et les flavonoïdes.

Les polyphénols principaux contenus dans le miel sont les flavonoïdes, les acides phénoliques et leurs dérivés. La concentration et le type de substances phénoliques du miel dépendent de l'origine florale. Ils sont responsables de la coloration du miel, ainsi, plus les miels sont foncés, plus ils sont riches en flavonoïdes. Certains phénols participent aussi à l'arôme et sont impliqués dans les qualités organoleptiques du miel.

Ces composés possèdent des propriétés antioxydantes intéressantes car ils participent à la neutralisation des radicaux libres. Le miel contient aussi des caroténoïdes qui sont responsables en partie de la couleur et de l'activité antioxydante [24, 32, 33].

1.4.3.10 Hydroxyméthylfurfural (HMF)

L'HMF est un aldéhyde acyclique formé à partir de la déshydratation des hexoses sous l'action de l'acidité libre du miel et de la chaleur. Cette molécule représente un facteur relatif à la qualité du miel influencée par le pH et la température de stockage, elle apparaît au cours du vieillissement ou du chauffage de ce dernier, ce qui fait d'elle un indicateur de fraîcheur et de surchauffe.

Le codex alimentarius fixe un seuil maximum de 40 mg d'HMF/Kg de miel pour les miels produits dans l'Union Européenne mais dans les régions tropicales où les températures moyennes sont plus élevées, la teneur en HMF peut être deux fois supérieure au seuil fixé par la directive du conseil Européen (≤ 80 mg/kg).

Tous les miels n'évoluent pas de la même façon : les miels de nectar atteignent entre 5 et 15 mg/kg de HMF au bout de deux ans, alors que les miels de miellats (souvent plus riches en fructose et plus acides), peuvent atteindre 25 mg/kg de HMF. Ce produit se forme très lentement au fil du temps et son évolution est exponentielle [34, 35].

1.4.3.11 Colloïdes

Les colloïdes sont responsables de la turbidité lorsque l'on dilue un miel dans l'eau. La teneur en colloïdes varie entre 0,1 et 1%. Ils sont constitués principalement par des protéines, des substances cireuses, des pigments, des pentosanes et diverses autres substances [24].

1.4.3.12 Substances aromatiques

Les substances aromatiques sont comme leur nom l'indique à l'origine de l'arôme du miel. On retrouve : l'anthranilate de méthyle, le diacétyl, le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, l'acétone et l'isobutyraldéhyde [24].

1.5 Paramètres de contrôle qualité et normes internationales

1.5.1 Qualité d'un miel

Un miel de qualité doit être un produit sain, extrait dans de bonnes conditions d'hygiène, conditionné correctement, qui a conservé toutes ses propriétés d'origine et qui les conservera le plus longtemps possible. Il ne doit pas être adultéré et doit contenir le moins possible de polluants divers, antibiotiques, pesticides, métaux lourds ou autres produits industriels [15].

1.5.2 Facteurs essentiels de composition et de qualité

Le miel vendu en tant que tel ne doit pas contenir d'ingrédient alimentaire, y compris des additifs alimentaires, et seul du miel pourra y être ajouté. Le miel ne doit pas avoir de matière, de goût, d'arôme ou de contamination inacceptable provenant de matières étrangères absorbées durant sa transformation et son entreposage. Le miel ne doit pas avoir commencé à fermenter ou être effervescent. Ni le pollen ni les constituants propres au miel ne pourront être éliminés sauf si cette procédure est inévitable lors de l'élimination des matières inorganiques ou organiques étrangères. Le miel ne doit pas être chauffé ou transformé à un point tel que sa composition essentielle soit changée et/ou que sa qualité s'en trouve altérée et aucun traitement chimique ou biochimique ne doit être utilisé pour influencer la cristallisation du miel [5].

1.5.3 Normes internationales relatives au miel

Ces normes sont bien spécifiées dans une directive européenne relative au miel et dans la norme pour le miel du *Codex Alimentarius*, ces normes font l'objet d'une révision continue et sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau I Normes de qualité relatives au miel

Critères de qualité du miel	Codex Alimentarius [5]	UE [20]
Teneur en eau		
Général	≤ 20 % (g/100g)	≤ 20 %
Miels de bruyère (<i>Calluna</i>)	≤ 23 %	≤ 23 %
Miels destinés à l'industrie en général	/	≤ 23 %
Teneur en sucres		
Teneur en sucres réducteurs		
Miels non mentionnés ci-dessous	≥ 60 g/100 g	≥ 60 g/100 g
Miel de miellat ou mélanges de miel de miellat et de nectar	≥ 45 g/100 g	≥ 45 g/100 g
Teneur en saccharose		
Miels non mentionnés ci-dessous	≤ 5 g/100 g	≤ 5 g/100 g
Miels de luzerne, d'agrumes, de robinier, de sainfoin d'Espagne, d'Eucalyptus et d'Eucryphia	≤ 15 g/100 g	≤ 15 g/100 g
Miels de lavande (espèces <i>Lavandula</i>), de bourrache (<i>Borago officinalis</i>)	≤ 10 g/100 g	≤ 10 g/100 g
Teneur en matières insolubles dans l'eau		
Miels en général	≤ 0.1 g/100 g	≤ 0.1 g/100 g
Miels pressés	≤ 0.5 g/100 g	≤ 0.5 g/100 g
Teneur en matières minérales (cendres)		

Miels non mentionnés ci-dessous	≤ 0.6 g/100 g	≤ 0.6 g/100 g
Miel de miellat ou mélange de miel de miellat et de miel de nectar ou miel de châtaignier	≤ 1.2 g/100 g	≤ 1.2 g/100 g
Acidité libre	≤ 50 meq/kg	≤ 50 meq/kg
Activité diastasique (indice diastasique en unités de Schade)		
Miel après traitement et mise en pot	≥ 8	≥ 8
Miels avec une teneur enzymatique naturellement faible	≥ 3	≥ 3
Teneur en hydroxyméthylfurfural		
Miel après traitement et mise en pot	≤ 40 mg/kg	≤ 40 mg/kg
Miel d'origine déclarée en provenance de régions ayant un climat tropical et mélanges de ces miels	≤ 80 mg/kg	≤ 80 mg/kg
Conductivité électrique		
Miel de nectar, miel non énuméré ci-dessous et mélanges de ces miels	$\leq 0,8$ mS/cm	$\leq 0,8$ mS/cm
Miel de miellat et de châtaignier, à l'exception des miels énumérés ci-dessous et des mélanges de ceux-ci.	$> 0,8$ mS/cm	$> 0,8$ mS/cm
Exceptions : arbousier, bruyère cendrée, eucalyptus, bruyère commune, manuka ou jelly bush, théier		

1.6 Histoire de l'emploi du miel en thérapeutique

Dès 2400 ans av. J-C, l'abeille a été exploitée en Egypte. Le papyrus d'Ebers ou livre de préparation de médicaments pour toutes les parties du corps humain, du XVIème siècle av. J-C, a permis de découvrir de nombreuses préparations à base de miel pour traiter les blessures, certaines maladies rénales, oculaires ou du tube digestif.

Ces préparations se présentaient sous forme de pilules, de pommades, de décoctions, de pansements, d'emplâtres ou de collyres. Ainsi sur 900 remèdes différents, le miel entre dans la composition de plus de 500 d'entre eux.

Hippocrate a ensuite largement contribué à généraliser l'utilisation du miel dans l'alimentation et en médecine. Il facilitait la cicatrisation des plaies, et il le préconisait contre les ulcères et les hémorroïdes.

Les romains l'utilisaient également pour ses propriétés médicinales. Dioscoride le recommandait pour guérir les plaies, les douleurs d'oreilles et autres maux quand Galien le préconisait pour combattre les inflammations [36].

L'utilisation du miel a toujours été d'importance au Moyen-Âge à la Renaissance, où les apothicaires puisaient dans les recettes de l'Antiquité et dans le Canon de la Médecine d'Avicenne, qui l'utilisa également à des fins thérapeutiques.

Au XVIIIème siècle, on retrouve les électuaires (forme galénique pâteuse administrée par voie orale), les mellites (sirops à base de miel), les oxymels (préparation pharmaceutique à base d'eau, de miel et de vinaigre) dans les différentes pharmacopées [36].

Les formes galéniques faisant appel au miel n'ont guère changé au cours du XIXe siècle, et on retrouve les électuaires, les robs, les mellites, les oxymels. Certaines de ces formes sont encore exploitées, ou l'ont été il y a encore peu de temps.

Au XXème siècle, les Russes utilisaient le miel durant la 1ère guerre mondiale en prévention des infections et afin d'accélérer la cicatrisation. Les Allemands l'associaient à l'huile de foie de morue dans le traitement des ulcères, brûlures, fistules et furoncles [37].

Sur le plan thérapeutique, ce sont les mêmes indications que l'on retrouve pour le miel, avec en plus l'application sur les plaies pour en diminuer l'irritation et amener une bonne suppuration, mettant ainsi à profit son pouvoir antibactérien et cicatrisant.

Son utilisation a peu à peu été abandonnée après la 2ème guerre mondiale en faveur de produits plus innovants issus l'émergence de l'industrie pharmaceutique [36].

2 Le pollen

2.1 Définition

Le pollen est un des produits de la ruche (tel que le miel, la gelée royale et la propolis) qui prend de plus en plus d'importance grâce à ses propriétés thérapeutiques que lui confère sa composition en molécules bioactives [38].

Il constitue la base de l'alimentation des abeilles car représente leur seul apport protéinique et permet la pérennité de la ruche. Les ouvrières nourrissent le couvain avec le pollen récolté et les larves sont nourries à partir d'un mélange de miel et de pollen plusieurs dizaines de fois par jour [39].

Le grain de pollen est le gamète mâle des végétaux supérieurs. Il est produit au niveau des anthères à l'extrémité des étamines, il est libéré à maturité par déhiscence de l'anthère, Une fois libéré, le pollen est transporté vers le stigmate (organe femelle) soit par autofécondation, soit par fécondation croisée, et il émet un tube pollinique qui traverse le style pour acheminer les gamètes mâles jusqu'à l'ovule afin de le féconder, c'est la fertilisation [40].

Les grains de pollen se caractérisent, selon leur origine botanique, par leur forme (sphérique, en cloche, cylindrique, triangulaire, ...), couleur (allant du jaune brillant au noir), taille (20 à 55 µm) et masse (de 12 à plusieurs dizaines de microgrammes) [41].

2.2 Le pollen : de la fleur à l'homme

2.2.1 Pollinisation

La pollinisation est le processus par lequel est transféré le pollen des organes de reproduction mâles (anthères) vers les organes de reproduction femelles (stigmate) des plantes à fleurs (gymnospermes et angiospermes).

La pollinisation peut se faire selon deux modes : l'autopollinisation et la pollinisation croisée [42].

2.2.1.1 Autopollinisation

L'autopollinisation correspond à la pollinisation entre deux organes reproducteurs d'une même plante. Il peut s'agir des deux organes d'une même fleur dans le cas d'une fleur hermaphrodite ou de deux fleurs différentes d'une même plante dans le cas de plantes monoïques [43].

2.2.1.2 Pollinisation croisée

La pollinisation croisée, quant à elle, correspond au transfert du pollen de l'anthère d'une plante au stigmate d'une autre plante conspécifique. Ce mode de pollinisation est obligatoire chez les plantes dioïques, mais se produit fréquemment chez les plantes monoïques ou à fleurs hermaphrodites car ce type de pollinisation augmente la variabilité génétique de la descendance. Dans ce cas, le transfert de pollen nécessite l'intervention d'un vecteur [43].

2.2.2 Vecteurs de la pollinisation

Il existe deux grands types de pollinisation : la pollinisation abiotique où la dispersion est assurée par un agent naturel inanimé (vent, eau) ou un phénomène physique (gravité) et la pollinisation biotique où l'agent de dispersion est un animal, vertébré ou invertébré (insectes, mammifères, oiseaux) [44].

2.2.2.1 Agents abiotiques

Parmi les agents abiotiques, ont été principalement décrits :

- La gravité (pollinisation géophile) : retrouvée chez les plantes à autopollinisation. Dans ce cas, le pollen est censé tomber sur le stigmate d'autres fleurs grâce au phénomène de gravité et les polliniser. La pollinisation géophile est un processus très rare et négligeable ;
- L'eau (hydrogamie ou hydrophilie) : retrouvée chez de rares espèces de plantes aquatiques qui dispersent leur pollen dans l'eau ;
- Le vent (anémogamie ou anémophilie) : dans ce cas, le pollen rencontre le stigmate par l'action du vent. Ce mode est notamment favorisé lorsque les fleurs sont très exposées, possèdent de longues étamines, ne sont pas colorées ou parfumées (n'attirent pas les insectes) et que leur pollen est fin et léger ce qui favorise la dispersion qui reste cependant très aléatoire [45].

2.2.2.2 Agents biotiques

La pollinisation biotique se répartit en différentes classes selon l'agent pollinisateur :

- la pollinisation par les insectes (entomophilie) tels que les coléoptères (cantharophilie), les mouches (myophilie), les abeilles (méliittophilie), les papillons (psychophilie et/ou phalaénophilie) ;
- la pollinisation par les invertébrés tels que les escargots et les limaces (malacophilie);
- la pollinisation par les vertébrés tels que les oiseaux (ornithophilie) et les chauves-souris (chiroptérophilie) [45].

Parmi tous ces modes, la pollinisation par les abeilles reste la plus efficace pour deux raisons principales : d'une part, les abeilles tirent leur nourriture des fleurs et sont donc constamment à la recherche de ces dernières et d'autre part, la très grande persistance des abeilles à chercher des fleurs d'une même espèce [45].

2.2.3 Récolte du pollen par l'abeille

Les plantes mellifères investissent beaucoup d'énergie dans la production de nectar sucré afin d'attirer les pollinisateurs. Les nectaires floraux étant souvent enfouis profondément au cœur de la fleur, pour y accéder, la butineuse doit donc se poser sur la corolle de la fleur et étirer son proboscis jusqu'aux nectaires. Au cours de ce processus de récolte, le thorax et l'abdomen de la butineuse entrent en contact avec les étamines et sont saupoudrés de pollen et en se déplaçant de fleur en fleur, les abeilles accumulent du pollen sur leur corps. En se brossant avec leurs pattes, les abeilles forment des pelotes avec le pollen.

Elles y incluent un peu de miel et de salive ce qui active la fermentation et en améliore ainsi la conservation et l'assimilation. Elles fixent ces pelotes sur leurs pattes postérieures à un endroit que l'on appelle les corbeilles à pollen. C'est ainsi qu'elles le rapportent à la colonie [46, 47].

2.2.4 Récolte du pollen par l'homme

Une ruche a besoin de 20 à 50 kg de pollen par an. Ce pollen représente son unique source de protéines. L'apiculteur n'en récolte qu'environ 10% (2 à 5 kg) au maximum pour ne pas nuire au bon développement de la colonie.

Les apiculteurs utilisent des trappes à pollen pour récolter les pelotes fraîchement rapportées par les butineuses. Ce sont des grilles dont les mailles font environ 4,5 mm de diamètre. Il existe plusieurs sortes de dispositifs avec des mailles différentes. Ces trappes sont placées devant l'entrée de la ruche. Pour pénétrer dans la ruche, les butineuses vont devoir traverser la grille en passant dans les mailles. Les mailles de la grille doivent être suffisamment larges pour laisser passer les abeilles mais assez étroites pour détacher les pelotes. Un tiroir placé sous la trappe recueille les pelotes de pollen détachées. Il est surmonté d'un tamis de 3 mm laissant les pelotes tomber à travers mais empêchant les abeilles de venir récupérer leurs butins.

On parle d'efficacité des trappes ce qui correspond au pourcentage de pelotes récoltées par rapport au nombre total des pelotes qui ont traversé. L'efficacité idéale est donc de 10% [48].

2.2.5 Transformation

Une fois récolté, le pollen de chaque ruche est pesé et trié. Le tri des pelotes est important puisqu'il s'agit d'éliminer toutes les impuretés présentes dans le mélange. Il se réalise en 3 étapes:

- La première consiste en un tri grossier à l'aide d'un tamis : éliminer les abeilles, larves mycosées, larves de fausse teigne, morceaux de plantes, poussières... qui sont récupérés dans le tamis avec les grosses pelotes ;

- Trieuse à pollen : Système de soufflerie qui consiste à séparer les éléments en fonction de leur poids. Les pelotes de pollen, grâce à leur poids tombent directement dans un bac situé sous l'entonnoir. Les éléments légers sont déviés et tombent dans un second bac. On y retrouve des pattes d'abeilles, morceaux de mues, de cuticules, des insectes, de la poussière de pollen, brisures de bois... ;

- La dernière étape est un tri manuel à la pince à épiler dans un bac à fond clair pour éliminer ce qui est passé à travers les mailles du tamis. On retrouve en majorité des larves mycosées, des morceaux d'abeille... C'est aussi l'occasion de goûter les différentes pelotes de pollen pour en éliminer les plus amères lorsqu'il s'agit d'un pollen toutes fleurs [49].

2.2.6 Conditionnement et conservation

Afin de permettre sa conservation, le pollen doit être conditionné dans les 48 heures suivant la récolte. Il existe deux méthodes de conditionnement : le séchage et la congélation [47].

Le séchage, méthode la plus utilisée, consiste à laisser le pollen récolté 24h dans une étuve à 40°C maximum. Le séchage présente plusieurs avantages tels que la réduction de la fragilité des pelotes, la facilitation du stockage, du transport de la manipulation et de la conservation et la capacité de retarder le tri qui peut, par conséquent, être fait en période creuse.

La congélation, quant à elle, consiste à trier le pollen avant de le placer dans un congélateur à -20°C. Il faudra faire attention à respecter la chaîne de froid et la période de conservation après décongélation qui ne devra pas excéder les 10 jours au réfrigérateur [50].

2.3 Composition chimique

Le pollen est composé de protéines, acides aminés, lipides, sucres, fibres alimentaires, sels minéraux, composés phénoliques et vitamines. Sa concentration élevée en sucres réducteurs, acides aminés essentiels, acides gras et la présence d'oligoéléments (Zinc, Cuivre, ...) fait du pollen un produit très bénéfique à l'alimentation humaine.

La composition chimique du pollen varie énormément selon son origine botanique et une composition standard ne peut être donnée même si des recommandations sur une composition basique minimale ont été émises [41, 51, 52].

2.3.1 Eau

La teneur en eau du pollen frais peut aller jusqu'à 30%. Une teneur de 8% est généralement admise après séchage même si certains pays exigent des teneurs plus basses pour assurer une bonne conservation (4% au Brésil, 6% en Pologne et en Suisse par exemple).

La teneur en eau est déterminée par la méthode de Karl Fisher [41, 51, 52].

2.3.2 Hydrates de carbone

Les hydrates de carbone sont les principaux composants du pollen. Parmi eux, on trouve en particulier des polysaccharides, comme l'amidon, et des éléments de parois cellulaires.

La teneur en hydrates de carbone est calculée selon la formule suivante : Teneur en hydrates de carbone = 100 - (teneur en eau + teneur en lipides + teneur en protéines + teneur en cendres) en exprimant toutes les valeurs en gramme par 100 grammes de pollen. Elle peut varier entre 13 et 55% [41, 51, 52].

2.3.3 Fibres

Il existe des différences importantes dans les indications issues de la littérature scientifique qui peuvent être mises sur compte des différentes méthodes de détermination utilisées mais le taux de fibres total (dont pectine) varie de 0,3 à 20% [41, 51, 52].

2.3.4 Protéines et acides aminés

La teneur en protéines du pollen varie de 10 à 40% selon le type de plantes. Seul environ 1/10 sont des acides aminés libres. La détermination des protéines est effectuée par dosage de l'azote, par exemple selon la méthode de Kjeldahl, et en multipliant le résultat obtenu par le facteur 6,25.

La proline, les acides glutamique et aspartique, la lysine et la leucine constituent 55% de la quantité totale en acides aminés mais le pollen peut en contenir jusqu'à 17 types différents dont le tryptophane qui est considéré comme très important pour la réduction du stress et de l'anxiété [41, 51, 52].

2.3.5 Lipides

Le taux en lipides varie là aussi significativement en fonction de l'origine botanique du pollen et se situe entre 1 et 13% avec comme principales matières grasses polaires et neutres (monoglycéride, diglycéride et triglycéride) et de petites quantités d'acides gras, de stérols et d'hydrocarbures [41, 51, 52].

2.3.6 Sels minéraux et traces d'éléments

Les fluctuations naturelles sont considérables, le potassium étant cependant un des composants principaux (4000-20000 mg/kg de pollen) avec le phosphore (800-6000 mg/kg de pollen), le magnésium (200-3000 mg/kg de pollen) et le calcium (200-3000 mg/kg de pollen). D'autres éléments tels que le fer, le zinc, le cuivre et le manganèse sont eux aussi retrouvés dans de très faibles quantités [41, 51, 52].

2.3.7 Vitamines

De très nombreuses vitamines sont présentes dans le pollen avec notamment celles du groupe B (B1 ,B2, B3, B5, B6, B8, B9), les vitamines C, D, E et la provitamine A (béta-carotène) [41, 51, 52].

2.3.8 Composés phénoliques

Ce groupe comprend les flavonoïdes, les leucotriènes, les catéchines et les acides phénoliques. Parmi les flavonoïdes présents dans le pollen, il y a principalement le kaempférol, la quercétine et l'isorhamnetine, tandis que dans le groupe d'acides phénoliques, il y a principalement de l'acide chlorogénique [41, 51, 52].

2.3.9 Contaminants

Les impuretés suivantes peuvent être préjudiciables en grande quantité :

- Métaux lourds ;
- Acaricides et produits de traitement employés en apiculture ;
- Pesticides ;
- Mycotoxines ;
- Produits vétérinaires [41, 51, 52].

2.4 Le pollen à travers l'histoire

L'usage du pollen d'abeille est historiquement reconnu pour ses propriétés médicinales et bénéfiques pour la santé et ce depuis plusieurs milliers d'années. Les bienfaits des produits de la ruche ont été décrits dans les livres saints des grandes religions (coran, bible, torah). Le pollen faisait partie du régime alimentaires des familles nobles des civilisations chinoise et égyptienne. D'anciens textes médicaux mentionnent qu'Aristote, Hippocrate, Pythagore et Plin reconnaisaient le pollen comme faisant partie d'une alimentation saine. Des propriétés sédative, bénéfique pour le cœur et le système digestif lui sont reconnues depuis le moyen-âge. Le pollen a été produit pour un usage médical dans plusieurs médecines traditionnelles à travers le monde et son usage moderne commence après la fin de la 2nde guerre mondiale et l'apparition des trappes à pollen [53].

Revue de la littérature

Chapitre II

PRINCIPALES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DU MIEL ET DU POLLEN

1 Activité cicatrisante

1.1 Rappel sur la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain avec une surface de 2m² et le plus lourd avec un poids moyen représentant 15 % du poids total d'un adulte. Elle représente la première barrière de protection de l'organisme des animaux vertébrés et est un site important de perception sensorielle pouvant réagir à différents stimuli tactiles, thermiques ou douloureux [54, 55].

La peau humaine est constituée de trois couches tissulaires principales superposées et communicantes dont les rôles variés et complémentaires vont de la protection mécanique à l'initiation des réactions inflammatoires et immunitaire en passant par le métabolisme. Ainsi, de la couche la plus profonde à la plus superficielle nous retrouvons : l'hypoderme, le derme et l'épiderme, ces deux derniers étant séparés par la jonction dermo-épidermique [56-58].

Au sein de ces couches se logent des annexes cutanées regroupant les phanères (les poils et les ongles) et les glandes cutanées qui sont réparties en deux groupes : les glandes sudoripares (apocrines et eccrines) et les glandes sébacées. Les glandes sébacées sont le plus souvent annexées aux poils formant le follicule pilosébacé tandis que les grandes eccrines sont toujours indépendantes des poils. Les glandes apocrines quant à elles peuvent parfois être annexées à un follicule pilo-sébacé [59].

De façon normale, l'ensemble de la peau est colonisé par des microorganismes tels que des bactéries appelés flore cutanée commensale. Le pouvoir pathogène de ces microorganismes est très faible. Leur densité et leur nature varient en fonction de la localisation anatomique [60].

Enfin, la peau en tant qu'organe possède de nombreuses fonctions nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Ainsi, elle a un rôle protecteur en agissant comme une barrière physique contre les impacts mécaniques et de pression, les variations de température, les microorganismes, les radiations et les produits chimiques mais aussi en jouant un rôle important dans les réactions immunitaires. Elle a un rôle sensoriel grâce à ses terminaisons nerveuses ressentant la chaleur, le froid, le tact, la douleur et le prurit. Ces perceptions ont un intérêt de défense et d'adaptation au milieu environnant. La peau participe au système de régulation de la température du corps humain par la sueur, des changements dans la circulation périphérique et le bilan hydrique par la transpiration et participe à la synthèse de la vitamine D nécessaire à la croissance et à l'équilibre calcique et phosphorique du corps humain [61].

1.2 Rappel sur la cicatrisation

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée. De cette manière les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres.

Dans la présentation schématique usuelle, le déroulement de la cicatrisation est divisé en quatre phases : la phase exsudative (réaction vasculaire et inflammatoire), la phase de prolifération, la phase de contraction et enfin la phase de remodelage tissulaire[62].

La phase exsudative comprend une réaction vasculaire et une réaction inflammatoire au cours desquels l'activation de l'agrégation plaquettaire et la libération de substances vasoconstrictrices induisent la formation d'un caillot stable qui assure ainsi l'hémostase et sert de matrice provisoire pour la migration des cellules pro-inflammatoires, dermiques et épidermiques sur le site de la plaie. Au cours de cette phase sont sécrétés plusieurs médiateurs de la cicatrisation comme le PDGF (PlateletDerived Growth Factor), le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et le TGF (Transforming Growth Factor) qui attirent et activent les macrophages et les fibroblastes sur le site pour commencer ainsi la phase proliférative [60, 61].

La phase proliférative qui est la seconde étape du processus cicatriciel conduit à la formation du tissu de granulation. Elle permet ainsi la réparation dermique et épidermique grâce à la synthèse de collagène et à la prolifération de kératinocytes, de fibroblastes et de néovaisseaux (l'angiogenèse) [61, 63].

Début ensuite la phase de contraction qui consiste en un mouvement centripète des berges de la plaie participant à la diminution de sa surface. Cette contraction est due à la transformation de certains fibroblastes (débutant environs après le septième jour de blessure) en myofibroblastes [55].

La phase de remodelage suit la phase de contraction et permet la lyse de la fibronectine et l'acide hyaluronique qui sont remplacés par le collagène, les fibres élastiques et les glycosaminoglycanes constituant une matrice plus résistante aux forces de traction. L'âge, les forces de tension et la pression influencent la synthèse et l'organisation des molécules de collagène. Toutefois les cicatrices sont, dans tous les cas, moins résistantes et moins élastiques que la peau normale, en partie à cause d'un certain déficit en élastine et en raison de la reconstitution d'une matrice relativement désorganisée [62].

Toutes ces phases sont interdépendantes et se chevauchent sans séparation stricte dans le temps et les caractéristiques de durée et d'intensité pour chaque phase varient en fonction de la plaie et du mode de cicatrisation [62].

1.3 Mécanisme d'action cicatrisante du miel

Le miel possède une activité cicatrisante connue depuis l'antiquité qui se manifeste par une accélération de la guérison, une diminution du risque d'infection, une diminution de la douleur et une amélioration de l'aspect de la cicatrice finale. Ces effets sont dus à l'amélioration de la capacité de cicatrisation physiologique en agissant sur les phases inflammatoires, prolifératives et de remodelage mais aussi à l'effet antibactérien du miel qui facilite la guérison [64].

Ainsi, le miel induit la synthèse de collagène en activant vraisemblablement le Transforming Growth Factor- β 1 (qui présente un puissant pouvoir réparateur) et favorise la formation du tissu de granulation en augmentant sa contraction [64].

L'application de miel sur la plaie génère, grâce à ses propriétés hygroscopiques, un milieu humide favorable à l'ensemble des étapes du processus de cicatrisation. L'effet osmotique du miel permet de drainer le plasma et la lymphe qui peuvent contenir des éléments favorisant la reconstitution cutanée. Ce milieu humide permet aussi une cicatrisation plus rapide comparé à un pansement sec car les tissus épithéliaux nouvellement formés ne sont pas lésés. De plus, l'osmolarité du miel favorise l'exsudation, donc la diminution de l'œdème au sein de la plaie [64].

Enfin, d'autres éléments peuvent expliquer l'action cicatrisante du miel tels que son effet immunomodulateur qui augmente la génération de cytokines pro-inflammatoires (TNG-alpha, IL1, IL6, PGE2), son action antibactérienne, son effet antioxydant grâce à sa composition en molécules antioxydantes (polyphénols,...), son pH acide, la formation d'un biofilm de protection ou la génération de peroxyde d'hydrogène [65].

2 Activité antimicrobienne

2.1 Rappel sur les microorganismes

Les microorganismes constituent un groupe extrêmement diversifié d'organismes microscopiques répartis dans les trois domaines du vivant (bactérie, archées et eucaryote). Ils se distinguent les uns des autres par leur forme, leur taille et leur mode de vie [66].

Les micro-organismes pathogènes comprennent les bactéries, les champignons et les parasites. Les virus sont quant à eux sujets à controverse puisque certains auteurs ne les considèrent pas comme vivants du fait qu'ils soient incapables de se reproduire sans infecter un hôte cellulaire [66, 67].

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes, de petite taille (0,2-10 µm), de morphologie variable (coques, bacilles, coccobacilles) et ne présentant pas d'organites intracellulaires complexes contrairement aux cellules eucaryotes. Ils sont généralement classés selon la structure de leur paroi en Gram+ et Gram- [68, 69].

Les champignons, mycètes ou fungi sont des organismes vivants végétatifs, eucaryotes, à paroi cellulaire formée principalement de chitine ou de glucanes, hétérotrophes, absorbotrophes, produisant des spores et pouvant présenter une reproduction sexuée, asexuée ou parasexuée. Ils sont très répandus et possèdent des rôles écologiques importants et diversifiés [70].

Il existe trois grands groupes de champignons impliqués en pathologie humaine et dont l'étude constitue la mycologie médicale : les champignons levuriformes, les champignons filamenteux et les champignons dimorphiques, auxquels s'ajoute une espèce *Pneumocystis jirovecii* longtemps considérée comme un parasite avant d'être reclassée dans le règne des champignons [71, 72].

Un parasite est un être vivant qui, de façon temporaire ou permanente, vit aux dépens d'un autre organisme vivant constituant son hôte sans forcément provoquer de conséquences néfastes chez ce dernier [73].

Il existe deux grands groupes de parasites pouvant causer des pathologies chez l'homme : les protozoaires et les helminthes [74].

Les virus sont des agents infectieux intracellulaires composés d'acide nucléiques et de protéines et ne possédant pas leur propre métabolisme. Ils doivent de ce fait, pour se multiplier, infecter des cellules et détourner leur machinerie afin de synthétiser leurs protéines virales [75].

2.2 Rappel sur les infections

L'infection est le processus durant lequel un agent pathogène pénètre dans l'organisme, s'y multiplie et cause des lésions provoquant l'apparition de signes cliniques. On parle alors de maladie infectieuse [76].

Lors d'une infection, l'organisme met en jeu des moyens de défense qui permettent de limiter ses conséquences et à terme d'éliminer l'agent pathogène responsable. Ces moyens de défense constituent le système immunitaire qui peut être divisé en deux types : l'immunité innée et l'immunité acquise [76].

Le système immunitaire innée constitue la réponse immédiate mais peu spécifique du corps à une agression. Il est constitué des barrières anatomophysiologiques, d'une composante cellulaire et d'une composante humorale [76, 77].

L'immunité adaptative constitue la réponse tardive mais spécifique de l'organisme à l'infection et permet le développement d'anticorps spécifique et d'une mémoire contre l'agent pathogène pour obtenir une réaction beaucoup plus rapide lors d'une exposition ultérieure. Les cellules impliquées dans cette réponse sont les lymphocytes B et les lymphocytes T précédemment activés par les cellules présentatrices d'antigènes (principalement les cellules dendritiques) qui constituent l'interface entre les immunités innées et adaptatives [76, 78].

Lorsque le système immunitaire est dépassé et qu'il n'arrive pas à éliminer l'agent pathogène, l'instauration d'un traitement est nécessaire afin de préserver l'intégrité des fonctions de l'organisme et le cas échéant éviter des complications pouvant aller jusqu'à la mort. Les molécules médicamenteuses utilisées pour le traitement des infections sont capables de tuer ou d'inhiber la multiplication des micro-organismes et peuvent être classées selon leur cible en antibiotiques (contre les infections bactériennes), antifongiques (contre les infections fongiques), antiviraux (contre les infections virales) et les antiparasitaires (contre les infections parasitaires) [76].

Malheureusement, l'apparition de résistances bactériennes et l'émergence de bactéries multi-résistantes constituant une véritable impasse thérapeutique a des conséquences sanitaires et financières considérables qui font de la lutte contre la résistance bactérienne un enjeu important au 21^{ème} siècle [79].

2.3 Mécanisme d'action antimicrobienne du miel et du pollen

Une action antimicrobienne, qu'elle soit antibactérienne, antivirale, antifongique ou antiparasitaire, a été décrite pour le miel et le pollen et ce depuis très longtemps.

Des études cliniques ont démontré que l'application de miel sur des plaies cutanées infectées permet de lutter contre l'infection et une régénération tissulaire plus rapide. Cette activité est attribuée à l'acidité du miel, sa grande concentration en sucres, un effet osmotique, la présence de composants bactériostatiques et bactéricides (peroxyde d'hydrogène, polyphénols, acides phénoliques, flavonoïdes, antioxydants, lysozyme, ...), l'augmentation de la sécrétion de cytokines, un effet immunomodulateur et ses propriétés anti-inflammatoires [80].

Plus récemment, le methylglyoxal et la défensine-1 ont été identifiés dans le miel comme des agents antibactériens et de plus en plus d'indications vont dans le sens de la présence d'autres molécules antibactériennes dans le miel qui restent à identifier [81].

La composition importante du pollen et de ses extraits en composés phénoliques explique son activité antibactérienne. Néanmoins la concentration de ces composés importerait moins que leur nature dans la mesure où des extraits de rendement phénolique faible peuvent présenter des activités élevées selon l'origine botanique du pollen [82, 83].

3 Autres actions pharmacologiques

3.1 Miel

- **Activité antioxydante :** L'activité antioxydante du miel est due en grande partie aux composés phénoliques qu'il contient mais leur mécanisme d'action est encore inconnu. Cette activité a été mesurée in vitro et une forte corrélation entre l'activité antioxydante, la concentration en phénols et l'inhibition de l'oxydation in vitro de la lipoprotéine de sérum humain a été observée [10] ;
- **Activité antiinflammatoire :** La réduction de l'inflammation a été démontrée chez le rat après ingestion de miel dans le cadre de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Le mécanisme supposé serait une action sur la production de radicaux libres agissant sur l'inflammation des tissus. Cliniquement, lors de l'application du miel sur les plaies, il se produit une diminution visible de l'inflammation avec réduction de l'œdème et des exsudats. La douleur, une autre composante de l'inflammation peut aussi être atténuée par le miel [10] ;

- **Activité antitumorale :** Plusieurs études ont prouvé que l'application de miel sur site tumoral inhibait de manière largement significative la croissance tumorale chez la souris et certaines lignées cellulaires cancéreuses in vitro. Aucun essai clinique chez l'homme n'a encore été conduit afin de confirmer ce potentiel d'action [10] ;
- **Activité immunostimulante :** Il a été rapporté que le miel stimule la multiplication des lymphocytes T et des lymphocytes B en culture, il active aussi les polynucléaires neutrophiles. Il a également été rapporté que la stimulation des monocytes en culture libèrent les cytokines TNF- α , interleukines IL-1 et IL-6 impliquées comme messagers cellulaires activant la réponse immunitaire face à l'infection [10] ;
- **Activité hypoglycémiant :** Des études ont montré que le fructose contenu dans le miel réduirait les niveaux de glycémie en prolongeant la vidange gastrique, ce qui peut ralentir la vitesse d'absorption intestinale [10] ;
- **Activité stimulante du microbiote intestinale :** L'effet du miel sur les micro-organismes intestinaux non pathogènes est bénéfique et bien documenté. Des études in vitro et in vivo ont montré que le miel augmente de manière largement significative le nombre de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* et *L. plantarum*). Il renforce également la croissance de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrukeii subsp. bulgaricus* [10] ;
- **Activité hypolipémiant :** Chez les rats nourris au miel, on a constaté une augmentation significative du taux de cholestérol HDL et une réduction des triglycérides et du LDL [10] ;
- **Autres :** Le miel posséderait aussi des vertus médicinales connues depuis des millénaires de façon empirique telles qu'une action antianémique, apéritive et digestive, antitussive, expectorante ou calmante [84].

3.2 Pollen

- **Action antioxydante :** La richesse du pollen en antioxydants (provitamine A, vitamines E et C, sélénium flavonoïdes) lui confère la capacité de piéger les radicaux libres [48, 53].
- **Action anti-inflammatoire :** L'extrait de pollen a montré un effet significatif sur l'inhibition de l'inflammation induite chez le rat. L'inhibition de la formation des PGE2 et PGI2 et des cytokines inflammatoires est le fait des nombreux flavonoïdes présents dans le pollen [48, 53] ;

- **Apport nutritionnel** : Le pollen peut être administré pendant les périodes à haute demande nutritive comme la gestation ou l'allaitement. Il peut pallier à des carences en acides aminés, vitamines et autres nutriments qu'il contient. De plus, ses facteurs et hormones de croissance complètent la panoplie des substances tonifiantes. Il améliore les performances physiques et intellectuelles et renforce le terrain dans la lutte contre les agresseurs [48, 53] ;
- **Action immunostimulante** : Il a été prouvé chez l'animal que la supplémentation en pollen amplifie grandement le développement précoce du thymus et de la bourse de Fabricius tout en retardant la dégénérescence de cette dernière et en promouvant la réponse immunitaire de la rate [48, 53] ;
- **Action anti-cancéreuse** : Les composés phénoliques, les caroténoïdes, les pigments respiratoires, les hormones et acides nucléiques confèrent au pollen une action antitumorale [48, 53] ;
- **Action anti-athérosclérotique** : Les extraits de pollen ont une activité hypolipémiante par diminution de la teneur en lipides totaux, triacylglycérol et cholestérol. Par conséquent, les effets bénéfiques dans le cadre de maladies cardiovasculaires ont été signalés [48, 53] ;
- **Action détoxifiante** : le pollen améliore la fonction hépatique et plusieurs études ont montré qu'il permettait une baisse des taux d'enzymes du foie (ASAT, ALAT, PAL) et de la bilirubine dans le sang des individus intoxiqués par des composés organiques (éthanol, trichloroéthylène, ...) ou des médicaments (paracétamol et hydrocortisone) [48, 53].

Partie expérimentale

Partie expérimentale

Afin de répondre à la problématique posée dans ce mémoire à savoir l'évaluation des effets pharmaco-toxicologiques du miel et du pollen, nous avons réalisé plusieurs travaux dont le contrôle qualité du miel à travers une analyse physico-chimique poussée, l'étude de ses activités cicatrisante, antibactérienne et antifongique selon des méthodes rigoureuses, l'évaluation de l'apport nutritionnel du pollen après quantification de sa toxicité par voie orale et l'étude de ses composés pharmacologiquement actifs à travers l'extraction, le dosage et l'identification des polyphénols.

1 Type d'étude

Il s'agit d'une étude expérimentale analytique.

2 Lieu d'étude

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au niveau de différents laboratoires :

- L'analyse physico-chimique du miel : au niveau du laboratoire d'hydro-bromatologie de la Faculté de Médecine de Tizi Ouzou ; à l'exception du dosage de l'HMF qui a été fait au niveau du laboratoire de chimie analytique de la même Faculté de Médecine et des taux de cendres et indice de réfraction qui ont été réalisés au niveau du laboratoire de physico-chimie de l'unité de production sise Gué de Constantine de Biotic, filiale du groupe Sidal ;
- L'activité cicatrisante du miel : au niveau du service de Pharmacotoxicologie du Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP) de Dély Brahim (Alger) et du laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Tizi Ouzou ;
- Les activités antibactérienne et antifongique du miel : au niveau du laboratoire de contrôle qualité microbiologique de l'unité de production sise Gué de Constantine de Biotic, filiale du groupe Sidal ;
- Les tests de toxicité aigüe et d'apport nutritionnel du pollen : au niveau du laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Tizi Ouzou ;
- L'extraction, le dosage et l'identification des polyphénols du pollen : fait au niveau du laboratoire de chimie analytique de la Faculté de Médecine de Tizi Ouzou.

3 Echantillonnage

3.1 Miel

Le miel étudié provient de la récolte d'été (Août 2019) d'un apiculteur du village d'Akaoudj (commune d'Ait Aïssa Mimoun, Daïra de Ouaguenoun, wilaya de Tizi Ouzou) situé à 15km au Nord-Ouest de la ville de Tizi Ouzou. Il s'agit d'une région montagneuse de haute Kabylie, dotée d'une flore diversifiée, le miel de cette région est donc classifié comme un miel de montagne d'origine multiflorale, composé d'un mélange de nectar et de miellat.

Les plantes essentiellement présentes dans la région sont le Genêt à balai (*Cytisus scoparius/uzzu*), la bruyère (*Calluna vulgaris/axlenj*), la Lavande sauvage (*Lavandula angustifolia/amezzir*), l'Inule visqueuse (*Dittrichia viscosa/amagraman*), le Sainfoin (*Onobrychis viciifolia/tassoulla*), l'arbousier (*Arbutus unedo/assisnou*), l'Eucalyptus (*Eucalyptus globulus/Kalitous*), et le Chardon marie (*Silybum marianum/avun9ar*).

L'étude ayant été réalisée à partir de la fin de l'année 2019, le miel peut être considéré comme frais, ce qui est indispensable afin d'être assuré que la qualité et la composition de ce dernier n'aient pas été altérées par une mauvaise conservation [85].

3.2 Pollen

Le pollen étudié provient de la même exploitation apicole que le miel et a été récolté à la même période, il possède donc les mêmes origine et caractéristiques botaniques.

Partie expérimentale

MATERIEL ET METHODES

4 Matériel et méthodes

4.1 Matériel

4.1.1 Appareils

Tableau II Appareils utilisés

Appareil	Modèle	Fonction
Agitateurs magnétiques/ Plaques chauffantes	Nahita 690-1	Agitation magnétique et chauffage
Agitateurs magnétiques/ Plaques chauffantes	Stuart YB 1720	Agitation magnétique et chauffage
Bain marie	Harry Gestigkeit	Chauffage
Balance de précision	Kern PLT 2000-3DM	Pesée précise
Balance de précision	Mettler Toledo MS204TS	Pesée précise
Conductimètre	Inolab cond 720 wtw series	Mesure de la conductivité
Dessiccateur		Protéger de l'humidité
Distillateur	GFL 2004	Fournir de l'eau distillée
Incinérateur	Nabertherm Lilienthal LH 80/12	Taux de cendres

PH-mètre	Mettler Toledo	Mesure du PH
Pompe à vide		Filtration sous vide
Spectrophotomètre UV-Visible	Série Lambda 25 Perkin Elmer	Mesure des densités optiques
Refractomètre à miel Abbe	Chincan FG 116	Mesure du taux d'humidité, degrés Brix et Baumé
Réfractomètre digital	Mettler Toledo RM 40	Mesure de l'indice de réfraction
Thermomètre à mercure		Mesure de la température
Pied à coulisse mécanique à vernier	Mitutoyo 530-123	Mesure des diamètres d'inhibition
Bain marie	JUMO dTRON 308	Préparation des milieux de culture
Hotte à flux laminaire vertical	OS ERIL-VBH	Protection
Vortex	Fisherbrand Ficher Scientific	Homogénéisation des suspensions
Etuve	Memmert	Incubation des cultures
Bec Bunsen		Stérilisation de la zone de travail

Densitomètre		Détermination de concentration des suspensions
Bain à ultrasons		Solubilisation
Centrifugeuse		Centrifugation à haute vitesse
Chromatographe	Shimadzu LC-20AT	Séparation et identification des polyphénols

4.1.2 Verrerie et consommable

Tableau III Verrerie, petit matériel et consommable utilisés

Verrerie et petit matériel	Consommable
Baguette en verre	Bistouris
Baguette magnétique	Boîtes de pétries stériles
Barreaux magnétiques	Compresse
Béchers de différents volumes	Compresse stériles
Burettes graduées	Cotton hydrophile

Ciseaux chirurgicaux	Disques de papier pour antibiogramme
Compte-Goutte	Ecouvillons stériles
Creusets en porcelaine	Gants de protection thermique
Entonnoir Büchner	Gants en latex
Entonnoir en verre	Gants stériles
Erlenmeyers de différents volumes	Lunettes de protection
Fiole à vide	Masques chirurgicaux
Fioles jaugées de différents volumes	Masques FFP2
Flacons en verre	Papier filtre
Pince chirurgicale	Papier transparent
Pince de contention	Seringues
Pipettes graduées de différents volumes	Sparadrap hypoallergénique
Pissette	
Pissettes	

Poires	
Sonde de gavage pour rongeurs	
Tubes coniques	
Tubes en verre	
Vials pour HPLC	

4.1.3 Réactifs et solutions

Tableau IV Réactifs et solutions utilisés

	Réactifs	Préparations
Détermination de l'acidité	1. Bleu de bromothymol	- Dissoudre 4 g de bleu de bromothymol dans 200 ml d'alcool à 95 %. - Ajouter 200 ml d'eau distillée bouillie et refroidie à l'abri de l'air jusqu'à l'obtention de la coloration verte. - Ajuster ensuite à 1000 ml avec de l'eau distillée bouillie et refroidie à l'abri de l'air.
	2. Solution d'hydroxyde de sodium à 0,05N	- Hydroxyde de sodium 2g - Eau distillée 1000 ml
	3. Solution d'acide sulfurique à 0,05N	- Acide sulfurique 2.45 ml - Eau distillée 1000 ml

Détermination des sucres	1. Solution d'acétate de zinc à 30% (Carrez II)	- Acétate de zinc 24g - Acide acétique glacial 3g - Eau distillée 100 ml
	2. Solution de ferrocyanure de potassium à 15% (Carrez I)	- Ferrocyanure de potassium 10.6g hexacyanoferrate - Eau distillée 100 ml
	3. Liqueur cuivrique A	- Sulfate de cuivre 40g - Eau distillée qsp 1000 ml
	4. Liqueur alcaline B	- Sel de Seignette 200g - Soude caustique NaOH 150g hydroxyde de sodium - Eau distillée qsp 1000 ml
	5. Liqueur ferrique C	- Sulfate ferrique 50g - Acide sulfurique concentré 200g - Eau qsp 1000 ml
	6. Solution de permanganate de potassium 0,1 N	- Permanganate de potassium 3.16g - Eau distillé 1000 ml
Détermination de l'HMF	1. Solution Carrez I	- Ferrocyanure de potassium 10.6g hexacyanoferrate - Eau distillée 100 ml
	2. Solution Carrez II	- Acétate de zinc 24g - Acide acétique glacial 3g - Eau distillée 100 ml
	3. Solution de sulfite de sodium	- 0,20% dans de l'eau distillée - 20g de bisulfite dans 100 ml d'eau.
Anesthésie des rats	1. Solution de Thiopental	-Diluer la solution de thiopental jusqu'à une

		concentration équivalente à 40mg/kg de poids du rat
Activité antibactérienne	1. Solution d'antibiotique témoin (Triméthoprim+Sulfaméthoxazole / Primazol®)	Dissoudre un comprimé de Primazol® dans 5 ml d'eau distillée
	2. Milieu de culture Muller Hinton	Faire fondre le milieu de culture et le couler dans des boîtes de pétri stériles avant de les laisser refroidir
Activité antifongique	1. Solution d'antifongique témoin (Terbinafine / Lamidaz®)	Dissoudre un comprimé de Lamidaz® dans 5 ml d'eau distillée
	2. Milieu de culture Sabouraud	Faire fondre le milieu de culture et le couler dans des boîtes de pétri stériles avant de les laisser refroidir
Dosage des polyphénols	1. Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 10 ^{ème}	Diluer 10ml de réactif de Folin dans 90ml d'eau distillée
	2. Solution de carbonate de sodium à 4%	Peser 4g de carbonate de sodium et les dissoudre dans 100ml d'eau distillée
Identification des polyphénols	1. Mélange de standards	Peser 10mg de chaque standard et dissoudre le tout dans 20ml de méthanol
Divers	<ol style="list-style-type: none"> 1. Eau distillée 2. Eau pour préparations injectables 3. Ethanol 4. Méthanol 5. Acétonitrile 6. Acide formique 7. Manugel 8. Surfanios 	

4.1.4 Animaux

Tableau V Animaux utilisés

	Rats	Souris
Espèce	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i>
Lignée	Wistar	Balb/c
Sexe	Male	Femelle
Poids	170 ±30 g	20 ±4 g
Lieu d'élevage	LNCPP	LNCPP
Age	6 mois	2 mois
Nombre	18	29

Conditions de stabulation :

- Un rat ou 10 souris par cage en polypropylène contenant de la sciure
- Alimentation : granulé pour rongeurs et eau de ville ad libitum
- Température : 22 - 24 °C
- Hygrométrie : 50%
- Eclairage : 12/24h

4.1.5 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans la présente étude est représenté par les souches microbiennes pathogènes provenant d'une collection de culture de référence type American Type Culture Collection (ATCC) dont l'origine est l'institut Pasteur de Paris en France.

Tableau VI Matériel biologique utilisé

Espèce	Référence	Origine
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Institut Pasteur de Paris
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Institut Pasteur de Paris
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Institut Pasteur de Paris
<i>Salmonella sp</i>	ATCC 14028	Institut Pasteur de Paris
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Institut Pasteur de Paris
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Institut Pasteur de Paris
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Institut Pasteur de Paris

4.2 Méthodes

4.2.1 Miel

4.2.1.1 Analyse physico-chimique

4.2.1.1.1 Teneur en eau

4.2.1.1.1.1 Principe

La mesure de la teneur en eau se fait au moyen d'un réfractomètre. Le miel à analyser doit être parfaitement liquide.

La réfractométrie est la technique la plus simple et la plus reproductible pour mesurer le taux d'humidité dans un miel. Le principe de la mesure repose sur la détermination de l'angle limite de réfraction entre deux milieux, l'un solide et d'indice connu et très élevé, la plupart du temps, c'est le "Prisme de Flint", l'autre liquide d'indice inconnu du liquide étudié. L'appareil fournit une lecture directe de l'indice relatif à la raie "D" du Sodium, mais il est possible d'opérer à la lumière naturelle ou encore d'une lampe ordinaire pour lire la valeur [15].

4.2.1.1.1.2 Protocole

Le réfractomètre est d'abord étalonné avec de l'huile dioptrique fournie dans le boîtier.

La surface du prisme est ensuite bien nettoyée puis rincée à l'eau distillée.

Une goutte de miel est déposée sur la platine du prisme d'un réfractomètre qu'on va étaler en rabattant le volet sur le prisme tout en s'assurant de l'homogénéité de l'étalement et qu'aucune bulle d'air est présente.

On dirige le prisme vers une source de lumière (lumière du jour) et on fait une lecture directe du résultat obtenu.

L'appareil étant doté d'un étiquetage ATC (Automatic Temperature Correction), cela signifie que le miel ne nécessite pas un chauffage à 20°C et que la valeur lue ne doit pas être corrigée selon une table de correction comme sur certains appareils plus anciens.



Figure 1 Réfractomètre

4.2.1.1.1.3 Expression des résultats

La lecture est directement faite à travers l'oculaire au niveau de la ligne horizontale de partage entre une zone claire et une zone obscure. Cette ligne coupe une échelle verticale graduée directement en pourcentage d'humidité dans le miel.

4.2.1.1.2 Degré Brix

Le réfractomètre est un appareil de mesure qui détermine l'indice de réfraction de la lumière d'une matrice solide ou liquide. Cet indice s'observe par la déviation d'un faisceau lumineux en fonction de la nature du milieu dans lequel il se propage. L'angle du faisceau dévie en

fonction du taux de matière sèche soluble dans le milieu, plus la concentration de cette matière sèche soluble est élevée, plus la réfraction est importante.

Grâce à cette méthode de réfractométrie, on peut évaluer le taux de matière sèche.

La lecture est faite sur l'échelle qui indique la teneur en matière sèche ou « Degré Brix » qui se trouve en parallèle avec l'échelle de l'indice d'humidité.

La concentration de miel Brix, représente le taux de matières sèches solubles dans le miel, principalement des composés sucrés. Ainsi, Le degré Brix indique la quantité de sucre (en g) contenue dans 100g de miel refroidi à 20°C.

La mesure et la lecture se font de la même façon et au même temps que celle de la teneur en eau

4.2.1.1.3 Degré Baumé et densité

Le degré Baumé est une unité de mesure indirecte de concentration, via la densité, inventée par Antoine Baumé. On le note par °B, °Be ou °Bé. À 20 °C grâce à la méthode de réfractométrie, on peut mesurer directement ce dernier (Degré Baumé) qui nous indique la concentration en matières sèches dans un liquide.

La correspondance entre la densité et les degrés Baumé est la suivante :

- Pour les liquides plus lourds que l'eau (densité > 1) :

$$d = \frac{145}{145 - B^\circ}$$

- Pour les liquides plus légers que l'eau (densité < 1) :

$$d = \frac{140}{B^\circ + 130}$$

Avec :

- d : densité
- B° : degré baumé

On peut utiliser le degré Baumé afin de déterminer la concentration en sucres et il y a une relation directe entre les degrés Baumé et Brix :

$$\text{Degré Baumé} = 0,53 * \text{Degré Brix}$$

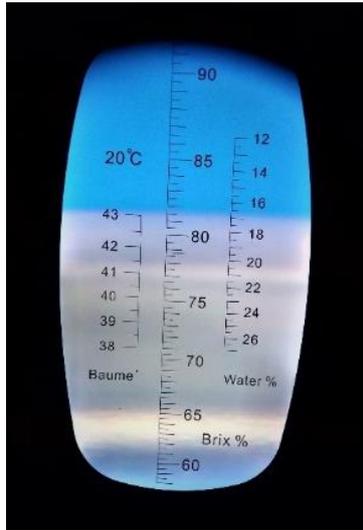


Figure 2 Visualisation des résultats au refractomètre

4.2.1.1.4 Indice de réfraction

4.2.1.1.4.1 Principe

L'indice de réfraction du miel est fonction de sa teneur en eau. Connaissant cet indice, on peut déduire la teneur en eau. Les tables de Chataway donnent directement la correspondance. Le réfractomètre permet une mesure avec une simple goutte de miel, il ne peut toutefois donner un résultat que si, comme cité ci-dessus, le miel est parfaitement liquide [86].

4.2.1.1.4.2 Protocole

Le réfractomètre est réglé à une température de 20°C.

La cuve du réfractomètre est d'abord bien nettoyée avec de l'eau distillée.

Le réfractomètre se calibre à l'air puis à l'eau distillée.

La cuve est rincée avec de l'acétone.

On place une goutte de miel dans la cuve et on lit le résultat sur l'écran.

4.2.1.1.4.3 Expression des résultats

Il existe une formule de calcul développée à partir de la table de conversion de CHATAWAY qui permet de calculer la teneur en eau.

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{-0.2681 - \log(n - 1)}{0.002243}$$

Avec :

- n = indice de réfraction du miel à 20°C

4.2.1.1.5 Conductivité électrique

4.2.1.1.5.1 Principe

La détermination de la conductivité électrique est basée sur la mesure de la résistance électrique qui lui est réciproque. La conductivité électrique d'un fluide correspond à la conductance d'une colonne de liquide comprise entre deux électrodes métalliques de 1 cm² de surface et séparées l'une de l'autre de 1cm. Elle est mesurée par un conductimètre.

Les mesures sont effectuées à 20°C dans une solution aqueuse de miel à 20% (p /v). La lecture est faite directement après immersion de la cellule du conductimètre dans la solution. Le résultat est exprimé en mS/cm

4.2.1.1.5.2 Protocole

Peser 10g de miel dans un bécher de 50ml puis le dissoudre avec un peu d'eau distillée.

Transférer le miel dans une fiole jaugée de 50ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée.

La solution est ensuite transférée dans un autre bécher placé dans un bain thermostaté à 20°C.

Avant la mesure, la cellule du conductimètre est rincée soigneusement avec de l'eau distillée.

Après que la température voulue ait été atteinte, la cellule du conductimètre est plongée dans le bécher pour la mesure de la conductivité électrique.

4.2.1.1.5.3 Expression des résultats

La lecture de la valeur de la conductivité du miel est directement relevée sur l'écran du conductimètre.



Figure 3 Conductimètre

4.2.1.1.6 Taux de cendres

4.2.1.1.6.1 Principe

La teneur en cendres du miel désigne le résidu qui est l'ensemble des produits fixes de l'incinération du miel conduite de façon à obtenir la totalité des cations (ammonium exclu) sous forme de carbonates et d'autres sels minéraux anhydres et qui exprimée en pourcentage de poids. Le miel est incinéré à une température de 625 °C et le résidu est pesé.

4.2.1.1.6.2 Protocole

Mettre les creusets vides dans l'incinérateur à 625 °C pendant quelques minutes, puis dans un dessiccateur jusqu'au refroidissement total.

Peser les creusets vides puis après avoir taré la balance, peser une masse M0 de miel voisine de 5g à 0,01g près.

Porter à l'incinérateur pendant 40 minutes à 625°C jusqu'à obtention de cendres.

La calcination sera poursuivie jusqu'à ce que la différence entre deux pesées consécutives faites à 30 minutes d'intervalle n'excède pas 1mg.

Peser après refroidissement dans un dessiccateur pendant 20 minutes.

4.2.1.1.6.3 Expression des résultats

La teneur en cendres est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendres (g/(100 g de miel))} = \frac{M2 - M1}{M0} * 100$$

Avec :

- M0 : Prise d'essai
- M1 : Poids de la capsule vide avant incinération
- M2 : Poids de la capsule avec les cendres après incinération

4.2.1.1.7 pH**4.2.1.1.7.1 Principe**

C'est la mesure du potentiel hydrogène d'une solution de miel à 10% (p/v) à l'aide d'un pH-mètre. C'est une méthode potentiométrique utilisant une électrode de verre spécifique aux ions H⁺. Le pH-mètre mesure la tension (différence de potentiel) entre ces deux électrodes. Celle-ci est directement liée au pH de la solution dans laquelle la sonde est immergée.

4.2.1.1.7.2 Protocole

On utilise d'abord des solutions tampons pour l'étalonnage du pH-mètre à pH 3,7 (ou 4,0) et 9,0.

On pèse 5g de miel qu'on va dissoudre dans de l'eau distillée puis verser dans une fiole jaugée de 50ml et compléter jusqu'au trait de jauge.

On verse la solution de miel dans un bécher propre.

Le pH est mesuré à 20 °C en plongeant l'électrode du pH-mètre dans la solution de miel.

La valeur du pH s'affiche sur l'écran.

4.2.1.1.7.3 Expression des résultats

La valeur du pH est directement lue sur l'écran du pH-mètre.



Figure 4 pHmètre

4.2.1.1.8 Acidité libre et combinée

4.2.1.1.8.1 Principe

L'acidité libre est l'acidité titrable avec de l'hydroxyde de sodium jusqu'au point d'équivalence ($pH_e = 7$) en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de fin d'équivalence (dosage acidobasique colorimétrique).

L'acidité combinée correspond à l'acidité des lactones qui n'est pas directement titrable et qui est donc titrée en retour par une solution d'acide sulfurique.

L'acidité totale est la somme de l'acidité libre et combinée.

L'acidité est mesurée sur une solution de miel à 10%.

4.2.1.1.8.2 Protocole

On utilise une solution du miel à 10% obtenue par dissolution dans l'eau distillée de 10g de miel pour 100ml de solution. Le pH est d'abord mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

Remplir la 1^{ère} burette avec 10ml de NaOH à 0,05N et la 2^{ème} burette avec 10ml de H₂SO₄ à 0,05N.

Peser une prise d'essai de 5g de la solution de miel à 10%, notée m.

Ajouter 2 à 3 gouttes de bleu de bromothymol (BBT°)

Le milieu réactionnel se colore en jaune (couleur du BBT en milieu acide).

Titrer avec du NaOH à 0,05N jusqu'à coloration du BBT en vert foncé (pH 7).

Relever le volume équivalent de NaOH noté V_{eq} .

Verser le NaOH restant dans le bécher, la solution se colore en bleu.

Sans tarder opérer un dosage en retour avec la burette contenant le H_2SO_4 à 0.05N, jusqu'à virage de la couleur du bleu au vert foncé.

Relever le volume équivalent de H_2SO_4 , noté V_{eq}' .



Figure 5 Couleurs obtenues lors du titrage

4.2.1.1.8.3 Expression des résultats

L'acidité libre, combinée et totales sont calculées avec les formules suivantes :

➤ **Acidité libre :**

$$AL \text{ en meq/kg} = \frac{1000 * V_{eq} * N}{m}$$

Avec :

- AL : Acidité libre en meq/kg
- Veq : Volume équivalent de NaOH en l
- N : Normalité de la solution de NaOH en eq/l
- m : Prise d'essai de la solution de miel en kg

➤ **Acidité combinée :**

$$AC \text{ en meq/kg} = \frac{1000 * [(10 - Veq) * N' - 0.05 * Veq']}{m}$$

Avec :

- AC : Acidité combinée en meq/kg
- Veq : Volume équivalent de NaOH en l
- Veq' : Volume équivalent de H₂SO₄ en l
- N' : Normalité de la solution de H₂SO₄ en eq/l
- m : Prise d'essai de la solution de miel en kg

➤ **Acidité totale :**

$$\text{Acidité totale : } AT = AL + AC$$

Avec :

- AT : Acidité totale en meq/kg
- AL : Acidité libre en meq/kg
- AC : Acidité combinée en meq/kg

4.2.1.1.9 Teneur en sucres

4.2.1.1.9.1 Principe

Le dosage des sucres se fait par la méthode de Bertrand. C'est une méthode d'oxydoréduction qui permet le dosage des oses réducteurs grâce à un dosage en retour, elle est basée sur les propriétés réductrices des oses vis-à-vis des ions Cu²⁺ de la liqueur de Fehling en milieu basique et à l'ébullition. C'est un dosage en plusieurs étapes successives :

Les sucres réducteurs réduisent partiellement la liqueur de Fehling en excès, l'oxyde cuivreux constitué (précipité rouge) est dosé par manganimétrie.

Une table donne la correspondance entre la masse de cuivre et la masse des sucres réducteurs. La réaction doit se dérouler à chaud et pendant trois minutes à partir de l'ébullition pour respecter la correspondance des tables.

Une quantité des sucres réducteurs réagit avec les ions cuivre (II) en excès pour former un précipité rouge brique. L'excès d'ions cuivre (II) est éliminé. Le précipité réagit avec un excès d'ions fer (III) pour le dissoudre. On obtient des ions fer (II) dosés par une solution de permanganate de potassium

Les différentes étapes du dosage impliquent les réactions suivantes :

➤ **1ère étape :**

Réduction de la liqueur alcalino-tartro-cuivrique (FEHLING A+ FEHLING B) par les sucres réducteurs avec formation d'oxyde cuivreux (Cu₂O) de coloration rouge brique.



➤ **2ème étape :**

Réaction de l'oxyde cuivreux avec un excès d'ions ferriques.



➤ **3ème étape :**

Dosage manganimétrique des ions Fe²⁺ formés en milieu acide



Il est nécessaire de déféquer la solution de miel avant d'effectuer le dosage de ces sucres.

Défécation des solutions : Les hydrates de carbone à doser se trouvent généralement mélangés à d'autres substances en solution ou en suspension comme eux et pouvant empêcher ou fausser le dosage des sucres. Ces substances étrangères doivent être éliminées sans que la teneur en hydrates de carbone s'en trouve modifiée ; cette clarification est obtenue en provoquant la formation d'un précipité dans le liquide, opération appelée « défécation ». Les agents de défécation ou clarification doivent donc avoir une action sélective. Certains, tel l'acétate de plomb, agisse par précipitation (sel de plomb) et partiellement par adsorption. Les réactifs de Carrez (hexacyanoferrate II de K et sulfate de Zn) agissent uniquement par adsorption. Ils provoquent la formation d'un précipité à "l'état naissant" entraînant les substances étrangères par "occlusion".

4.2.1.1.9.2 Protocole

❖ Défécation du miel (Mise en solution) :

- Prendre 10g de miel
- Ajouter 2ml de Ferrocyanure de Potassium plus 2ml d'acétate de zinc
- Complète avec l'eau distillée à 100ml
- Laisser la solution de miel 15min au repos puis filtrer

❖ Dosage des sucres réducteurs avant et après inversion :

a) Réduction de la solution cuivrique (Cu^{2+}) par la solution de miel :

Dans une fiole erlenmeyer de 250ml propre (lavée avec HCl dilué et rincée soigneusement), placer :

- 20ml de la solution cuivrique : liqueur de Fehling A.
- 20ml de la solution tartro-sodique : liqueur de Fehling B.
- 10ml de la solution du miel à doser.
- 10ml d'eau distillée.
- Une ou deux pierres ponce afin de régulariser l'ébullition et éviter les projections.
- Chauffer jusqu'à ébullition et maintenir une ébullition douce pendant 3 minutes exactement.

- Laisser refroidir le mélange en maintenant la fiole inclinée pour décanter (déposer) le précipité rouge d'oxyde de cuivre.

Attention : Ne jamais laisser le précipité de Cu_2O à l'air (risque d'oxydation). Toujours le maintenir couvert d'une couche de liquide.

Remarque : le surnageant doit être franchement bleu indiquant que le Cu^{2+} est en excès. Dans le cas contraire, recommencer avec une prise d'essai plus faible ou une dilution de la solution à doser.

b) Lavage du précipité d'oxyde de cuivre :

- Laver le filtre d'Allihn (verre fritté de porosité n°4) avec HCl dilué puis le rincer soigneusement à l'eau distillée. L'adapter sur une fiole à vide.

- Verser le surnageant sur le filtre à l'aide d'un agitateur. Prendre soin d'entraîner le moins de précipité possible et de ne jamais le laisser en contact avec l'air en le maintenant toujours recouvert d'une couche de liquide (Erlen incliné).

- Faire une légère aspiration pour faire passer le liquide versé précédemment sur le filtre, débrancher la trompe à vide alors qu'il reste une hauteur de 1 cm environ de liquide sur le filtre afin d'éviter toute oxydation de quelques particules de précipité éventuellement passées prématurément sur le filtre.

- Recommencer l'opération jusqu'à ce qu'il reste le minimum de surnageant dans l'Erlen.

- Verser environ 20ml d'eau distillée bouillante dans la fiole d'Erlenmeyer, l'agiter pour laver le précipité et laisser décanter le précipité, fiole inclinée.

- Verser à nouveau le surnageant de la fiole d'Erlenmeyer sur le filtre selon la technique décrite précédemment et recommencer le lavage au moins 6 fois afin d'éliminer toute trace de tartrate.

- A la fin du lavage, on obtient que le précipité rouge avec un minimum d'eau distillée claire

c) Oxydation du précipité de Cu_2O par une solution ferrique (Fe^{3+}) :

- Vider la fiole à vide, la rincer soigneusement et replacer le filtre.

- Verser 10ml de solution ferrique sur le précipité (resté dans la fiole d'Erlenmeyer) puis, agiter la fiole erlenmeyer jusqu'à complète dissolution du précipité. La solution devient verte (présence de fer II).
- Verser cette solution sur le filtre en veillant à dissoudre les particules de précipité qui se trouveraient sur celui-ci. Faire passer lentement le liquide dans la fiole à vide.
- Rincer la fiole erlenmeyer avec 2 x 10ml de solution ferrique, transvaser sur le filtre et faire passer lentement.
- Laver encore la fiole erlenmeyer à 3 reprises avec de l'eau distillée et faire passer les eaux de rinçage sur le filtre.

d) Dosage du fer ferreux formé (Fe^{2+}) par manganimétrie :

- Effectuer le dosage des ions fer II formés, directement dans la fiole à vide à l'aide de la solution de permanganate de potassium étalonnée la semaine précédente.
- Verser le permanganate jusqu'à coloration rose persistant 30 secondes. Noter le volume équivalent.

❖ Inversion de solution de miel :

-Prendre 10ml de solution de miel filtré, ajouter 50ml d'eau distillée plus 1ml de HCL concentré ($d=1,19$) puis mettre au bain marie à 75°C pendant 15min.

-Refroidir puis neutraliser avec une solution de NaOH (30%) en présence de phénolphtaléine ensuite avec la solution de HCL à 10% jusqu'à décoloration puis on complète à 100ml avec de l'eau distillée.

❖ Conditions opératoires :

- Le précipité n'est jamais en contact avec l'air pour éviter son oxydation.
- Utiliser de l'eau distillée bouillie pour éviter l'oxydation par l' O_2 dissout dans l'eau.

- Laver abondamment le précipité pour éliminer le tartrate, sinon le virage avec le permanganate ne sera pas visible.

4.2.1.1.9.3 Expression des résultats

Utilisation des tables de Bertrand :

- A partir du volume V_m de $KMnO_4$, calculer la masse de cuivre en mg ayant réagi ($M_{Cu} = 63,54 \text{ g.mol}^{-1}$)
- En déduire la masse du glucose contenue dans la prise d'essai à l'aide de la table de Bertrand.

$$M_{Cu} = 5VKMnO_4 * CKMnO_4 * MM_{Cu}$$

Avec :

- M_{Cu} : Masse du cuivre
- V_{KMnO_4} : volume de $KMnO_4$
- C_{KMnO_4} : concentration de $KMnO_4$ en mol/l
- MM_{Cu} : Masse molaire de $KMnO_4$

Il n'y a pas de proportionnalité entre les masses de cuivre formé et les sucres. On ne peut donc pas utiliser le produit en croix, mais néanmoins une interpolation linéaire est envisageable. De plus, on trouve rarement une masse de cuivre qui est écrite dans le tableau.

Dans l'exemple suivant, on trouve une masse de cuivre de 22 mg.

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

$$\frac{AB}{AC} = \frac{DE}{DF}$$

$$\frac{x - 10}{11 - 10} = \frac{22 - 20,6}{22,6 - 20,6}$$

$$x = 10,7 \text{ mg}$$

Tenir compte des dilutions pour retrouver la concentration en sucre de la solution initiale

4.2.1.1.10 Hydroxyméthylfurfural (HMF)

4.2.1.1.10.1 Principe

La détermination de la teneur en hydroxyméthylfurfural (HMF) par la méthode de White est basée sur la détermination de l'absorbance de l'HMF dans l'UV à 284 nm et à 336 nm. Avec une solution clarifiée de miel contenant 0,2% de sulfite de sodium comme témoin et une solution similaire sans sulfite comme échantillon, on obtient une différence de spectre qui représente la teneur en HMF dans l'échantillon, sans l'absorption interférente du miel et d'autres composants. La teneur en HMF est calculée après soustraction de l'absorbance de fond à 336 nm.

4.2.1.1.10.2 Protocole

Pesez avec précision environ 5g de miel dans un bécher de 50ml.

Dissoudre l'échantillon dans environ 25ml d'eau et transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 50ml.

Ajouter 0,5ml de la Solution Carrez I et mélanger.

Ajouter 0,5ml de la solution Carrez II, mélanger puis compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée (une goutte d'éthanol peut être ajoutée pour éliminer la mousse).

Filtrer la solution avec du papier filtre en jetant les premiers 10ml du filtrat.

Pipeter 5ml dans 2 tubes à essai.

Dans le premier tube, ajouter 5ml d'eau et bien mélanger. Cette solution est considérée comme la solution échantillon.

Dans le deuxième tube, ajouter 5ml de la solution de bisulfite de sodium 0,2% et bien mélanger. Cette solution est considérée comme la solution de référence.

Tableau VII Préparation des solutions de référence et échantillon

	Solution échantillon	Solution de référence
Solution initiale de miel	5,0 ml	5,0 ml
Eau distillée	5,0 ml	-
Solution de bisulfite de sodium à 0,2%	-	5,0 ml

La lecture de l'absorbance de la solution échantillon contre celle de la solution de référence se fait dans les 60min à 284nm et à 336nm. Si l'absorbance à 284nm est supérieure à une valeur d'environ 0,6, la solution échantillon est diluée avec de l'eau distillée et la solution de référence avec une solution de bisulfite de sodium afin d'obtenir des absorbances suffisamment basses.

4.2.1.1.10.3 Expression des résultats

La teneur en hydroxy-méthyl-furfural est exprimée en mg/kg et donnée par la formule suivante :

$$HMF \text{ en mg/kg} = (A_{284} - A_{336}) * 149,7 * 5 * D/W$$

Avec :

- HMF : quantité d'HMF en mg/kg
- A₂₈₄ : absorbance à 284 nm
- A₃₃₆ : absorbance à 336 nm
- 5 : poids théorique de l'échantillon
- D : facteur de dilution éventuelle
- W : poids en grammes de la prise d'essai de l'échantillon
- Le facteur $149,7 = \frac{126 * 1000 * 1000}{16830 * 10 * 5} = \text{constante}$:
 - 126 : masse moléculaire du HMF
 - 16830 : absorptivité molaire ϵ du HMF à $\lambda = 284$ nm
 - 1000 : conversion de grammes de miel en milligrammes
 - 10 : Facteur de dilution 5 dans 50ml
 - 1000 : conversion des grammes de miel en kilogrammes

4.2.1.2 Activité cicatrisante

4.2.1.2.1 Principe

L'essai de Heite-Marcy est un modèle excisionnel qui a été utilisé pour la première fois par Heite en 1953 puis modifié par Marcy pour étudier la re-épithélialisation en surface (cicatrisation épidermique).

Le modèle consiste à pratiquer, à l'aide d'un emporte-pièce, une excision cutanée au niveau de la région cervico-dorsale. L'évolution de la cicatrisation est suivie par une étude clinique [55].

4.2.1.2.2 Protocole

Répartition des animaux en lots et constitution des groupes

Les 18 rats sont sélectionnés, pesés, marqués individuellement puis répartis équitablement et de façon randomisée sur 3 groupes de 1 lot chacun (1 test et 2 témoins + et -), un lot correspond à un prélèvement de 6 rats.

- Un groupe essai constitué d'un lot traité avec notre miel.
- Un groupe témoin positif traité avec de la poudre d'Asiaticoside (Madecassol®).
- Un groupe témoin négatif non traité.

Préparation des animaux

Afin d'éviter la souffrance aux animaux et faciliter leurs différentes manipulations, les rats ont subi une anesthésie générale par administration de 0.5ml de thiopental à 40 mg/kg par voie intra péritonéale ; ils sont ensuite rasés au niveau de la région cervico-dorsale en arrachant leurs poils, le rasage est complété avec une lame si nécessaire.

Excision cutanée

L'excision ainsi que les autres manipulations ont été réalisées dans des conditions d'asepsie rigoureuse. A l'aide d'un tube conique, la surface à exciser est délimitée avec un appui prolongé sur la partie dorsale, les traces du tube laissent apparaître un disque cutané, ce dernier est ensuite prélevé au niveau de la région para-vertébrale avec un bistouri après nettoyage de la région avec de l'eau et du savon afin d'éliminer la crasse puis avec de l'alcool 70° pour éliminer les germes.

Aucune antibiothérapie préventive n'est pratiquée.

Pour réduire la douleur chez les rats excisés, l'injection de 10mg de paracétamol par voie intra péritonéale est effectuée.

Choix de la dose et de la voie d'administration

Une quantité moyenne de 1 à 2ml de miel est appliquée par voie cutanée sur la région dorsale où subsiste la plaie jusqu'à recouvrement total de la surface excisée.

Rythme d'administration

La dose de miel est appliquée à 24 heures d'intervalle sur les plaies, la plaie est ensuite recouverte par une compresse stérile puis entourée par du sparadrap hypoallergénique pour éviter d'irriter la peau des rats.

Les rats témoins se voient aussi changer leurs pansements chaque jour, et le lot témoin positif appliquer la poudre d'asiaticoside (Madecassol®).

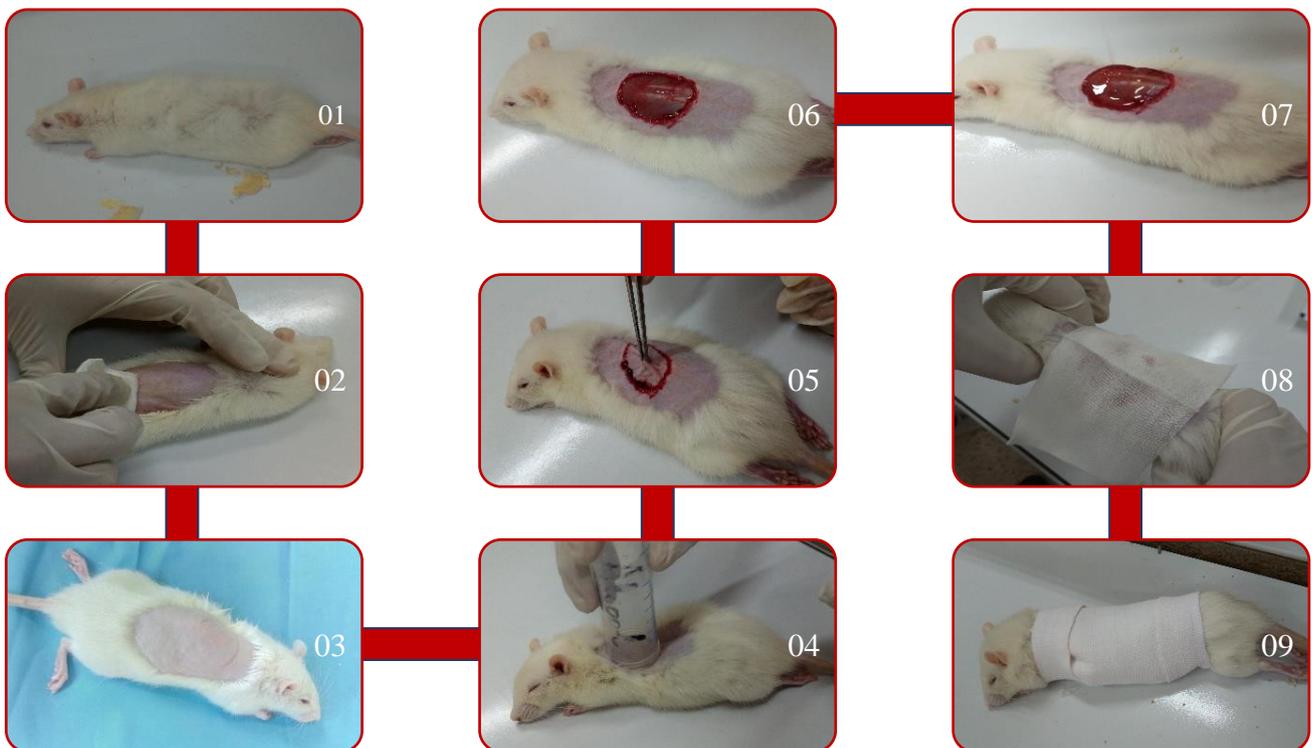


Figure 6 Protocole d'excision et de traitement des rats

Etude clinique

L'évolution de la cicatrisation est suivie en mesurant la surface des plaies pendant toute la période d'expérimentation. Une observation des plaies est aussi effectuée afin de décrire une éventuelle infection ou non, présence ou absence de pus ainsi que l'aspect et l'état général de la plaie.

A cet effet, les plaies sont photographiées et calquées tous les jours avec du papier transparent.

Les calques des plaies sont ensuite repris sur du papier millimétré et leurs surfaces sont mesurées à l'aide du logiciel AutoCAD, un logiciel utilisé en architecture et en génie civil.

4.2.1.2.3 Expression des résultats

A partir des résultats de l'AutoCAD, on calcule le pourcentage de réduction des plaies par jour ou bien le taux de cicatrisation selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de cicatrisation} = \frac{J0 - Jn}{J0} \times 100$$

Avec :

- J0 : Moyenne des surfaces des plaies de 6 rats à J0.
- Jn : Moyenne des surfaces des 6 rats à Jn.

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée par le test de Student dont les résultats sont interprétés comme suit :

- $p > 0,05$: la différence n'est pas significative
- $0,05 > p > 0,01$: la différence est significative
- $0,01 > p > 0,001$: la différence est hautement significative
- $p < 0,001$: la différence est très hautement significative

4.2.1.3 Activité antibactérienne

4.2.1.3.1 Principe

L'évaluation du pouvoir antibactérien est réalisée par la technique de diffusion sur milieu gélosé par imprégnation de disque. Cette technique consiste à déposer des disques de papier de 9mm imprégnés d'une concentration connue du miel à tester, sur une gélose Mueller-Hinton (MH) ensemencée préalablement avec un inoculum connu de la bactérie à étudier.

Le miel diffuse à partir du centre du disque vers la périphérie, en décrivant un gradient de concentration (tout autour du disque). Après 24 heures d'incubation, il se produit un halo (zone) d'inhibition circulaire qui permet de mesurer un diamètre. La mesure du diamètre se fait à l'aide d'un pied à coulisse. Ce diamètre est proportionnel à l'activité antibactérienne du miel étudié vis-à-vis de la souche testée

Les diamètres d'inhibition sont comparés à ceux obtenus avec un antibiotique de référence qui est l'association Triméthoprime+Sulfaméthoxazole dosée à 400mg/80mg (Primazol[®])

4.2.1.3.2 Protocole

Toutes les étapes du protocole ont été réalisés sous une hotte de sécurité biologique et dans des conditions d'asepsie rigoureuses avec tous les équipements de protection nécessaires afin d'éviter tout risque de contamination.

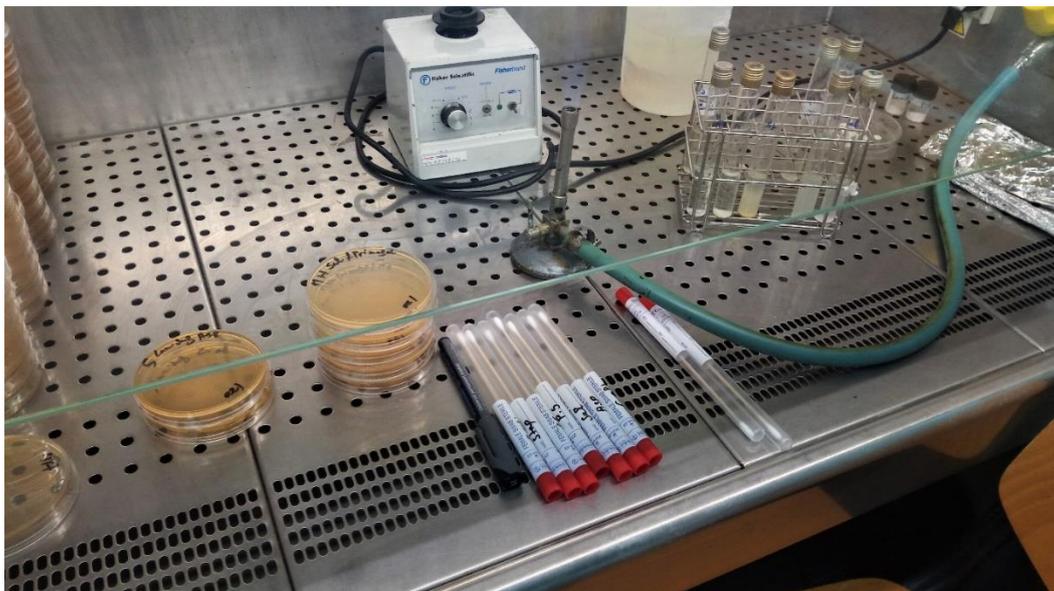


Figure 7 Zone de travail

Préparation des dilutions de miel :

4 dilutions de miel ont été effectuées dans des tubes stériles avec de l'EPPI (% v/v) :

- Miel pur à 100 % ;
- Dilution de miel à 75 % ;
- Dilution de miel à 50 % ;
- Dilution de miel à 25 %.

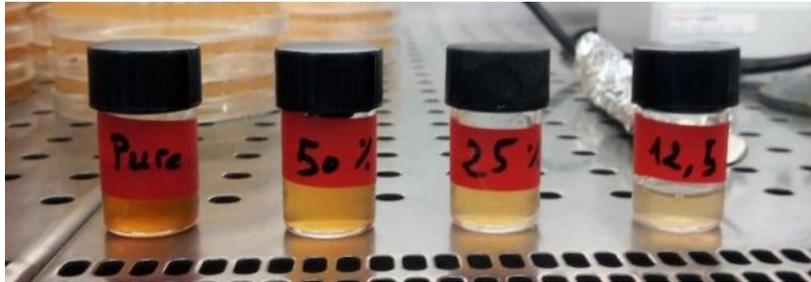


Figure 8 Dilutions de miel préparées

Préparation de l'inoculum

La méthode consiste à préparer une suspension bactérienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester d'une jeune culture de 48 à 72 h ; les suspensions sont ensuite introduites dans des tubes à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile (Na Cl à 0.9 %). La suspension est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Farland ou à une DO (densité optique) au densitomètre de 0.08 à 0.10 Mc Farland à 625 nm, ce qui correspond à une concentration de 10^7 - 10^8 UFC/ml (unités formant les colonies/ml).



Figure 9 Suspensions bactériennes préparées

Ensemencement des colonies bactériennes

L'ensemencement est réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile en utilisant la Méthode de Kirby-Bauer qui est recommandée par l'OMS.

L'écouvillon est imbibé de la suspension bactérienne, essoré ensuite sur la paroi intérieure du tube puis l'ensemencement est réalisé en faisant des stries serrées à la surface de la gélose préalablement préparée dans des boîtes de pétries stériles. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de pétrie de 60° à chaque fois ; la dernière étape de l'ensemencement est de faire passer l'écouvillon sur toute la périphérie de la gélose.

Les boîtes sont ensuite laissées imprégner sous la hotte pendant 5 minutes à température ambiante puis sont fermées en remettant leurs couvercles.



Figure 10 Milieu de culture ensemené par méthode de Kirby-Bauer

Dépôt des disques imprégnés

Les disques de papier sont imprégnés aseptiquement dans les différentes dilutions de miel jusqu'à saturation, ils sont ensuite déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose inoculée et ensemenée. Il faut appuyer sur le disque pour s'assurer d'un contact uniforme avec la gélose ; laisser enfin les boîtes à la surface de la hotte pendant 15 minutes à température ambiante afin de permettre la diffusion du miel.

Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

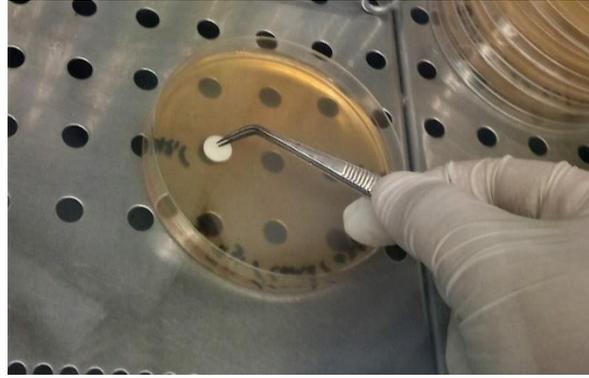


Figure 11 Dépôt d'un disque d'antibiotique

4.2.1.3.3 Expression des résultats

L'activité antibactérienne du miel est détectée par la présence ou l'absence d'un halo d'inhibition autour du disque. Plus le diamètre du halo d'inhibition est grand, plus le miel possède une forte activité antibactérienne vis-à-vis de la souche étudiée. Les diamètres sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

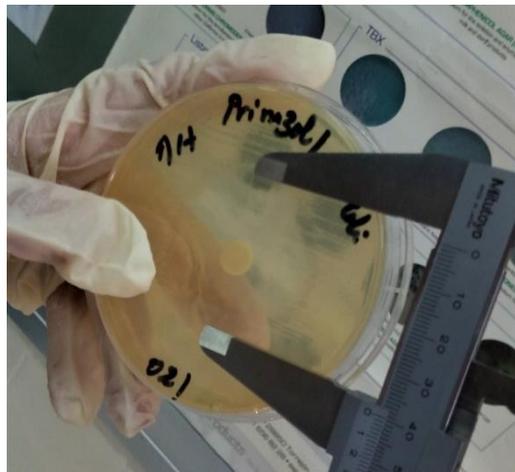


Figure 12 Mesure des diamètres d'inhibition

4.2.1.4 Activité antifongique

Le principe, le protocole et l'interprétation des résultats des méthodes pour déterminer l'activité antibactérienne et l'activité antifongique sont identiques. Les seules différences sont :

- Le milieu de culture utilisé est la gélose Sabouraud
- L'incubation se fait dans une étuve à 32 °C pendant 48 à 72h
- L'antifongique de référence est la Terbinafine 250mg (Lamidaz®)

4.2.2 Pollen

4.2.2.1 Test de toxicité aigue

4.2.2.1.1 Principe

L'essai de toxicité aigüe par méthode de l'ajustement des doses de l'OCDE permet d'estimer la DL50 en utilisant le moins d'animaux possible et d'observer les signes de toxicité éventuelle.

Il consiste à administrer par voie orale une progression de doses uniques sur les animaux, un par un, à des intervalles d'au moins 48 heures. Le premier animal reçoit une dose qui se situe juste en dessous de la meilleure estimation de la DL50. S'il survit, la dose administrée à l'animal suivant équivaut à la dose initiale multipliée par un facteur déterminé ; s'il meurt, la dose de l'animal suivant est divisée par ce même facteur. Chaque animal est observé attentivement durant 48 heures au minimum à la recherche de signe de toxicité ou de morbidité avant de décider de poursuivre le traitement sur le prochain animal.

Le test s'arrête lorsqu'un des critères suivants est satisfait :

- 03 animaux en série survivent à la dose la plus forte ;
- 05 inversions de résultat se produisent dans une série de six animaux traités successivement ;
- Au moins 04 animaux ont suivi la première inversion [87, 88].

4.2.2.1.2 Protocole

Préparation des animaux

Les souris sont choisies au hasard, marquées individuellement à dessein d'identification et gardées dans leur cage au moins 5 jours avant l'administration du pollen afin qu'elles s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Elles sont privées de nourriture, mais pas d'eau, 3 à 4 heures avant l'administration.

Préparation des doses

La dose initiale administrée à la première souris est de 5mg/kg. Si elle survit sans signe de toxicité au bout de 48 heures, la dose suivante est administrée à une autre souris ; si elle meurt, la dose inférieure est administrée à la souris suivante.

La progression de doses suivantes a été suivie : 5mg/kg, 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, 300mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg, 2000mg/kg et 5000mg/kg.

Les doses ont été préparées selon le poids à jeun de chaque souris et de façon à avoir un volume final à administrer de 0,5ml en solubilisant la quantité adéquate de pollen dans de l'eau distillée avant de mélanger au vortex.

Administration

0,5ml de la suspension de pollen correspondant à la dose adéquate est administré par gavage oral en une seule fois à l'aide d'une sonde gastrique.

4.2.2.1.3 Expression des résultats

Chaque souris est observée attentivement pendant 14 jours à la recherche de signes de toxicité, notamment d'apparition tardive, et leur poids est suivi durant toute cette période afin de détecter d'éventuels signes de morbidité.

4.2.2.2 Apport nutritionnel

4.2.2.2.1 Principe

Le pollen est connu pour avoir une valeur nutritionnelle très élevée grâce à sa composition en acides aminés essentiels, vitamines et minéraux. Il est utilisé comme supplément alimentaire dans le cas de carences.

Pour évaluer cet apport nutritionnel, un lot de souris est supplémenté en pollen à une doses non toxique et leur poids est suivi et comparé à celui d'un groupe témoin non-supplémenté [41].

4.2.2.2.2 Protocole

18 souris sont sélectionnées, pesées, marquées individuellement et divisées en 2 lots (1 test et 1 contrôle) de 9 souris chacun et de poids moyens équivalents.

Le lot test se voit administrer quotidiennement, à la même heure et par gavage oral 0,5ml de suspension de pollen correspondant à une dose de 5000mg/kg, en supplémentation de leur alimentation normale.

Le lot contrôle se voit administrer lui aussi quotidiennement 0,5ml d'EPPI afin d'obtenir les mêmes conditions expérimentales.

4.2.2.2.3 Expression des résultats

Les souris sont observées attentivement et pesées quotidiennement durant 15 jours. Les poids obtenus sur chacun des lots sont évalués statistiquement afin de conclure ou non à un apport de la supplémentation en pollen.

D'éventuels signes de toxicité dus à l'administration répétée sont aussi recherchés

4.2.2.3 Extraction des polyphénols

4.2.2.3.1 Principe

L'extraction de principes actifs à partir de matière végétale, notamment les polyphénols, se base sur la solubilité de ces derniers dans différents solvant d'extractions ou mélange de solvants. Selon l'origine botanique du pollen, il y existe une grande diversité structurale des polyphénols ce qui implique une grande variabilité dans le rendement qualitatif et quantitatif de l'extraction selon la composition et la polarité du solvant et les conditions physico-chimiques (température, agitation, ultrasons, ...) [89].

4.2.2.3.2 Protocole

Trois méthodes d'extraction différentes ont été utilisées et comparées afin de déterminer celle présentant le meilleur rendement total et en polyphénols :

Méthode 01

Peser précisément 1g de pollen, le transvaser dans un tube à vis et ajouter 3ml de solvant composé d'eau, éthanol et méthanol (1/1/1). Fermer le tube, agiter vigoureusement et placer dans un bain à ultrasons pendant 30min. Centrifuger à 14000 tr/min et filtrer avec un filtre-seringue de porosité 45µm. Stocker au frais jusqu'à analyse.

Méthode 02 et 03

Peser précisément 1g de pollen, le transvaser dans un tube à vis et ajouter 10ml d'éthanol (méthode 02) ou de méthanol (méthode 03). Fermer le tube, agiter vigoureusement et placer dans un bain-marie à 70° pendant 30min puis filtrer. Stocker au frais jusqu'à analyse.

4.2.2.3.3 Expression des résultats

Le rendement massique total de l'extraction est obtenu après évaporation de l'extrait dans un bécher par la formule suivante :

$$r_T(\%) = \frac{m_{ap} - m_b}{m_p} * 100$$

Avec :

- r_T : rendement massique total de l'extraction en pourcentage
- m_b : masse du bécher vide
- m_p : masse du pollen extrait
- m_{ap} : masse après évaporation

4.2.2.4 Dosage des polyphénols

4.2.2.4.1 Principe

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin Ciocalteu est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu réactionnel et l'absorbance maximale de la solution est situé entre 700 et 760nm [90].

4.2.2.4.2 Protocole

Le dosage des polyphénols s'effectue sur l'extrait évaporé puis repris par 10ml d'eau distillée.

Dans un tube en verre, mettre 0,5ml de la solution à doser. Y ajouter 2ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au $10^{\text{ème}}$ et 2ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 4% m/m. Mélanger au vortex et incuber 2h dans le noir à température ambiante. Lire l'absorbance à 740nm. Si l'absorbance mesurée dépasse celle de la gamme étalon, effectuer une dilution [83].

Une gamme étalon de 5 points est réalisée à partir d'une solution mère d'acide galique à 1mg/ml (25mg d'acide galique dans 25ml d'eau distillée) selon les dilutions suivantes :

Tableau VIII Préparation de la gamme étalon

	Concentration	Solution mère (ml)	Solvant (ml)
E ₁	20 µg/ml	0.1	4.9
E ₂	40 µg/ml	0.2	4.8
E ₃	60 µg/ml	0.3	4.7
E ₄	80 µg/ml	0.4	4.6
E ₅	100 µg/mg	0.5	4.5



Figure 13 Gamme étalon

4.2.2.4.3 Expression des résultats

La concentration de l'extrait est déduite en utilisant la courbe d'étalonnage et le rendement en polyphénols est exprimée en mg d'équivalent d'acide galique par g de pollen et obtenu selon la formule suivante :

$$r_{pp}(\text{mg EAG/g de pollen}) = C * 10 * f$$

Avec :

- r_{pp} : rendement de l'extraction en mg d'acide galique par g de pollen
- C : concentration de l'extrait en mg/ml
- f : facteur de dilution éventuelle

4.2.2.5 Identification des polyphénols

4.2.2.5.1 Principe

Les polyphénols ont été séparés et identifiés par R-HPLC couplée à un détecteur UV-Visible.

La Chromatographie liquide haute performance (HPCL) est une technique chromatographique de séparation de composés non-volatils de haut poids moléculaire par phénomène d'adsorption (HPLC phase normale) ou de partage (HPLC en phase inverse ou R-HPLC). En R-HPLC, la phase stationnaire est apolaire et permet de plus ou moins retenir et ainsi obtenir la séparation, selon leur structure chimique, des composés qui seront détectés en sortie de colonne par un détecteur approprié [91].

4.2.2.5.2 Protocole

Préparation des échantillons et des standards :

Deux dilutions de l'extrait de pollen au 10^{ème} et au 20^{ème} sont préparées et filtrées avec un filtre seringue de porosité 45µm.

Les standards sont préparés par solubilisation de 10mg de chaque standard (acide gallique, acide coumarique, acide cinnamique et acide caféique) dans 20ml de méthanol.

Conditions d'analyses :

Les conditions expérimentales suivantes ont été fixées pour une séparation et détection optimale des polyphénols :

- Colone de type C18, de 25cm de longueur et composée de particules de 5µm de diamètre ;
- Détection UV à 280nm ;
- Température de 30° ;

- Volume d'injection de 10µl avec un débit de 1ml/min ;
- Temps d'analyse de 40min.

Phase mobile et gradient d'éluion :

La phase mobile est composée d'acide formique à 0,1% (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B).

Les échantillons sont élués selon le gradient de concentration suivant :

- 0min à 32min : 4% de B et 96% de A ;
- 32min à 34,4min : 100% de B ;
- 34,4min à 40min : 4% de B et 96% de A.

4.2.2.5.3 Expression des résultats

Les résultats sont sous la forme de chromatogrammes avec des pics caractéristiques correspondant à chaque composé. L'identification des polyphénols se fait par comparaison des pics obtenus à partir de l'extrait à ceux de la solution de standards.

Partie expérimentale

RESULTATS

5 Résultats

5.1 Miel

5.1.1 Analyse physico-chimique

Le tableau suivant présente les résultats obtenus suite à l'analyse physico-chimique de notre échantillon de miel ainsi que les normes relatives des différents paramètres selon le Codex Alimentarius et le projet de l'Union Européenne :

Tableau IX Résultats de l'analyse physico-chimique du miel

Critères de qualité du miel	Miel analysé	Normes Codex	Normes UE
Indice de réfraction	1.49	/	/
Densité (g/cm ³)	1.42 g/cm ³	1,39 - 1,44 à 20 °C	1,39 - 1,44 à 20 °C
Conductivité électrique (mS/cm)	0.66 mS/cm	≤ 0,8 mS/cm	≤ 0,8 mS/cm
pH	3.83	3,5 - 4,5	3,5 - 4,5
Teneur en eau (réfractomètre manuel Abbe) (%)	17 %	≤ 20 %	≤ 20 %
Teneur en eau (Digital Refractometer) (%)	17.92 %		

Degré Brix °	81.5	/	/
Degré Baumé °	43	/	/
Teneur en matières minérales (cendres) (g/100 g)	0,31 g/100 g	≤ 1.2 g/100 g	≤ 1.2 g/100 g
Acidité libre (meq/kg)	2 meq/kg	≤ 50 meq/kg	≤ 50 meq/kg
Teneur en sucres réducteurs (g/100 g)	72.61 %	≥ 45 g/100 g	≥ 45 g/100 g
Teneur en saccharose (g/100 g)	2.42 %	≤ 5 g/100 g	≤ 5 g/100 g
Teneur en HMF (mg/kg)	0,43 mg/kg	≤ 40 mg/kg	≤ 40 mg/kg

Tous les résultats obtenus pour les paramètres de qualité sont conformes aux normes internationales du Codex Alimentarius et de l'Union Européenne. Ainsi, par exemple la teneur en eau est inférieure à 20%, le teneur en HMF à 40mg/kg et la teneur en saccharose à 5%. Ces 3 paramètres étant les principaux indicateurs de la qualité et de la bonne conservation d'un miel.

5.1.2 Activité cicatrisante

L'évolution de la surface des plaies des groupes test, témoin + et témoin - sont représentés dans les figures ci-dessous :

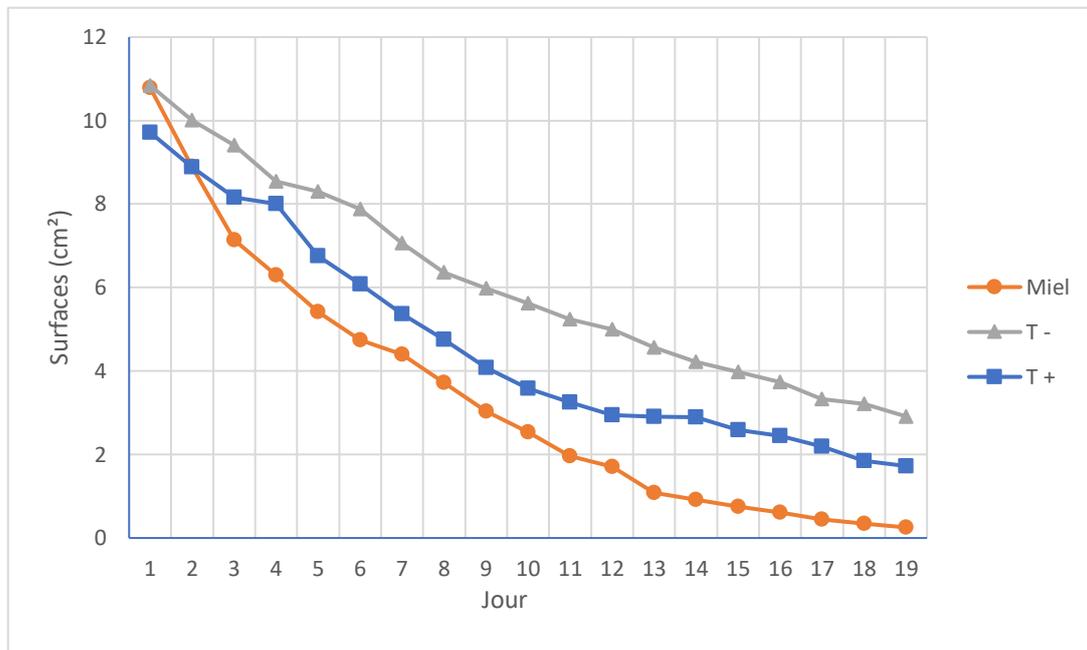


Figure 14 Evolution de la surface des plaies des rats des groupes Test et Témoins + et -

L'étude statistique par test de Student des données a donné les résultats suivants :

Tableau X P-valeurs obtenues par test de Student sur les surfaces des plaies

Jour	p-valeur	
	Tests et T+	Tests et T-
J03	0.001	0.001
J05	0.0007	0.0008
J10	0.04	0.0001
J12	0.01	0.00008
J16	0.01	0.0006
J18	0.02	0.0001

Ces résultats montrent que dès le 3^{ème} jour, il y a une différence significative (p-valeur <0.05) entre l'évolution de la surface des plaies traitées avec notre miel et celles traitées avec la poudre d'Asiaticoside (témoins +). Cette différence est encore plus significative (p-valeur <0.05) avec les plaies des rats non traités (témoins -).

Au 18^{ème} jour, on a constaté une fermeture totale des plaies traitées par le miel, tandis que les plaies des témoins n'ont pas aussi bien guéries. La moyenne des surfaces des plaies des rats traités avec notre miel est de 0.25 cm² contre 1.72 cm² pour les témoins positifs et 2.91 cm² pour les témoins négatifs.

La vitesse moyenne de cicatrisation a aussi été calculée et elle s'avère nettement plus rapide avec le miel comparée à celle des deux témoins. Elle est de l'ordre de 0.59 cm²/jour pour le miel et de 0.44 cm²/jour pour les deux témoins respectifs. On constate donc une vitesse de cicatrisation de 0.15 cm²/jour plus rapide que les témoins.

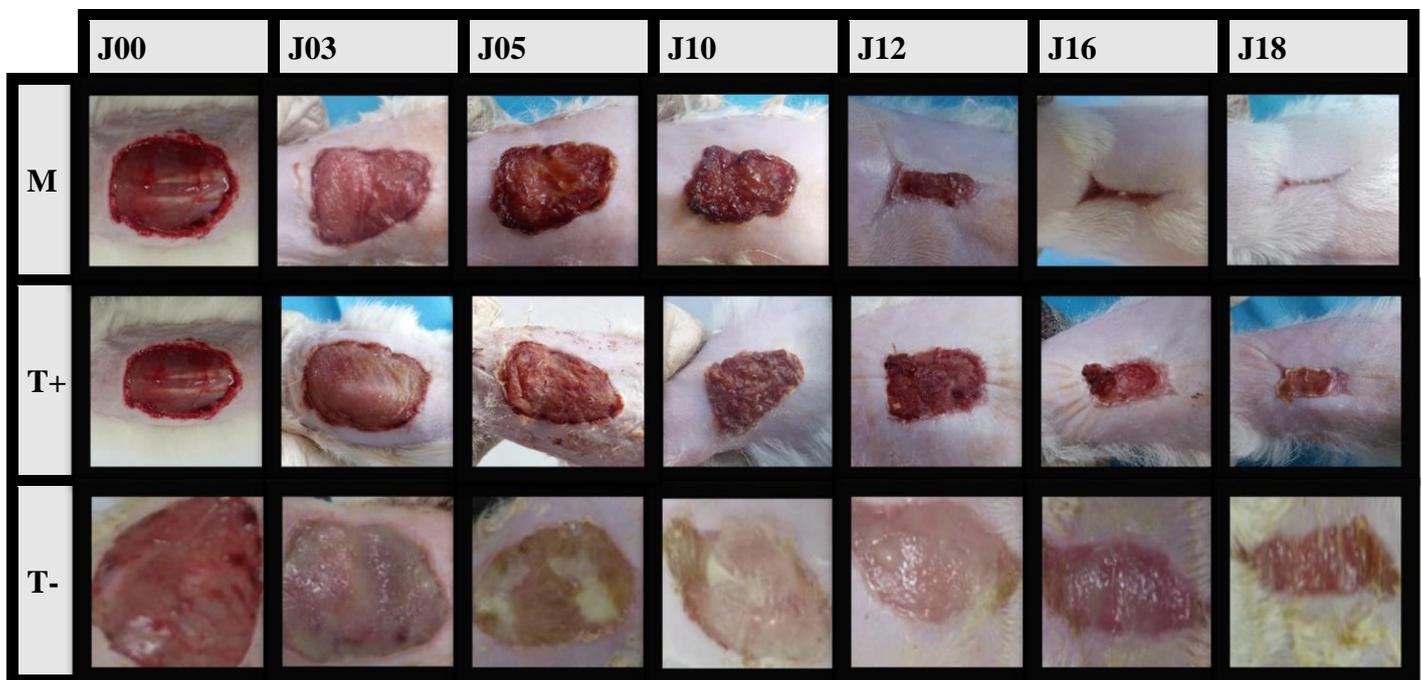


Figure 15 Plaies des rats traités avec du miel et des témoins + et -

Nous n'avons remarqué aucune surinfection pour les rats traités avec le miel et la poudre d'Asiaticoside, pas de suppurations ni d'odeurs indésirables, les plaies étaient sèches et ont formé des croûtes dès le 3^{ème} jour. Par contre les plaies des témoins négatifs ont représenté quelques suppurations et odeurs. La repoussée des poils autour de la plaie a elle aussi été régulière et complète.

Quant au changement de pansements, l'étape a été relativement difficile les 3 premiers jours, mais on a constaté une bonne coopération et une meilleure facilité lors des jours restants avec la formation d'une croûte et des pansements qui n'adhéraient pas à la plaie.

Au bout du 18^{ème} jour, la qualité de la cicatrice à terme s'est avérée très satisfaisante avec un aspect très régulier, c'est-à-dire non chéloïde et relativement esthétique, pour ne pas dire presque invisible après la repoussée totale des poils.

Les taux de cicatrisation ont été calculés et étudiés statistiquement :

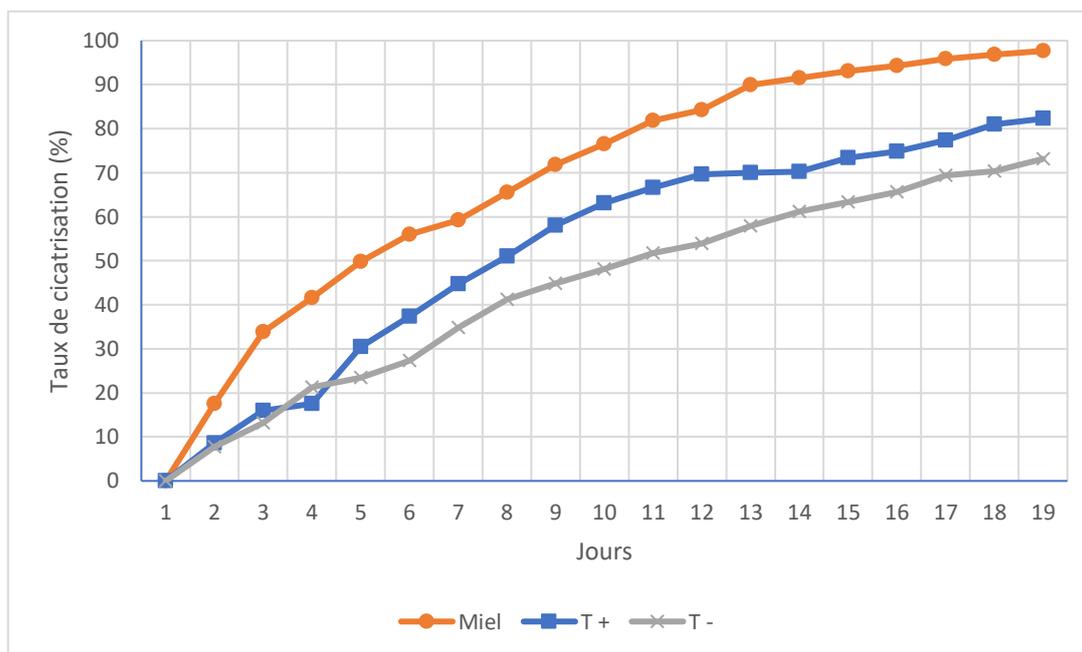


Figure 16 Evolution du taux de cicatrisation des rats des groupes Test et Témoins + et -

Tableau XI P-valeurs obtenues par test de Student sur les taux de cicatrisation

Jour	p-valeur	
	Tests et T+	Tests et T-
J03	0.0004	0.002
J05	0.0005	0.0001
J10	0.04	0.001
J12	0.01	0.0007
J16	0.01	0.001
J18	0.01	0.0005

De la même façon que lors de l'étude de la surface des plaies, les résultats montrent que dès le 3^{ème} jour, il y a une différence significative (p valeur <0.05) entre les taux de cicatritions des plaies des rats traités avec notre miel et les taux de cicatritions des plaies des rats traités avec la poudre d'Asiaticoside (témoins +). Cette différence est encore plus significative lorsqu'on compare avec les taux de cicatritions des plaies des rats non traités (témoins -).

On constate que le taux de cicatritions atteint 97.65 % chez les plaies traitées avec notre miel, tandis qu'il est à 82.26 % chez les plaies traitées avec la poudre d'Asiaticoside (témoins +) et à 73.14 % chez les plaies non traitées (témoins -).

Au 18^{ème} jour, l'apport du miel au taux de cicatritions est estimé à 24,51% contre 9,12% pour le témoin positif.

5.1.3 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du miel est basée sur les mesures des diamètres en mm des halos d'inhibition de différentes dilutions de l'échantillon de miel. Ces mesures permettent de déterminer l'activité antimicrobienne du miel in vitro et de la comparer à celle d'un antibiotique de référence, le Primazol[®] (Sulfaméthoxazole/Triméthoprime).

Les diamètres d'inhibition obtenus avec le Primazol[®] sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XII Diamètres d'inhibition obtenus avec le Primazol[®]

Souche bactérienne	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	47
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	43
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	25
<i>Salmonella sp</i> ATCC 14028	41
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	38

Le profil de sensibilité des bactéries aux antibiotiques ou au miel peut être déterminé par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques sur boîtes.

Vu l'absence d'une référence de lecture qui détermine le seuil de sensibilité nous avons considéré une souche sensible si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10mm et résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10mm. La sensibilité est intermédiaire si le diamètre est égal à 10mm.

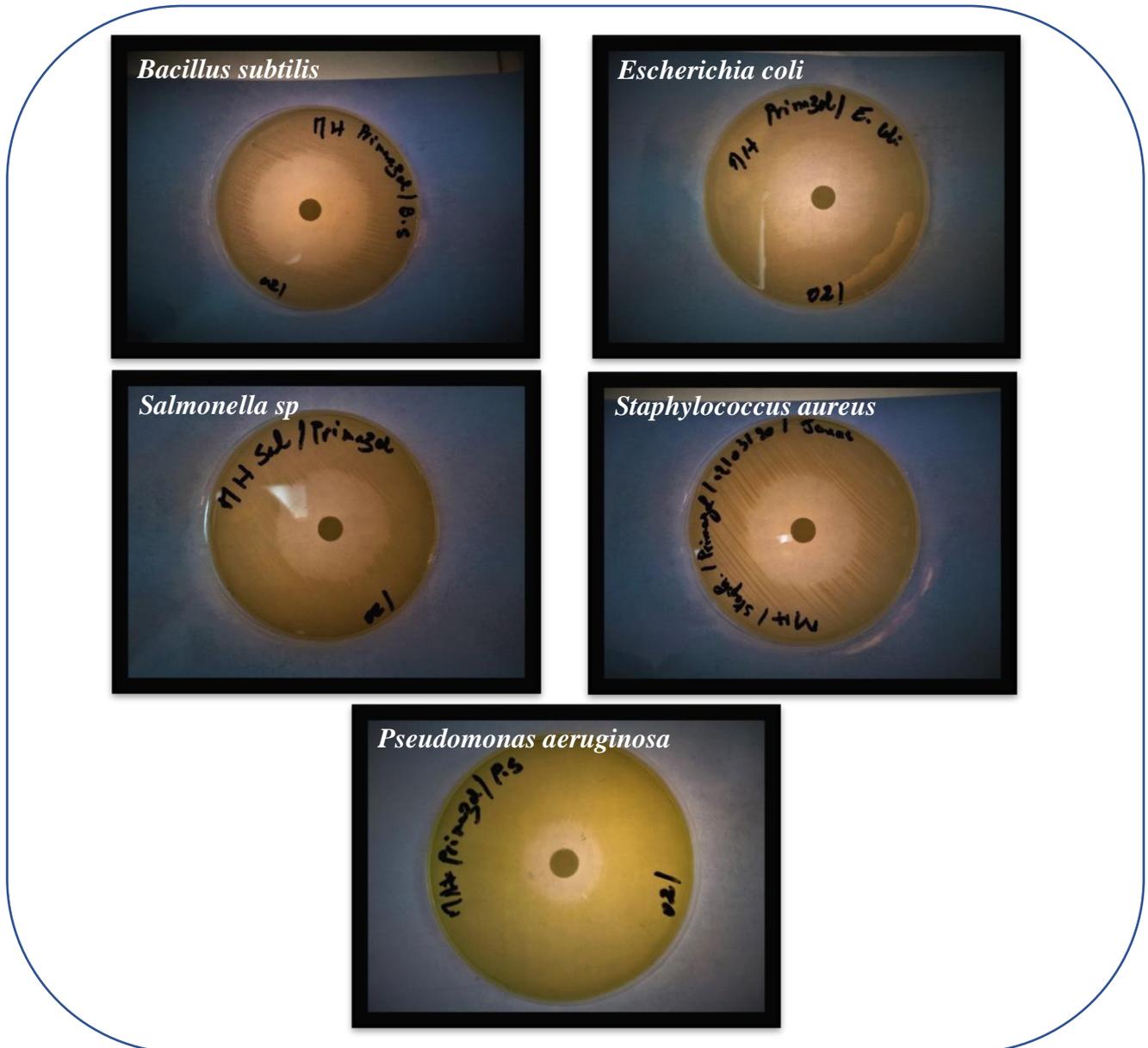


Figure 17 Diamètres obtenus avec l'antibiotique de référence (Primazol®)

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne du miel sont résumés dans les figures suivantes où les dilutions utilisées sont respectivement représentées par les lettres : A (12,5%), B (25%), C (50%) et D (100%).

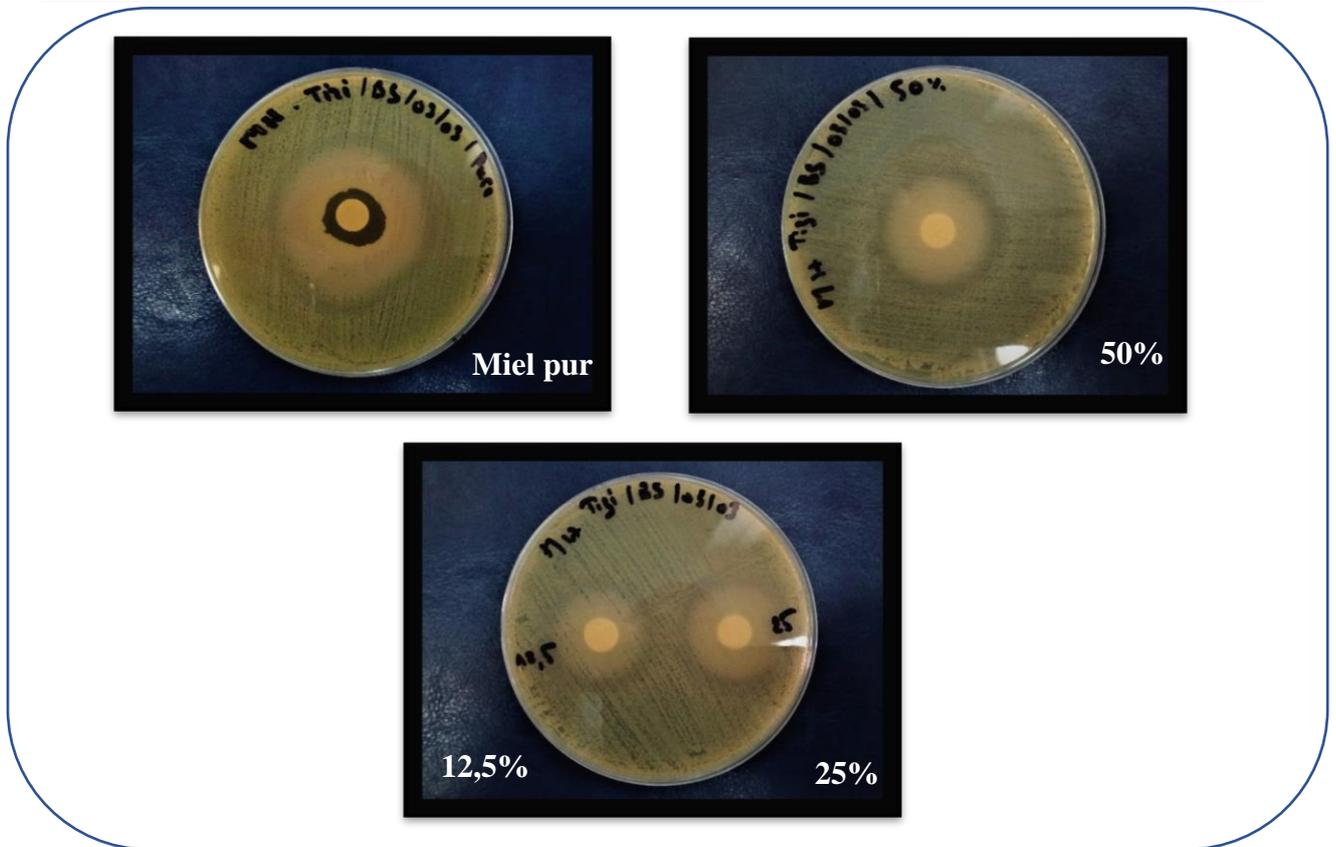


Figure 18 Diamètres obtenus avec le miel sur *Bacillus subtilis*

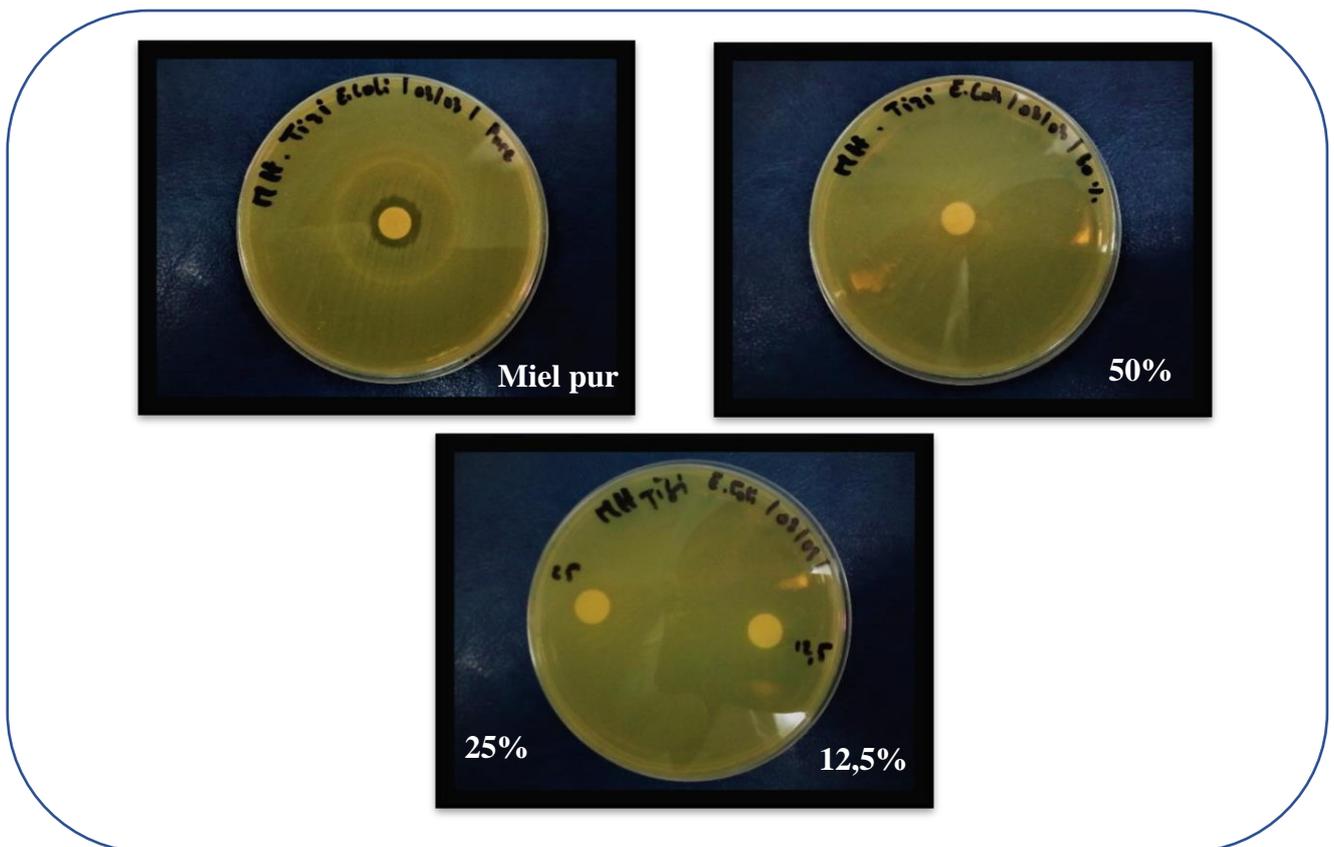


Figure 19 Diamètres obtenus avec le miel sur *Escherichia coli*

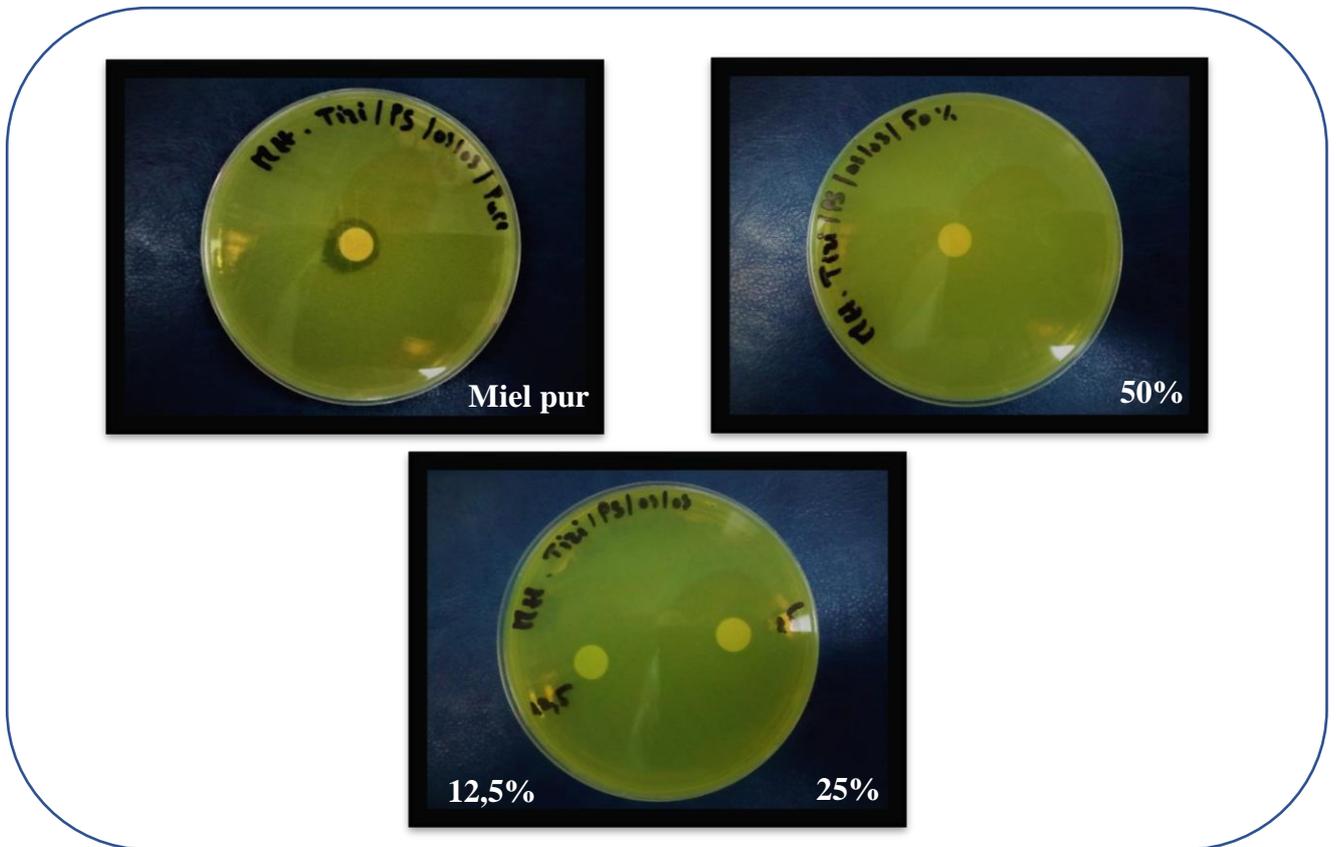


Figure 20 Diamètres obtenus avec le miel sur *Pseudomonas aeruginosa*

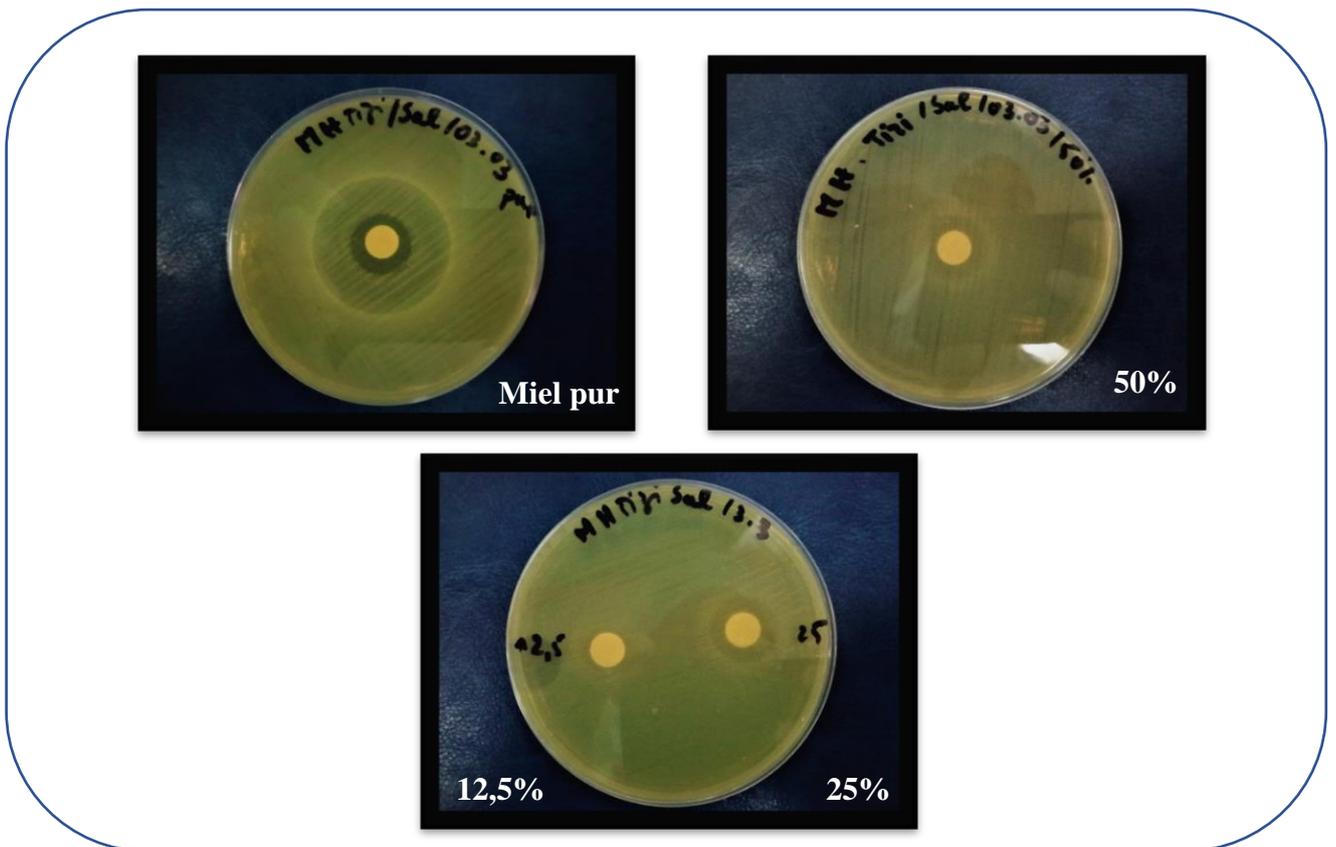


Figure 21 Diamètres obtenus avec le miel sur *Salmonella sp*

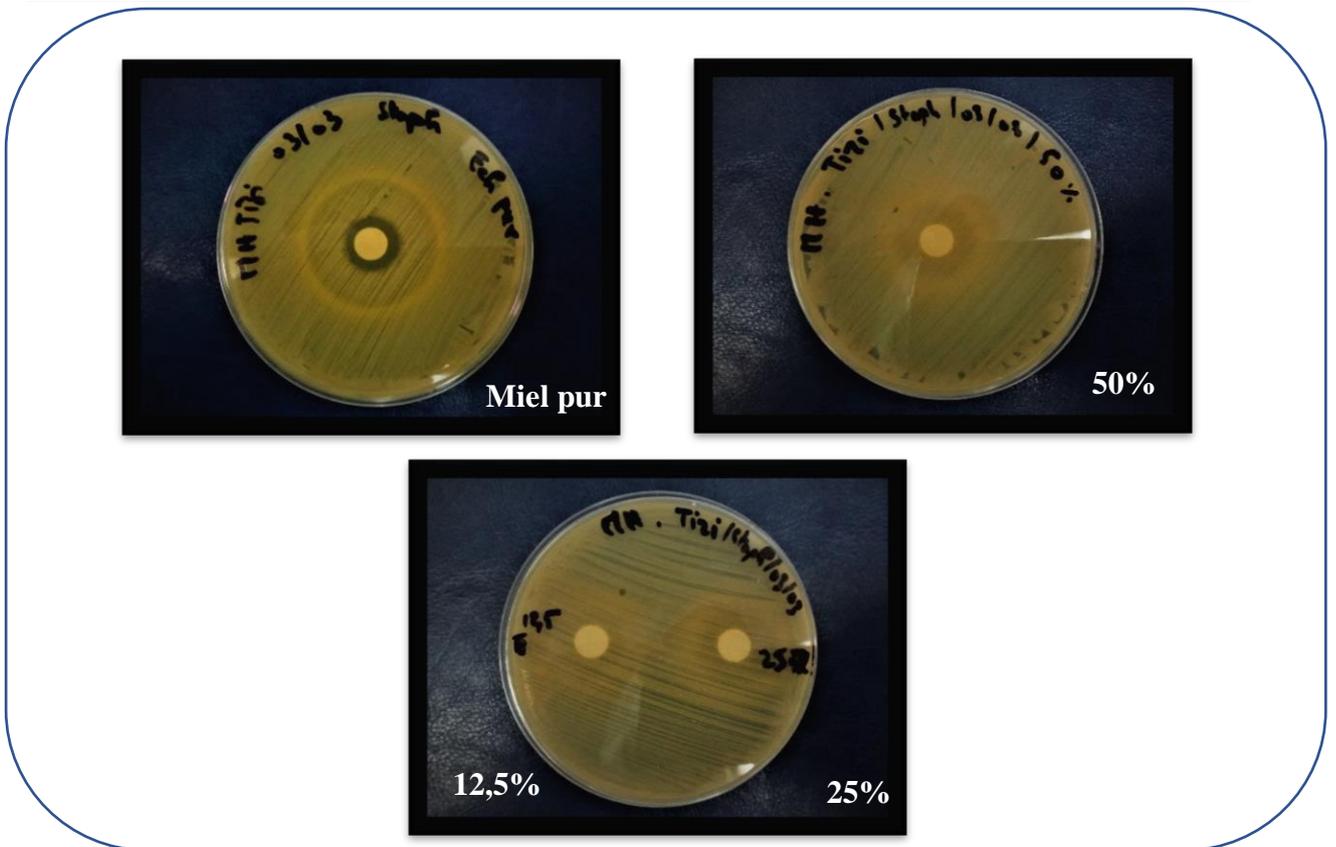


Figure 22 Diamètres obtenus avec le miel sur *Staphylococcus aureus*

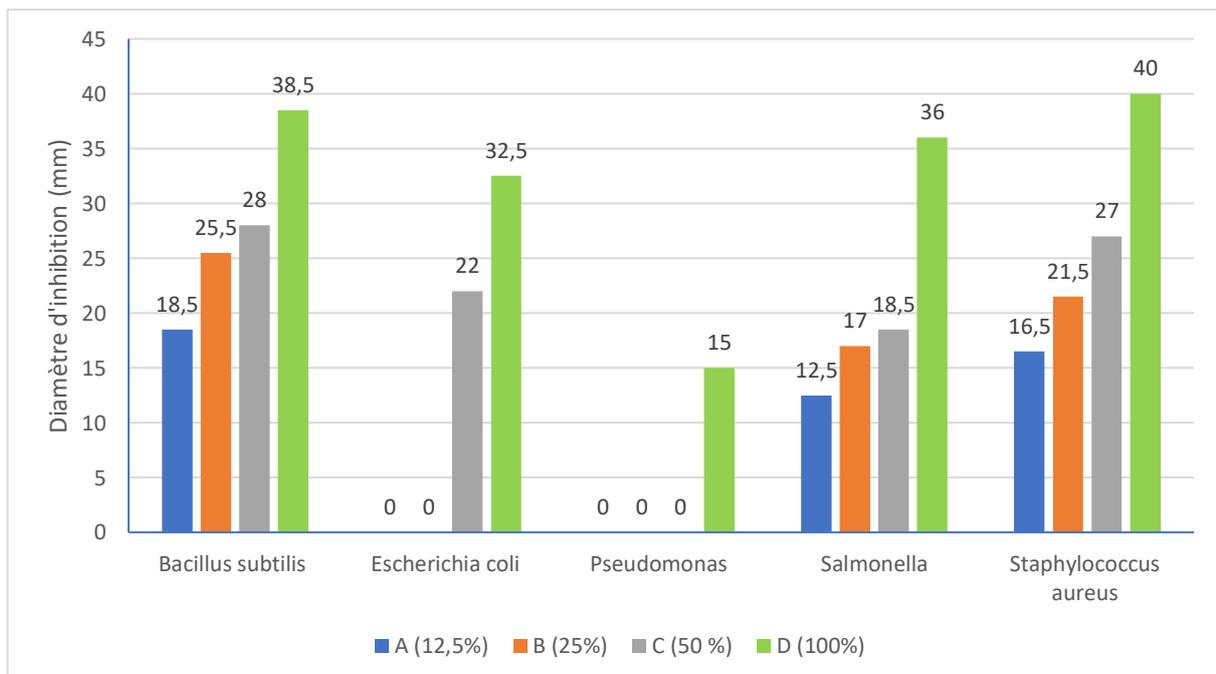


Figure 23 Diamètres d'inhibition obtenus avec le miel en fonction de la souche bactérienne

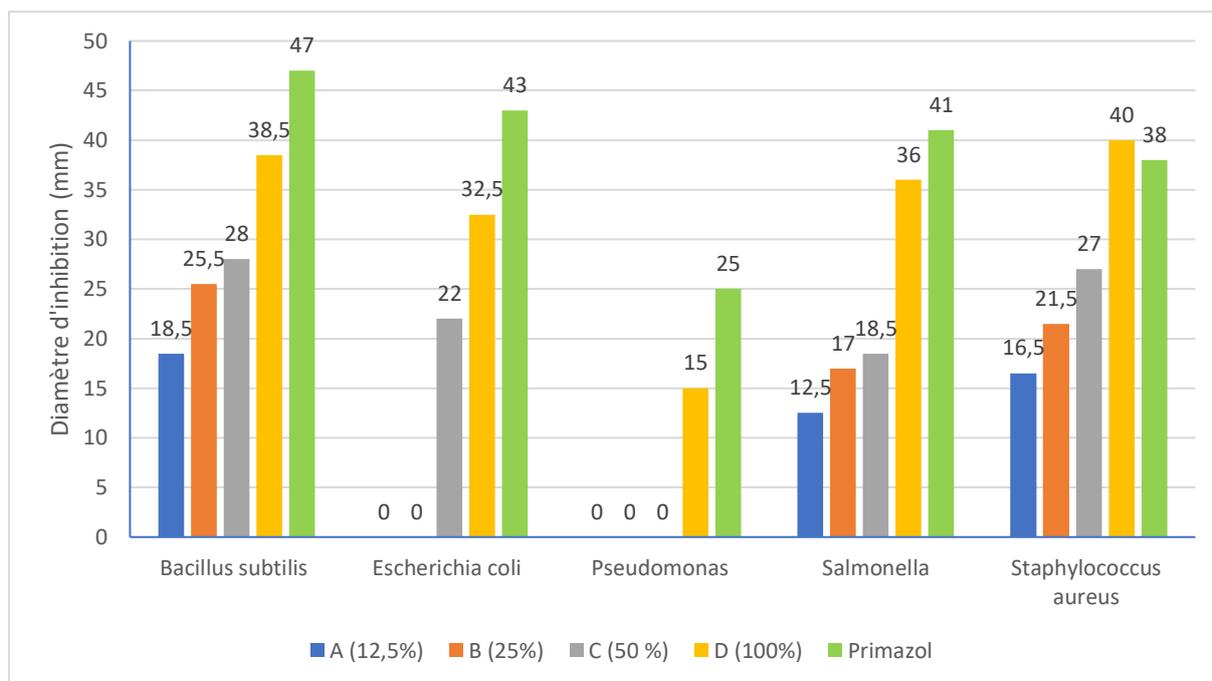


Figure 24 Diamètres d'inhibition du miel comparés à ceux du Primazol®

Tableau XIII Effet bactéricide ou bactériostatique du miel vis-à-vis des souches testées

Souche	Activité bactéricide	Activité bactériostatique
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	-
<i>Salmonella sp</i> ATCC 14028	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	+

Les résultats montrent que notre miel a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches testées avec des diamètres d'inhibition variable selon la dilution utilisée. Ainsi pour de faibles dilution (12,5% et 25%), les diamètres sont faibles voire nuls dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* mais pour des dilutions plus élevées, les diamètres le sont aussi avec 40mm pour le *Staphylococcus aureus*, 38,5mm pour le *Bacillus subtilis* et 36mm pour le *Salmonella* en utilisant du miel non dilué (100%).

En comparant avec les résultats obtenus avec le miel et ceux obtenus avec le Primazol[®], on constate que les diamètres de l'antibiotique de référence sont plus élevés de quelques mm que ceux du miel dans tous les cas sauf contre le *Staphylococcus aureus* où le miel pur présente un diamètre d'inhibition de 40mm contre 38 pour l'antibiotique.

Enfin, en observant le halo d'inhibition on peut en déduire que le miel présente une activité bactéricide et bactériostatique contre toutes les souches testées sauf *Pseudomonas aeruginosa* contre qui seule une activité bactéricide a été observée.

5.1.4 Activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique du miel est basée sur la même technique décrite précédemment sauf que les diamètres d'inhibition sont comparés à un antifongique de référence qui est le Lamidaz[®] (Terbinafine).

Les diamètres d'inhibition obtenus avec le Lamidaz[®] sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau XIV Diamètres d'inhibition obtenus avec le Lamidaz[®]

Souche fongique	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	61
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	32



Figure 25 Diamètres obtenus avec l'antifongique de référence (Lamidaz®)

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique du miel sont résumés dans les figures suivantes où les dilutions utilisées sont respectivement représentées par les lettres : A (12,5%), B (25%), C (50%) et D (100%) :

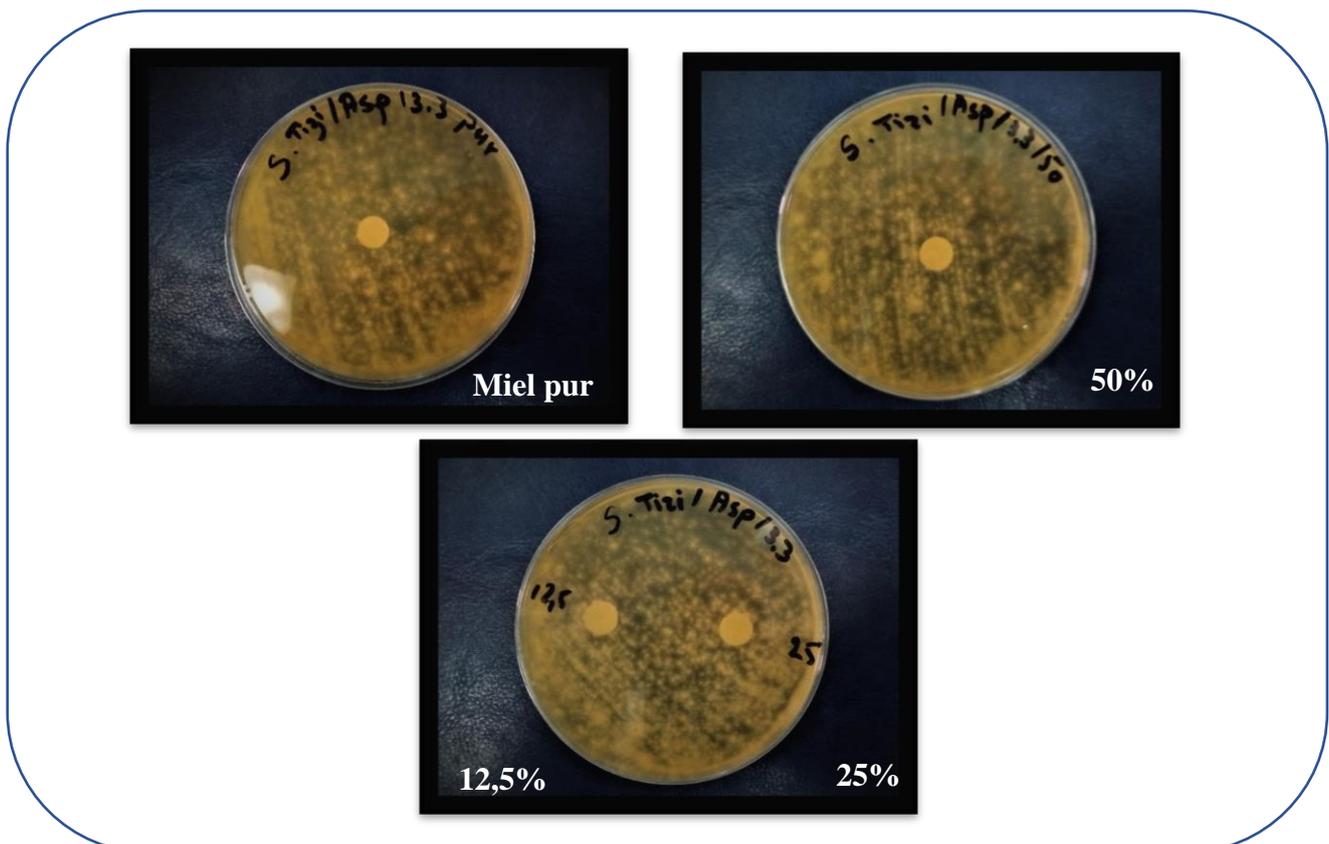


Figure 26 Diamètres obtenus avec le miel sur *Aspergillus brasiliensis*

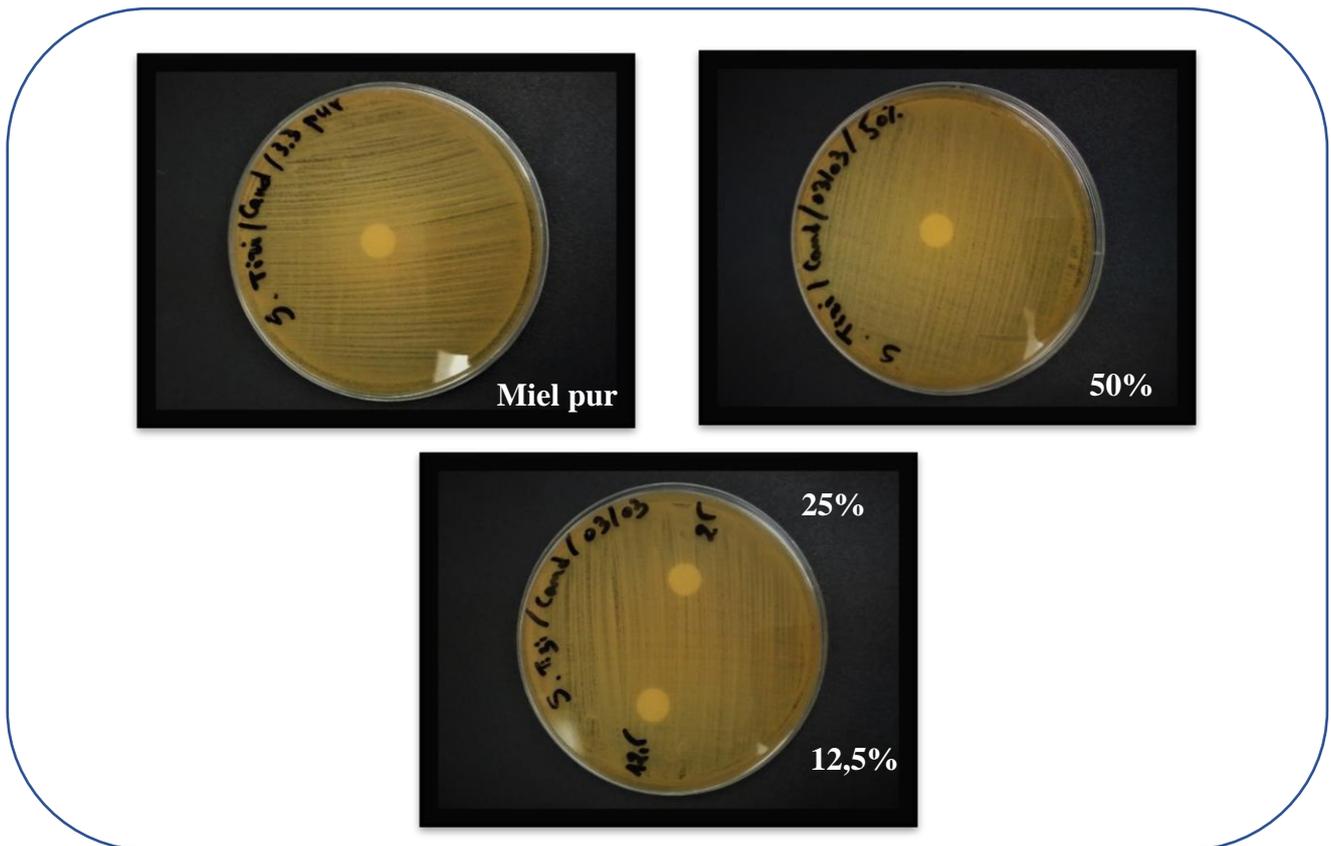


Figure 27 Diamètres obtenus avec le miel sur *Candida albicans*

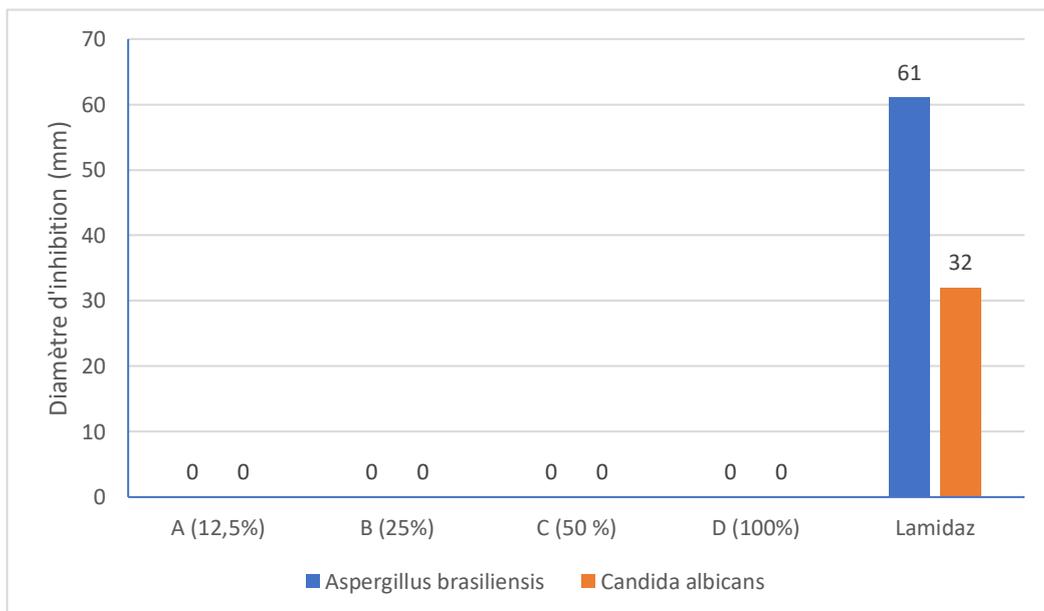


Figure 28 Diamètres d'inhibition du miel comparés au Lamidaz®

Les résultats montrent que notre miel n'a démontré aucune activité antifongique in-vitro. En effet, les diamètres d'inhibition mesurés sont tous nuls quand pour l'antifongique de référence ils sont de 61 et 32mm respectivement pour *Aspegillus brasiliensis* et *Candida albicans*.

5.2 Pollen

5.2.1 Test de toxicité aigue

Aucun décès ni aucun signe de toxicité ou morbidité n'a été observé lors du test de toxicité aigüe par voie orale. Ainsi, par exemple le suivi des poids des souris durant 14 jours a indiqué une croissance normale sans signe d'amaigrissement qui aurait pu indiquer une éventuelle toxicité.

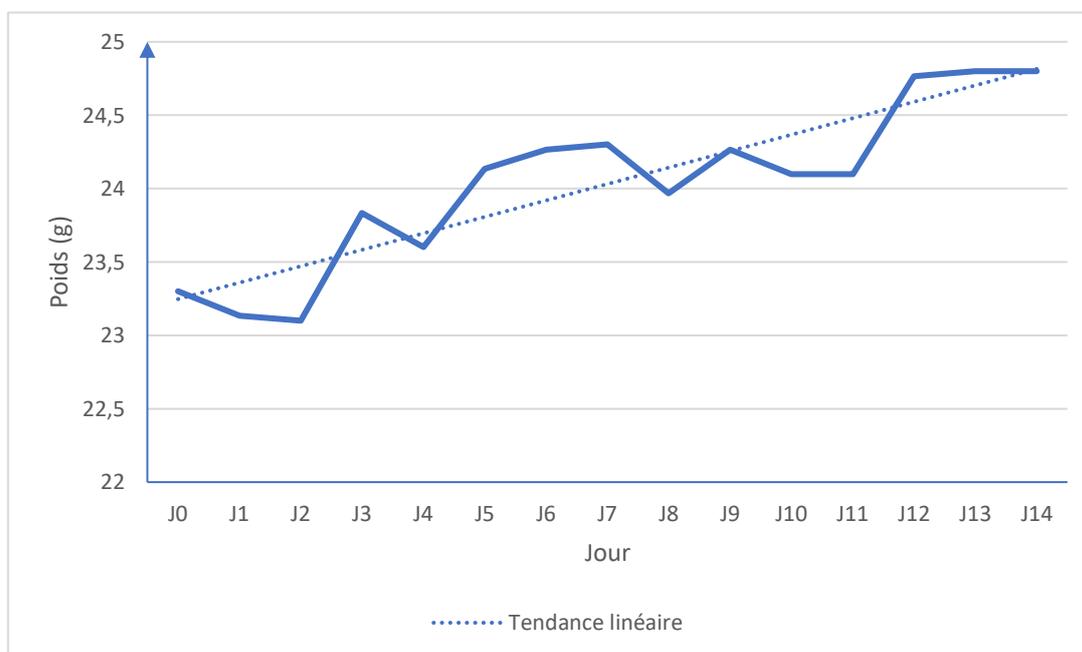


Figure 29 Evolution du poids moyen des 3 souris traitées à 5000 mg/kg

3 souris traitées avec la dose la plus grande (5000mg/kg) ayant survécu successivement, en appliquant le protocole de l'OCDE, nous pouvons estimer la DL50 comme étant supérieur à 5000mg/kg.

5.2.2 Apport nutritionnel

Les poids de chaque souris des groupes test et témoin ont été suivis durant 13 jours et les résultats ont été étudiés statistiquement pour évaluer une quelconque différence significative entre les deux groupes.

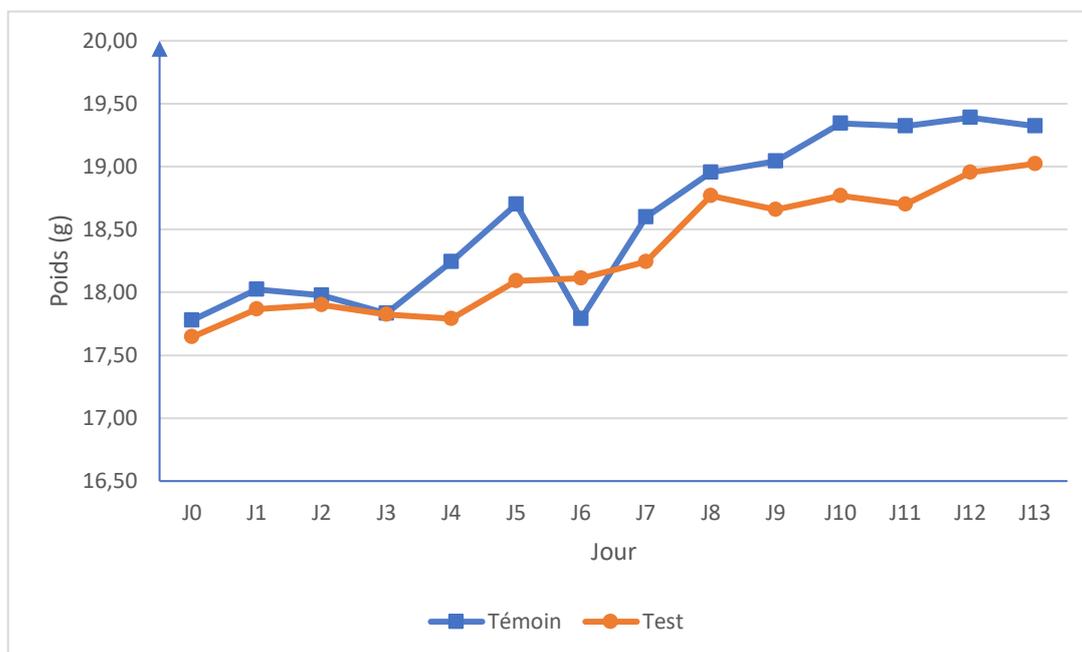


Figure 30 Evolution du poids moyen des souris des groupes Test et Témoin

Les souris des deux groupes ont montré une croissance pondérale constante et sont passés respectivement d'un poids moyen de 17,78 (groupe témoin) et 17,64g (groupe test) à 19,32 et 19,02g.

La p-valeur obtenue par test de Student au 13^{ème} jour est de 0,83, ce qui confirme l'absence de différence significative entre les deux groupes.

5.2.3 Extractions et dosage des polyphénols

Les extraits obtenus respectivement avec les méthodes 01 (mélange de solvant), 02 (solvant éthanolique) et 03 (solvant méthanolique) sont respectivement désignés par E1, E2 et E3. Les rendements d'extraction massique ainsi que les rendements en polyphénols (PP) sont représentés dans les figures suivantes :

Tableau XV Rendement massique et en polyphénols selon la méthode d'extraction

Extrait	Solvant	Masse de l'extrait sec (mg)	Rendement massique (%)	PP (mg EAG/g de pollen)
E1	Méthanol / Ethanol / Eau (1/1/1)	29,09	2,91	1,01
E2	Ethanol	72,79	7,28	3,75
E3	Méthanol	361,96	36,20	9,30

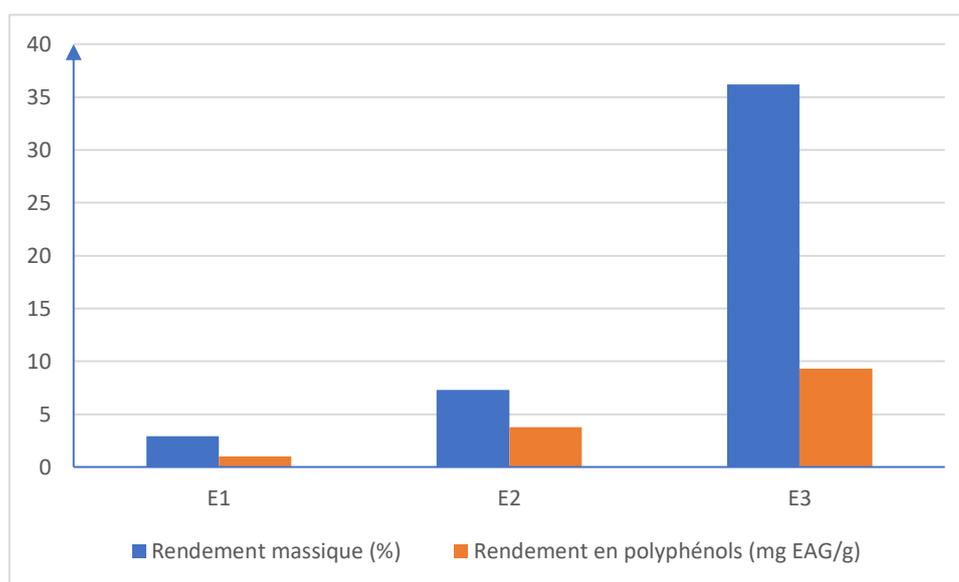


Figure 31 Comparaison des rendements totaux et en polyphénols selon la méthode d'extraction

Il en ressort de l'observation des rendements d'extraction que la méthode 03 utilisant le méthanol comme solvant a donné les meilleurs résultats avec un rendement massique total légèrement supérieur à 36%. Les méthodes 01 (mélange de solvants) et 02 (solvant éthanolique) ont donné des résultats nettement plus faibles avec respectivement des rendements massiques de 2,9% et 7,3%.

De manière concordante avec les rendements massiques totaux, l'extrait contenant le taux le plus élevé de polyphénols est le troisième avec près de 9,3mg EAG/g de pollen. Suivent ensuite l'extrait éthanolique avec 3,75mg EAG/g de pollen et l'extrait E1 avec 1,01mg EAG/g de pollen.

5.2.4 Identification des polyphénols

Le chromatogramme obtenu à partir du mélange de standards ainsi que le détail des pics caractéristiques sont représenté ci-dessous :

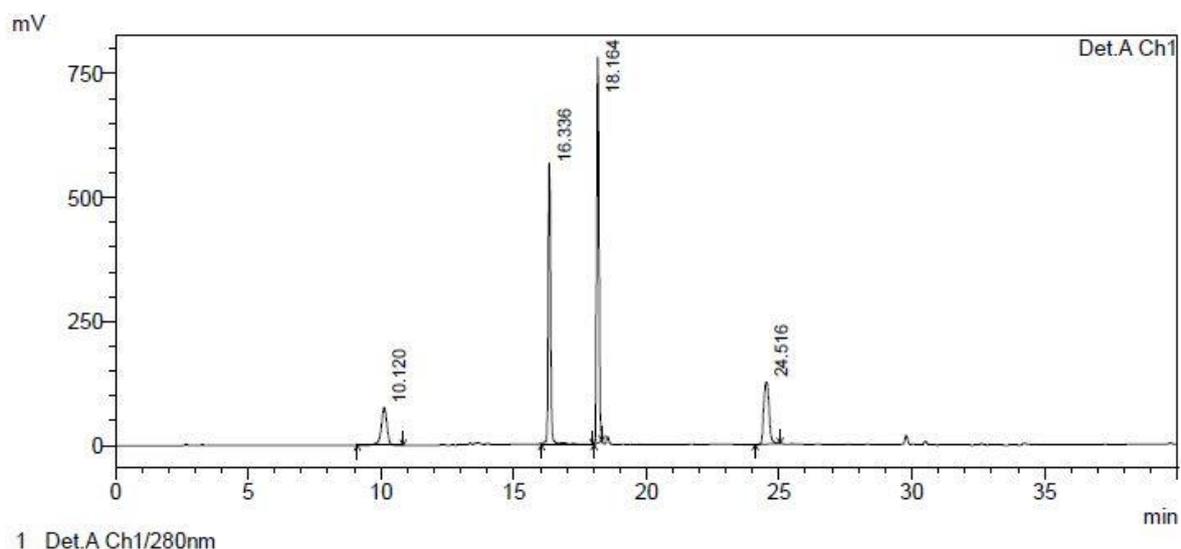


Figure 32 Chromatogramme obtenu à partir du mélange de standards

Tableau XVI Détails des pics des différents standards

Pic	Nom	Tr	Aire	Hauteur
1	Acide galique	10,12	1150798	76492
2	Acide cafféique	16,336	3601146	567453
3	Acide coumarique	18,164	4728428	778242
4	Acide cinnamique	24,516	1758380	125416
Total			11238752	1547602

Les résultats des extraits E1, E2 et E2 sont représentés ci-dessous :

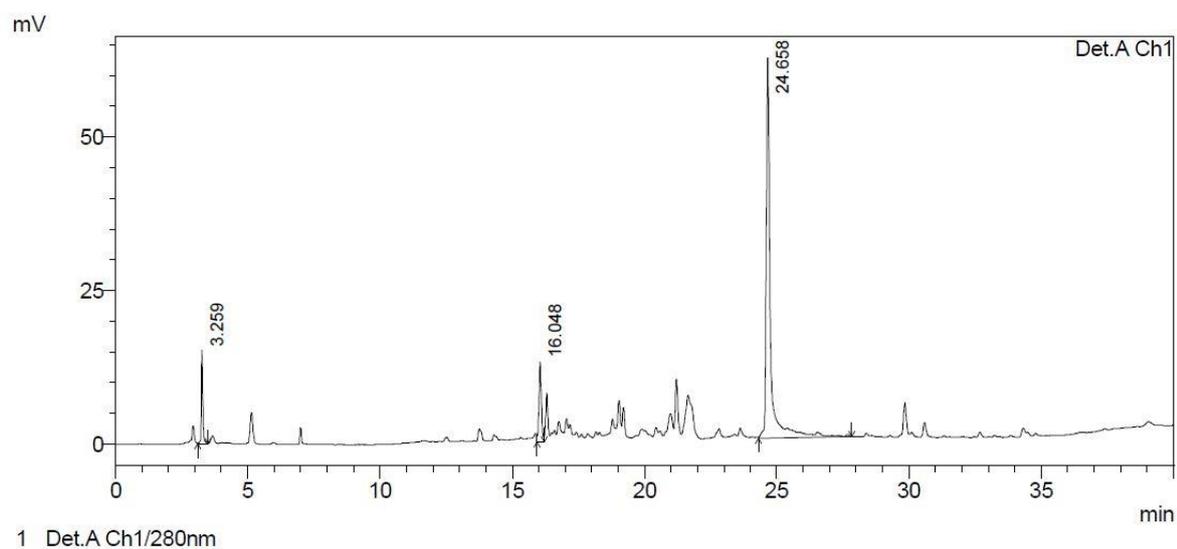


Figure 33 Chromatogramme obtenu à partir de E1

Tableau XVII Détails des pics identifiés à partir de E1

Pic	Nom	Tr	Aire	Hauteur
1	Acide caffeique	16,048	81766	13009
2	Acide cinnamique	24,658	673535	61873
Total			755301	74882

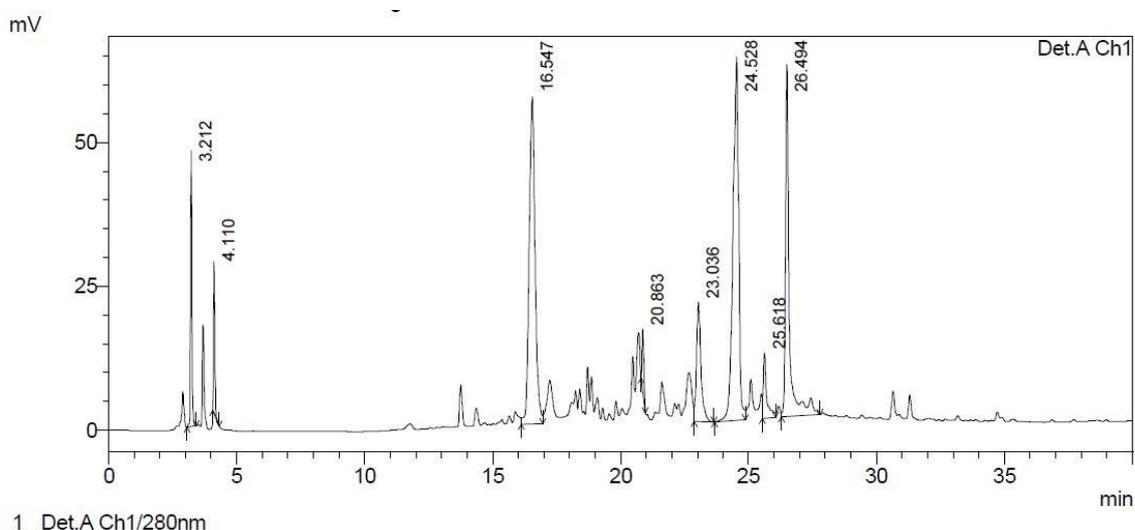


Figure 34 Chromatogramme obtenu à partir de E2

Tableau XVIII Détails des pics identifiés à partir de E2

Pic	Nom	Tr	Aire	Hauteur
1	Acide cafféique	16,547	909598	56911
2	Acide cinnamique	24,528	975320	63209
Total			1884918	120120

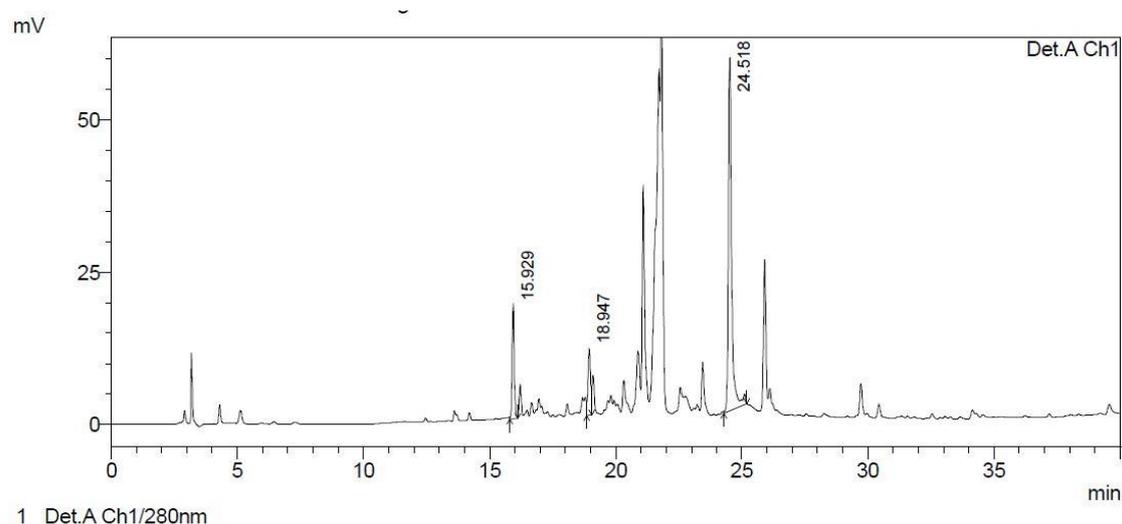


Figure 35 Chromatogramme obtenu à partir de E3

Tableau XIX Détails des pics identifiés à partir de E3

Pic	Nom	Tr	Aire	Hauteur
1	Acide cafféique	15.929	108981	19048
2	Acide coumarique	18.947	77523	10966
3	Acide cinnamique	24.518	518555	58004
Total			705059	88018

L'analyse par HPCL des trois extraits a donné les résultats suivants :

-E1 et E2 : présence d'acide caféique et d'acide cinnamique, absence d'acide galique et d'acide coumarique ;

-E3 : présence d'acide caféique, d'acide cinnamique et d'acide coumarique, absence d'acide galique.

Partie expérimentale

DISCUSSION

6 Discussion

6.1 Miel

6.1.1 Analyse physico-chimique

6.1.1.1 Teneur en eau

La teneur en eau est un paramètre lié au degré de maturité. C'est aussi le critère de qualité qui détermine la capacité du miel à rester stable lors de l'entreposage pour résister à la fermentation et à la cristallisation. Généralement une quantité d'eau élevée provoque la fermentation du miel, la perte de sa saveur et de sa qualité.

La fermentation du miel indésirable au cours du stockage est provoquée par l'action des levures osmotolérantes conduisant à la formation de l'alcool éthylique et le dioxyde de carbone. L'alcool peut être en outre oxydé en acide acétique et en eau entraînant un goût amer ; Les risques de fermentation d'un miel sont très élevés dans le cas où sa teneur en eau est supérieure à 19%, au-dessous de 17% la fermentation n'intervient pas [15, 92, 93].

La valeur de notre miel est de 17,46% (moyenne des deux déterminations), ce qui est largement inférieur au seuil maximal fixé dans le Codex Alimentarius, la commission de l'UE et l'IHC. Cela qui témoigne du bon stockage et de la maturité du miel étudié.

Selon le travail de Sana (Master Algérien, 2017) qui analysa un miel de la région d'Akfadou, celui-ci présentait une teneur en eau de 17,41 % [14].

Chibane et Djillali en analysant des miels d'origines diverses, obtiennent des valeurs variant entre 13 à 19,2% avec une moyenne de 17% [94].

L'étude Doukani et al. (2014) sur quelques types de miel récoltés dans différentes régions d'Algérie (Tiaret, Relizane, Mostaganem, Béchar et Chlef) révèle que la teneur en eau des échantillons étudiés est entre 13,4% et 17,2% [95].

Tous ces résultats sont en corrélation avec celui obtenu avec notre miel et montrent la réciprocity de la teneur en eau des miels Algériens.

6.1.1.2 Degré Brix

Le degré Brix du miel indique la quantité de matières sèches (en g) contenue dans 100g de miel refroidi à 20°C. Plus un miel est minéralisé, plus il contient de matières autres que des sucres et plus l'écart entre le véritable pourcentage de matière sèche (degré Brix) et le pourcentage de sucre risque de devenir appréciable [15].

La valeur Brix du miel est donc corrélée à la teneur en sucre du miel, une augmentation de la teneur en sucre conduisant à la croissance de Brix [96].

La lecture directe sur l'échelle de Brix du réfractomètre a donné un résultat de 81.5 °.

Une étude portugaise de Silva et al. (2009) a montré que les échantillons analysés présentaient des degrés Brix allant de 79,0 à 82,2 (avec une moyenne de 80,7) qui sont similaires à ceux d'autres échantillons de miel portugais [97].

Le travail de Younes Chaouche et Bounsiar (2018) montre que les valeurs varient entre 80 et 84 % avec une valeur moyenne de 82,23 dans l'analyse d'échantillons de miel locaux et importés, les miels locaux présentant tous des valeurs supérieures à 80° Brix [15].

Ces résultats sont concordants avec celui trouvé pour notre échantillon de miel.

6.1.1.3 Degré Baumé et densité

Le degré Baumé est une indication de la concentration d'une solution et est en relation directe avec la densité. A l'aide d'un réfractomètre, on peut mesurer le degré et ainsi calculer la densité du miel.

Notre miel présente une concentration de 43° Baumé, ce qui équivaut en appliquant la relation adéquate à une densité de 1,42. Ce résultat répond aux normes préconisées par le Codex Alimentarius et l'Union Européenne qui sont de 1,39 à 1,44 à 20 °C.

Ouchemoukh et al. effectuèrent des travaux sur des miels algériens, les densités retrouvées variaient de 1,40 à 1,44. Ils mirent en valeur la relation existante entre les variations de la densité des miels et les variations de leurs teneurs en eau, plus le miel est riche en eau, moins il est dense [93].

Younes-Chaouch et Bounsiar arrivèrent de la même façon à des densités de 1,42 pour 9 échantillons de miel algériens. [15].

Ces résultats correspondent à ceux de notre miel.

6.1.1.4 Conductivité électrique

La conductivité électrique est un bon critère de différenciation entre miel de miellat et miel de nectar. Ainsi, Le miel de nectar doit avoir des valeurs de conductivité inférieures à 0,8mS/cm, tandis que le miel de miellat doit avoir des valeurs supérieures à 0,8mS/cm.

La conductivité de notre échantillon étant de 0.66mS/cm. Etant inférieure à 0,8mS/cm, sa conductivité est celle d'un miel de nectar malgré le fait qu'il soit en réalité légèrement mélangé à du miellat.

Ces résultats correspondent à ceux trouvés par Selles et al. (2018) qui obtiennent des résultats entre 0.38 et 1.1mS/cm pour des miels algériens de différentes origines et Habati et al. dont les résultats variaient entre 0,28 et 0,60mS/cm [98, 99].

6.1.1.5 Taux de cendres

Le taux de cendres ou teneur en matières minérales du miel analysé lors de notre étude est de 0,31% ce qui est conforme aux normes internationales qui préconisent une valeur maximale inférieure à 1,2%.

Différentes études algériennes font état de valeurs correspondantes à la nôtre. Ainsi, Nair et al. (2017) trouvent des résultats entre 0,04 et 0,37%, Amir et al. un intervalle allant de 0,04 à 1,02% et Habati et al. mesurèrent des taux de cendres entre 0,23 et 0,48% [99-101].

La variation de la teneur en cendres peut s'expliquer les caractéristiques de l'environnement entourant la ruche et la nature des fleurs butinées mais aussi par les procédés et techniques de récolte utilisées dans l'apiculture [102].

6.1.1.6 pH

L'étude du pH d'un miel permet d'identifier son origine botanique. Les miels de nectar ont un pH faible (de 3,3 à 4,0) tandis que les miels de miellat ont un pH un peu plus élevé (de 4,5 à 5,5). Notre miel présente un pH de 3,83, qui est une valeur correspondante à un miel de nectar même si notre miel est un mélange de nectar et miellat. Cette valeur de pH entre totalement dans les normes de qualité d'un miel. Ces résultats sont en adéquation avec ceux rapportés par Amri lors son étude sur les miels algériens qui trouve que les miels de nectar avec un léger mélange de miellat ont un pH compris entre 3,5 et 4,5 [103].

Un pH extrême, en dehors de ces valeurs, révèle une dégradation biochimique suite à de mauvaises conditions de récolte ou de conservation. Les phénomènes de dégradations spontanées du miel lors de son vieillissement naturel ou d'un chauffage sont également largement dépendants du pH [24].

6.1.1.7 Acidité libre

Le codex Alimentarius et l'Union Européenne imposent des valeurs d'acidité libre inférieures à 50meq/kg. Les résultats obtenus lors de l'analyse de notre miel sont conformes à ces normes dans la mesure où l'acidité libre a été évaluée à 2meq/kg. Ces valeurs sont dans l'intervalle trouvé par Younes-Chaouch et Bounsiar (0,5 à 3meq/kg) en 2018 mais s'éloignent de celles définies par d'autres études telles que celle de Mendes et al. en 1998 (acidité libre entre 12 et 38,7meq/kg), Rebiai et Lanez en 2015 (entre 17,99 et 58,8meq/kg) et Bendeddouche et Dahmani en 2011 (13 à 66meq/kg) [15, 104, 105].

L'acidité libre peut être expliquée par la présence d'acides organiques, de lactones, d'esters et d'ions inorganiques tels que les phosphates.

6.1.1.8 Teneur en sucres

6.1.1.8.1 Sucres réducteurs

Notre miel contient une teneur en sucres réducteurs de 72,61%. Les normes européennes et internationales indiquant une valeur minimale de 60%, le miel étudié satisfait pleinement à ces exigences et la valeur trouvée est en adéquation avec d'autres études algériennes telles que celle de Draiaia et al. qui trouvent un intervalle de 60,18 à 79,29% et Ouchemoukh et al. dont les résultats s'étalent entre 67.83 et 80.25% [93, 106].

Ces résultats confirment que les sucres sont les constituants majoritaires du miel.

6.1.1.8.2 Saccharose

Le miel contrôlé lors de notre étude présentait un taux de saccharose de 2,42% ce qui est conforme aux normes internationales qui recommandent un taux inférieur à 5%.

De plus, cette valeur est concordante avec celles retrouvées lors d'autres études réalisées sur des miels algériens telles que celle de Makhloufi et al. (2010) qui trouvent entre 0 et 4% de

saccharose et Haouam et al. (2016) où les taux de saccharose de leurs miels s'étendaient entre 0 et 4,36% [107, 108].

Néanmoins des taux élevés de saccharose peuvent être retrouvés dans certaines circonstances notamment lors d'une récolte précoce du miel où le saccharose n'a pas eu le temps d'être complètement transformé en glucose et fructose par l'action de l'invertase ou lorsque l'apiculteur utilise un sirop de saccharose pour nourrir les abeilles en hiver. Ainsi, Chefrour et al. (2009) trouve lors de son étude des taux de saccharose allant jusqu'à 22,68% [109].

6.1.1.9 Hydroxyméthylfurfural (HMF)

Les recommandations du Codex Alimentarius et de l'Union Européenne fixent un maximum de 40 mg d'HMF/Kg de miel. Suite à notre analyse nous constatons que notre échantillon de miel répond à cette recommandation puisqu'il affiche une teneur en HMF de 0,43 mg/kg.

La qualité d'un miel peut changer selon la durée et la température de conservation qui conduit généralement à la perte en activité enzymatique et la formation de HMF, un aldéhyde cyclique produits par la dégradation des sucres. Une teneur élevée en HMF peut aussi être considéré comme une preuve du chauffage du miel et implique une perte en qualité et fraîcheur [110].

6.1.2 Activité cicatrisante

Notre étude a eu pour but d'évaluer l'effet cicatrisant du miel étudié sur un modèle expérimental in vivo et de mettre en évidence la qualité de la cicatrisation. Suite à la mesure des surfaces et aux calculs des taux de cicatrisation, on constate que le miel permet aux plaies de cicatriser plus rapidement que les deux types de plaies témoins à savoir celles traitées avec la poudre d'asiaticoside et celles qui n'ont reçu aucun traitement.

Plusieurs études et travaux ont démontré l'efficacité du miel sur les plaies et son effet accélérant le processus de cicatrisation. Les travaux de Chader et al. sur l'activité cicatrisante du miel ont remarqué une cicatrisation supérieure de 23.9 % pour le miel d'asphodèle, de 25.9% pour le miel du chardon par rapport aux plaies non traitées du groupe témoin négatif [55].

Ils ont aussi remarqué que le miel assure une meilleure cicatrisation en terme de qualité, c'est à dire sans œdèmes, sans infection (pus) et sans odeurs en comparaison avec les témoins positifs et négatifs [55].

L'étude de Descottes menée de 1984 à 2009 sur 3 012 patients confirme l'intérêt de l'utilisation du miel dans la cicatrisation. 52 types de lésions extrêmement diverses entre plaies et brûlures ont fait l'objet d'un traitement au miel et ont révélé une vitesse de cicatrisation de $0.78 \text{ cm}^2/\text{j}$, le double de celle des témoins utilisés [111].

L'étude note aussi que les plaies traitées avec du miel se referment de façon spectaculaire dans 90 % des cas et ceci parfois en peu de jours (21 jours en moyenne).

Tous ces travaux montrent que le miel est efficace dans la détersion des plaies infectées, type abcès, plaie chirurgicale, plaie traumatique, brûlures ou ulcères de différentes étiologies avec une activité antibactérienne qui s'ajoute à son activité cicatrisante [111].

Ceci peut être expliqué par le fait que le miel possède un effet de débridement sur les plaies. Les tissus morts sont facilement éliminés après que le miel soit appliqué. Les croûtes sèches formées à la surface de la plaie sont également éliminées et il se forme de meilleures cicatrices. De plus, l'osmolarité du miel favorise l'exsudation et donc la diminution de l'œdème au sein de la plaie [112].

D'autre part, le miel par ses propriétés physiques et son pouvoir osmotique crée une barrière protectrice et un milieu favorable à la cicatrisation. Les propriétés antibactériennes du miel préviennent l'infection ce qui justifie son usage dans les plaies infectées contrairement aux autres pansements en milieu humide, ce sont ces mêmes propriétés qui n'altèrent pas les tissus et ne retardent pas le processus de cicatrisation, bien au contraire possédant un effet de stimulation sur la régénération des tissus ainsi qu'un effet anti-inflammatoire [113].

Toujours selon Descottes, le peroxyde d'hydrogène en plus d'être un agent antimicrobien efficace apparaît comme un véritable stimuli de la multiplication cellulaire ainsi que de la réponse à l'évolution de l'inflammation normale de la cicatrisation. Il stimule la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales qui vont participer à la réparation tissulaire. En même temps, il stimule également le développement d'une néovascularisation dans le tissu cicatriciel [111].

L'eau oxygénée favorise la prolifération des fibroblastes *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* [114].

Selon Couquet et al., lors de la dégradation du glucose (du miel) en présence d'eau et d'oxygène par la glucose-oxydase, il y a formation d'acide gluconique et d'eau oxygénée. L'eau oxygénée, outre ses propriétés antiseptiques, joue un rôle très important dans les processus de cicatrisation. Au contact des tissus et du sang, elle se décompose en eau et en oxygène créant ainsi une "micro

effervescence” et un nettoyage mécanique de la plaie (détersion). Cela suggère que l'utilisation la plus bénéfique du miel dans le traitement des infections bactériennes est lorsqu'il peut être appliqué directement sur les plaies sans être dilué par les fluides corporels, ce qui concorde avec la recherche clinique sur l'utilisation du miel dans le traitement de la septicémie et des brûlures [115].

Hamdy et al. ont montré que le miel nettoyait mieux les plaies septiques superficielles qu'un antiseptique conventionnel. Gupta et al. ont eux aussi démontré que des plaies infectées par voie cutanée induites expérimentalement chez des veaux de buffle guérissaient beaucoup plus rapidement avec du miel naturel qu'avec une pommade à l'ampicilline et un mélange de miel ampicilline [116, 117].

En fait, dans le miel, de nombreux composants semblent stimuler la multiplication cellulaire et sont capables, au cours de la cicatrisation, de moduler la réaction inflammatoire [118].

Le miel induit également la synthèse de collagène en activant vraisemblablement le Transforming Growth Factor- β 1 (qui présente un puissant pouvoir réparateur) et favorise la formation du tissu de granulation en augmentant sa contraction. À cela s'ajoutent des pouvoirs antioxydants et globalement régulateur de l'inflammation [115].

Pour finir, on peut aussi rajouter que l'utilisation du miel au cours de la cicatrisation donne un certain confort, ainsi un changement de pansement est moins douloureux pour les rats traités avec le miel. Ceci peut être attribué à l'osmolarité élevée du miel, qui par les mouvements de fluides permanents vient renforcer la détersion autolytique en détachant les débris tissulaires dévitalisés et les tissus nécrotiques qui sont alors éliminés lors des changements de pansements. Les soins deviennent donc moins douloureux, ce qui représente un point de confort indispensable pour le patient mais aussi pour les soignants. C'est ce que Lusby et al. ont souligné en plus du fait que les pansements au miel n'adhèrent pas aux plaies, le tissu nouvellement formé est respecté et le changement de pansement se fait donc sans douleur [119].

Toutes ces propriétés et caractéristiques nous permettent donc de dire que le miel est un remède idéal quant à la qualité et la rapidité de la cicatrisation des plaies.

6.1.3 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré une action bactériostatique et/ou bactéricide contre toutes les souches testées. L'intensité de cette activité est dépendante de la bactérie cible et de la concentration de miel utilisée.

Nos résultats sont en concordance avec le travail de Merah et al. qui a été mené sur trois échantillons de miel naturel récoltés sur trois sites du territoire Algérien à savoir Tizi Ouzou, Sidi Bel Abbès et Jijel et un échantillon de miel importé d'Arabie Saoudite. Il a été constaté que les trois échantillons de miel naturel Algérien ont montré deux types d'effets antibactérien: un effet bactéricide et un effet bactériostatique [120].

L'activité antibactérienne du miel d'abeille a été attribuée à plusieurs de ses propriétés, notamment son effet osmotique, son pH naturellement bas et la production du peroxyde d'hydrogène et de l'acide gluconique, ainsi que la présence d'acides phénoliques, lysozyme et flavonoïdes [121].

Ces propriétés dépendent aussi de la concentration/dilution du miel, de sa nature, de son origine botanique ainsi que de nombreux facteurs décrits par d'autres auteurs tels que :

- L'âge de l'abeille (le miel de l'abeille jeune est particulièrement clair et moins concentré par rapport à celui de l'abeille la plus âgée) [120] ;
- Le climat, la saison de l'élevage de l'abeille et de la production de miel ainsi que son mode d'extraction qui est conditionné par sa maturité [120] ;
- La composition et la source du nectar sur lequel les abeilles se sont nourries [122] ;
- Le temps, la température et la durée de stockage/conservation, le pH et l'exposition à la lumière qui conditionnent la stabilité et l'efficacité des enzymes [123] ;
- L'action antimicrobienne des composés phénoliques qui dénaturent les protéines [124].

Moussa et al. ont démontré que le miel engendre une inhibition modérée de la multiplication bactérienne lorsqu'il est utilisé sous forme brute (non dilué) et à des concentrations de 50 %. Cela a été prouvé par des tests sur les souches *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Pour les concentrations inférieures à 50%, il n'y avait pas d'inhibition ; ce qui est en concordance avec nos résultats dans le cas de *P. aeruginosa*, tandis que nous avons eu une inhibition en dessous de 50% sur *E. coli* et *S. aureus* [125, 126].

Nos travaux corrélaient aussi avec ceux de Tuksitha L. et al. et d'Ascione F. et al. qui ont démontré que les miels étudiés possédaient une activité antibactérienne sur les souches Gram

positifs et Gram négatifs lorsqu'ils ont été testés par la méthode de diffusion sur disque [127, 128].

6.1.4 Activité antifongique

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antifongique ont montré qu'elle était nulle quelque soit la concentration utilisée et la souche ciblée.

Nos résultats ne concordant pas avec l'étude de Merah et al. qui montre que le miel possède une activité antifongique sur *Candida albicans* [120].

Les travaux de Anyanwu et al. montrent que les échantillons de miel utilisés dans leur étude ont différents niveaux d'activité antifongique contre les champignons testés, à savoir *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Microsporium gypseum*, *Candida albicans* et *Saccharomyces sp* [124].

D'autres études réalisées sur différents types de miels à plusieurs concentrations allant de 0,1 à 20% (Lusby et al., 2005) et de 25 à 100% (Omafuvbe et Akanbi, 2009) ont révélé que la croissance de *Candida albicans* n'était pas inhibée [129, 130].

Selon Combarros et al., dont les résultats concordent avec notre travail, la capacité de résistance osmotique des levures est bien connue, ce qui explique leur insensibilité relative au miel par rapport aux bactéries étudiées [131].

Cette résistance accrue de *C. albicans* a aussi été décrite par d'autres auteurs, notamment Lusby et al., qui n'ont obtenue aucune inhibition de croissance, Moussa et al. ont aussi décrit dans leur étude de l'activité antifongique de quatre miels Algériens une résistance très claire à *C. albicans* avec toutes les concentrations de miel utilisées, cette même étude a aussi démontré une sensibilité de *Rhodotorula sp* vis-à-vis des miels étudiés [129, 132].

Wahdan et al., ont déclaré qu'une concentration élevée en sucre dans le miel entraîne une osmolarité élevée qui produit une activité antimicrobienne, mais il n'a trouvé aucune activité contre *Trichophyton mentagrophytes* et *C. albicans* et a noté que les champignons sont généralement beaucoup plus tolérants que les bactéries à l'effet osmotique élevé. Il a aussi relié la résistance des levures et moisissures au fait que ces dernières peuvent pousser à des pH très

bas, ce qui est le cas d'*Aspergillus niger* qui peut pousser à un pH=1,2 et de *Candida albicans* qui peut croître à un pH=2.2 [133].

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité antifongique du miel. Par exemple, DeMera et Angert ont rapporté que les miels de différentes régions phytogéographiques varient dans leur capacité pour inhiber la croissance des levures, suggérant que l'origine botanique joue un rôle important en influençant l'activité antifongique en plus de la grande variabilité de composants, notamment des acides phénoliques, des flavonoïdes et d'autres biomolécules [134].

Ainsi, des recherches supplémentaires plus inclusives, notamment en termes d'échantillons de miels, sont nécessaires afin d'évaluer l'efficacité du miel comme inhibiteur de la croissance des champignons et d'en déterminer les mécanismes.

6.2 Pollen

6.2.1 Test de toxicité aigue

La DL50 a été estimée selon l'application du protocole décrit par l'OCDE comme étant supérieure à 5000 mg/kg.

Saroj et al., effectuèrent le même test et en arrivèrent à la conclusion que la DL50 était supérieure à 2000 mg/kg (dernière dose qu'ils avaient testée). [135]

Peu de tests de toxicité de ce genre ont été réalisés car il est admis depuis plusieurs siècles que le pollen n'est pas toxique et qu'au contraire il serait bénéfique lorsqu'il est utilisé comme complément alimentaire grâce à sa composition riche en protéines, acides aminés essentiels et vitamines entre autres. Il favoriserait aussi une meilleure digestion des aliments ainsi qu'un renforcement de la flore intestinale [3].

6.2.2 Apport nutritionnel

Les résultats de l'évaluation de l'apport nutritionnel du pollen utilisé comme complément alimentaire n'ont montré aucune différence statistique entre les groupes test et témoin dans la mesure où la croissance pondérale dans les deux groupes a été constante durant toute la durée de l'essai.

Ces résultats entrent en contradiction avec les travaux similaires déjà menés et rapportés par Campos et al. et Komosinska-Vassev et al. dans lesquels les animaux dont l'alimentation était

supplémentée par du pollen présentait des gains pondéraux plus rapides que les autres tout en consommant moins de nourriture. Cela prouverait l'apport nutritionnel du pollen en améliorant la digestion des aliments et fourniraient un complément en vitamines, acides aminés essentiels et oligo-éléments [3, 41].

Néanmoins, Haščík et al. rapportent que la supplémentation en pollen dans l'alimentation des poulets d'élevage n'entraînait aucune différence significative dans la prise de poids. Au contraire, il observa qu'un des groupes supplémentés présentait une croissance pondérale plus lente et plus faible que le groupe témoin et en déduit qu'il n'y avait aucun intérêt à faire usage du pollen comme complément alimentaire dans le but d'accélérer une prise de poids quelconque [136].

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la composition très variable du pollen selon son origine botanique. Dans ce cas, notre pollen serait moins riche et aurait une valeur nutritionnelle plus faible. D'autres causes peuvent être citées dont la dose relativement élevée (5000 mg/kg) avec laquelle les souris ont été supplémentées lors de notre étude et qui aurait eu un effet inverse en détournant les souris de leur alimentation standard ou encore le fait que le pollen ait été administré sous forme de suspension totale et non d'extrait théoriquement plus riche et plus facilement assimilable pour la souris.

6.2.3 Extractions et dosage des polyphénols

L'étude des résultats des différentes extractions réalisées montre clairement que l'utilisation du méthanol augmente significativement les rendements d'extractions totaux ainsi qu'en polyphénols. Cela peut être dû à la grande capacité de solvation du méthanol vis-à-vis des composés polaires contenus dans le pollen et notamment les polyphénols. Ceci est confirmé par les travaux de Kroyer et Hegedus qui ont obtenu des rendements d'extractions beaucoup plus élevés à l'aide de solvant méthanolique (45%) quand Eun-Mi Choi obtient un rendement de 8% avec l'éthanol comme solvant.

Néanmoins en raison de la grande diversité dans la composition du pollen selon son origine, il est très difficile voire impossible de comparer les études entre elles et seule la réalisation de plusieurs extractions différentes avec différents solvants sur un même échantillon peut permettre de dégager celle présentant le meilleur rendement [137, 138].

De la même façon, en raison de la très grande variabilité de la composition du pollen en polyphénols selon l'origine botanique de ce dernier, il est difficile de comparer les taux obtenus avec ceux de la littérature. Ainsi, Mărghitaş and al. font état d'une teneur en polyphénols allant de 4,4 à 16,4 mg EAG/g et Cosmolescu, Trandafir et Nour relatent des valeurs entre 10,80 et 17,64 mg EAG/g de pollen pour des extraits méthanoliques, Carpes et ses équipes trouvent entre 3.6 et 10.9 mg EAG/g avec l'éthanol comme solvant, alors qu'en Algérie, Rebiai et Lanez étudient la composition chimique de 6 échantillons de pollen d'origine botanique différente et obtiennent des teneurs en polyphénols de 26,69 à 36,02 mg EAG/g de pollen pour des extraits méthanoliques, valeurs qui sont beaucoup plus élevées que celles obtenues lors de notre étude [83, 139-141].

Toutes ces valeurs très différentes démontrent la grande diversité dans la composition chimique du pollen, notamment en polyphénols qui représentent un large groupe de molécules d'origines diverses.

6.2.4 Identification des polyphénols

Les résultats de l'identification des polyphénols montrent que les extraits E1 et E2 contenaient uniquement les acides caféïques et cinnamiques quand l'extrait E3 contenait en plus des deux polyphénols de l'acide coumarique. Ces résultats sont cohérents avec les rendements d'extraction puisqu'il est logique que l'extrait E3, ayant donné un rendement beaucoup plus élevé présente une plus grande diversité en polyphénols. Néanmoins, au vue du nombre réduit de standards utilisés et du nombre important de pics non-identifiés apparus au chromatogramme, il est impossible de tirer une quelconque conclusion.

Ainsi, Kostic et al. identifient 23 composés phénoliques, dont les acides coumarique, cinnamique et cafféique dans des extraits de pollen en utilisant une méthode d'analyse poussée couplant UHPLC et spectroscopie de masse [142].

Mihajlovic et al., trouvent 12 polyphénols différents dans le pollen en utilisant la même technique. Parmi les composés identifiés dans cette étude, seul l'acide coumarique l'a aussi été sur nos extraits [143].

Spulber et al., analysent quant à eux 10 types de pollen différents dont les polyphénols ont été extraits par des méthodes différentes et trouvent des profils phénoliques variés que ce soit selon

l'origine botanique ou la méthode d'extraction. Cela confirme donc la très grande diversité dans la composition chimique du pollen et l'importance de la méthode d'extraction utilisée [144].

La grande diversité structurale des polyphénols contenus dans le pollen est donc confirmée par ces études.

Conclusion

Conclusion

Dans notre présent travail, nous nous sommes intéressés aux deux produits de la ruche que sont le miel et le pollen. Cette initiative s'inscrit comme une contribution à la mise en valeur et la redécouverte de leurs intérêts thérapeutiques à travers une étude physico-chimique, pharmacologique et toxicologique rigoureuse.

A été ainsi réalisé sur le miel un contrôle physico-chimique poussé dont les résultats se sont avérés conformes à toutes les exigences internationales en termes de qualité décrites par le Codex Alimentarius et l'Union Européenne. Les principaux paramètres représentatifs de la qualité et de la bonne conservation d'un miel à savoir le teneur en eau, la teneur en saccharose et la teneur en HMF se sont tous révélés bien inférieurs aux limites réglementaires.

L'évaluation de l'activité cicatrisante à travers un protocole in-vivo sur des rats de laboratoire a montré une efficacité remarquable avec un net apport du miel sur l'évolution de la plaie, la vitesse de cicatrisation et l'aspect de la cicatrice finale. Aussi, l'étude statistique des données a confirmé ces résultats avec une différence significative entre les groupes traités avec le miel et les groupes témoins dont celui traités avec une crème cicatrisante.

Une évaluation de l'activité antimicrobienne in-vitro réalisée selon des protocoles standardisés a démontré l'activité antibactérienne du miel vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées avec dans certains cas un effet plus prononcé du miel en comparaison à l'antibiotique de référence utilisé comme témoin.

Sur le pollen, ont été réalisés un test de toxicité aigüe qui a démontré l'innocuité de ce dernier à des doses élevées et une évaluation de l'apport nutritionnel qui n'a pas donné de résultats statistiquement significatifs mais dont l'investigation mérite d'être poussée plus loin. Enfin, l'extraction, le dosage et l'identification des composés actifs du pollen a montré sa grande richesse en composés phénoliques reconnus pour leur activité thérapeutique.

Au cours de notre étude, nous avons donc pu démontrer les différents effets du miel et du pollen. Toutefois, cette initiative mérite d'être approfondie et complétée par le développement d'autres axes tels que :

- L'étude sur la stabilité du miel et des différents facteurs influençant sa qualité lors de sa conservation ;
- L'extraction et l'identification des composés intervenant dans la cicatrisation et procéder à une formulation galénique ;

Conclusion

- L'étude in-vitro des propriétés cicatrisantes du miel ainsi que le dosage du collagène qui auraient dû être réalisés au cours de ce mémoire mais qui a malheureusement été comprise par la crise du Covid-19 qui sévit actuellement dans le monde ;
- L'étude de l'effet antibactérien par une méthode en milieu liquide ainsi que la standardisation d'une méthode de diffusion sur gélose appliquée au miel ;
- L'étude de la synergie d'action du miel avec les antibiotiques ;
- L'étude de l'effet antifongique sur d'autres espèces mycosiques ;
- L'étude de l'apport de la supplémentation en pollen en cas de carences alimentaires ;
- L'identification élargie des composés du pollen de diverses origines à l'aide de techniques complémentaires.

Ainsi, aux vues des qualités et des propriétés thérapeutiques des produits de la ruche démontrés au cours de cette étude et d'autres de plus grande ampleur, il serait finalement grand temps de penser à intégrer l'apithérapie dans notre arsenal thérapeutique.

Reste à nous professionnels de santé, universitaires de prendre le chemin de la modernité réelle, celle qui allie science et raison, loin de l'idolâtrie de la chimie toute puissante. Encore faut-il que la folie des hommes cesse, cette folie qui met en péril l'équilibre des écosystèmes et risque de faire disparaître l'une des sources naturelles de composés thérapeutiques la plus abondante et une amie indispensable : l'abeille.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Fratellone PM, Tsimis F, Fratellone G. Apitherapy products for medicinal use. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2016;22(12):1020-2.
- [2] Jones R. Honey and healing through the ages. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2009;1(1):1-5.
- [3] Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S. What is the future of Bee-Pollen. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2010;2(4):131-44.
- [4] Molan PC. Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. *Bee world*. 1999;80(2):80-92.
- [5] FAO, OMS. Norme pour le miel. *Codex Alimentarius*. 2019.
- [6] Sanz M, Gonzalez M, De Lorenzo C, Sanz J, Martinez-Castro I. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food chemistry*. 2005;91(2):313-7.
- [7] Bonté F, Desmoulière A. Le miel: origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*. 2013;52(531):18-21.
- [8] Miel. Les miels monofloraux ou miels de cru [09/12/2019]. ; . Available from: <http://www.guide-du-miel.com/Lemiel/Miels-monofloraux.html>.
- [9] Hoyet C. Miel : de la source à la thérapeutique [Thèse]. Nancy: Université Henry Poincaré Nancy I; 2005.
- [10] Balas F. Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale : revue de la littérature [Thèse]. Nice: Université Nice Sophia Antipolis; 2015.
- [11] Tappi S, Laghi L, Dettori A, Piana L, Ragni L, Rocculi P. Investigation of water state during induced crystallization of honey. *Food chemistry*. 2019;294:260-6.
- [12] Bruneau E. Le miel en 10 questions. In: CARI, editor. *Actu API L'essentiel du programme européen miel*. 68.
- [13] Au Bon Miel. Dégustation du miel [13/01/2020]. ; . Available from: <http://www.aubonmiel.com/degustation-du-miel/>.
- [14] Sana H. Etude des propriétés physico-chimiques et antioxydantes du miel soumis au vieillissement accéléré [Mémoire]. Bejaia: Université Abderrahmane Mira de Béjaïa; 2017.
- [15] Younes-Chaouch L, Bounsiar N. Contrôle qualité des miels locaux et importés [Mémoire]. Tizi Ouzou: Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou; 2018.
- [16] Louveaux J. Composition, propriétés et technologie du miel. CHAUVIN R *Traité de biologie de l'abeille* Editions Masson et Cie, Paris. 1968;3:277-324.

Références bibliographiques

- [17] Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G, Iff D, Kanzig A, Seiler K, et al. Produits apicoles 23A Miel. In: Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires, editor. Manuel Suisse des Denrée Alimentaires.2004.
- [18] Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P, Estevinho L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(2):544-8.
- [19] Gonnet M. Le miel. Composition, propriétés, conservation; 2: OPIDA; 1982.
- [20] Directive 2001/110/CE du conseil européen du 20 décembre 2001 relative au miel, (2001).
- [21] Ratiu IA, Al-Suod H, Bukowska M, Ligor M, Buszewski B. Correlation Study of Honey Regarding their Physicochemical Properties and Sugars and Cyclitols Content. *Molecules*. 2020;25(1):34.
- [22] Gonnet M, Vache G. Le goût du miel: UNAF; 1985.
- [23] Louveaux J. Les abeilles et leur élevage. ; 1980.
- [24] Lequet L. Du nectar à un miel de qualité : contrôles analytiques du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculteur amateur [Thèse]. Lyon: Université Claude-Bernard Lyon I ; 2010.
- [25] Louveaux J. La technologie du miel. 1959.
- [26] Al ML, Daniel D, Moise A, Bobis O, Laslo L, Bogdanov S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*. 2009;112(4):863-7.
- [27] Delphine I. Le miel et ses propriétés thérapeutiques. Utilisation dans les plaies [Thèse]. Limoges: Université de Limoges; 2010.
- [28] Bogdanov S, Ruoff K, Oddo LP. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. 2004;35(Suppl. 1):S4-S17.
- [29] Moreira RF, De Maria CA, Pietroluongo M, Trugo LC. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food chemistry*. 2007;104(3):1236-41.
- [30] Hamoutene H, Achit A. Analyses physico-chimiques et activité antibactérienne de quelques échantillons du miel Algérien [Mémoire]. Khemis Miliana: Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana; 2018.
- [31] Moniruzzaman M, Yung An C, Rao PV, Hawlader MNI, Azlan SABM, Sulaiman SA, et al. Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from Bangladesh by

Références bibliographiques

high performance liquid chromatography: determination of antioxidant capacity. *BioMed research international*. 2014;2014.

[32] Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, González-Paramás AM, Damiani E, Astolfi P, Martínez-Sánchez G, et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(5):1508-16.

[33] Küçük M, Kolaylı S, Karaoğlu Ş, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. 2007;100(2):526-34.

[34] Agournaz S, Atrouz Z. Evaluation de la bio activité des miels in vitro [Mémoire]. Alger: Université d'Alger; 2018.

[35] Karabagias IK, Karabournioti S, Karabagias VK, Badeka AV. Palynological, physico-chemical and bioactivity parameters determination, of a less common Greek honeydew honey: "dryomelo". *Food Control*. 2020;109:106940.

[36] Viel C, Doré J-C. Histoire et emplois du miel, de l'hydromel et des produits de la ruche. *Revue d'histoire de la pharmacie*. 2003;91(337):7-20.

[37] Bansal V, Medhi B, Pandhi P. Honey--a remedy rediscovered and its therapeutic utility. *Kathmandu University medical journal (KUMJ)*. 2005;3(3):305-9.

[38] Sattler JAG, de Melo ILP, Granato D, Araújo E, da Silva de Freitas A, Barth OM, et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*. 2015;77:82-91.

[39] Eon N. De la fleur à l'abeille, de l'abeille au miel, du miel à l'homme : Miel et autres produits de la ruche [Thèse]. Nantes: Université de Nantes; 2011.

[40] Aici S, Tahar H. Etude de l'allergie due aux certains types de pollen dans la région d'Ain-Defla [Mémoire]. Khemis Miliana: Université Djilali BOUNAAMA de Khemis Miliana; 2017.

[41] Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kazmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:297425.

[42] Roubik WD. The pollination of cultivated plants A compendium for practitioners Volume 1. FAO, editor.2017.

[43] Dibos C. Interactions plante-pollinisateur : caractérisation de la qualité du pollen de deux cucurbitacées durant son ontogénèse, sa présentation et son transport sur le corps de l'abeille domestique [Thèse]. Avignon: Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse; 2010.

[44] Billet P. Considérations juridiques sur le service de pollinisation et services associés. In: Mare And Martin, editor. Des petits oiseaux aux grands principes Mélanges en hommage au Professeur Jean Untermaier.2018.

Références bibliographiques

- [45] Roubik WD. Pollination of cultivated plants in the tropics. FAO, editor. 1996.
- [46] Dechaume-Moncharmont F-X. Butinage collectif chez l'abeille *Apis mellifera* L. : étude théorique et expérimentale [Thèse]. Paris: Université Paris VI; 2003.
- [47] Tremblay N. Apiculture 101 : Production de pollen. Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD). 2016.
- [48] Gharbi M. Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition - Propriété thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire [Thèse]. Lyon: Université Claude-Bernard - Lyon I; 2011.
- [49] Thibault M. Le pollen apicole : ses propriétés et ses utilisations thérapeutiques [Thèse]. Nancy: Université de Lorraine; 2017.
- [50] Gauthier C. La récolte du pollen : un débouché supplémentaire à la portée de tous [11/12/2019]. ; . Available from: <https://www.apiservices.biz/fr/articles/303-la-recolte-du-pollen-un-debouche-supplementaire-a-la-portee-de-tous-par>.
- [51] Campos MG, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*. 2008;47(2):154-61.
- [52] Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G, Iff D, Kanzig A, Seiler K, et al. Produits apicoles 23B Pollen. In: Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires, editor. *Manuel suisse des denrée alimentaires* 2004.
- [53] Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J Sci Food Agric*. 2016;96(13):4303-9.
- [54] Coudane F. Fonction et régulation des peptidyl-arginine désiminases dans l'épiderme et au cours de la cicatrisation cutanée [Thèse]. Toulouse: Université Toulouse III – Paul Sabatier; 2009.
- [55] Yousfi A, Amina A. Evaluation in-vivo et in-vitro de l'effet cicatrisant des miels d'asphodèle et de chardon [Mémoire]. Alger: Université d'Alger; 2017.
- [56] Simon M. Analyse par microfaisceau d'ions. Application à l'étude de la fonction barrière cutanée et à la nanotoxicologie in-vitro [Thèse]. Bordeaux: Université de Bordeaux I; 2009.
- [57] Gohin S. Mécanismes de défense de la peau : rôle des interactions neurovasculaires [Thèse]. Lyon: Université Claude Bernard Lyon I; 2011.
- [58] Pigeau J. Principes actifs d'origine végétale utilisés en cosmétique anti-âge : Innovations et conseils à l'officine [Thèse]. Poitiers: Université de Poitiers; 2016.

Références bibliographiques

- [59] Orioux O. Peau et allergies Mécanismes immunologiques de sensibilisation par voie cutanée et facteurs de sensibilisation [Thèse]. Limoges: Université de Limoges; 2016.
- [60] Aubert-Viard F. Conception et évaluation d'un pansement multicouche antibactérien pour le traitement des plaies chroniques [Thèse]. Lille: Université Lille 2 Droit et Santé; 2014.
- [61] Djerrou Z. Etude des effets pharmaco-toxicologiques de plantes médicinales d'Algérie : Activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de Pistacia lentiscus L. [Thèse]. Constantine: Université Mentouri de Constantine; 2011.
- [62] Ferraq Y. Développement d'un modèle de cicatrisation épidermique après une désépidermisation laser [Thèse]. Toulouse : Université Toulouse III; 2007.
- [63] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*. 1999;341(10):738-46.
- [64] Couquet Y, Desmoulière A, Rigal M-L. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques*. 2013;52(531):22-5.
- [65] Lee DS, Sinno S, Khachemoune A. Honey and wound healing. *American journal of clinical dermatology*. 2011;12(3):181-90.
- [66] Drouet E. *Le monde Microbien : Partie 1 : Microbes et Microbiologie*. 2012.
- [67] CNRS. Annexe 2. Classement des micro-organismes pathogènes. *Risques biologiques Les cahiers de prévention*. 4e ed .2017.
- [68] Katz A, Alimova A, Xu M, Rudolph E, Shah MK, Savage HE, et al. Bacteria size determination by elastic light scattering. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2003;9(2):277-87.
- [69] Zarrouq B. Etude phytochimique et activité antibactérienne d'Anabasis aretioides [Mémoire]. Fès: Université Sidi Mohammed Ben Abdellah; 2010.
- [70] Webster J, Weber R. *Introduction to fungi*: Cambridge University Press; 2007.
- [71] El Hassani N. Les mycoses : Etude d'une série répertoriée au service de parasitologie-mycologie médicale de l'hôpital Ibn Sina de Rabat sur une période de 5 ans (2007-2011) [Thèse]. Rabat: Université Mohammed V-Souissi; 2013.
- [72] Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL). Introduction à la mycologie .2016 [01/04/2020]. ; . Available from: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/mycologie/site/html/1.html>.
- [73] Bastien P. *Généralités sur le parasitisme et les parasites*. 2011.
- [74] Paniker CJ, Ghosh S. *Paniker's textbook of medical parasitology*: JP Medical Ltd; 2017.

Références bibliographiques

- [75] Presterl E, Diab-El Schahawi M, Lusignani LS, Paula H, Reilly JS. General and Specific Virology. Basic Microbiology and Infection Control for Midwives: Springer; 2019. p. 107-11.
- [76] Sastry AS, Bhat S. Essentials of medical microbiology: Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited; 2018.
- [77] Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010;125(2):S24-S32.
- [78] Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010;125(2):S33-S40.
- [79] Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature reviews microbiology. 2015;13(1):42-51.
- [80] Israili ZH. Antimicrobial properties of honey. American journal of therapeutics. 2014;21(4):304-23.
- [81] Kwakman PH, Zaat SA. Antibacterial components of honey. IUBMB life. 2012;64(1):48-55.
- [82] Mărgăoan R, Mărghițaș LA, Dezmirean DS, Gherman B, Chirilă F, Zacharias I, et al. Antimicrobial activity of bee pollen ethanolic and methanolic extracts on Staphylococcus aureus bacterial strain. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologies. 2015;72(1):78-80.
- [83] Carpes ST, Begnini R, Alencar SMd, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. Ciência e agrotecnologia. 2007;31(6):1818-25.
- [84] Rossant A. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes [Thèse]. Limoges: Université de Limoges; 2011.
- [85] Cherchi A, Porcu M, Spanedda L, Tuberoso C. Influence of ageing on the quality of honey [Sardinia]. Industria Conserve (Italy). 1997.
- [86] Bogdanov S, Martin P, Lullmann C. Harmonised methods of the international honey commission. Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld. 2002.
- [87] OCDE. Essai n° 425: Toxicité aiguë par voie orale: méthode de l'ajustement des doses 2008.
- [88] OCDE. Essai n° 423: Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë 2002.
- [89] Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (Cynara scolymus L.). Nature & Technology. 2013(9):35.

Références bibliographiques

- [90] Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical journal*. 2009;91(1):107-10.
- [91] Carrasco-Pancorbo A, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Gallina-Toschi T, Fernández-Gutiérrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of separation science*. 2005;28(9-10):837-58.
- [92] Saxena S, Gautam S, Sharma A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food chemistry*. 2010;118(2):391-7.
- [93] Ouchemoukh S, Louaileche H, Schweitzer P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food control*. 2007;18(1):52-8.
- [94] S. CYeD. Contrôle de qualité de quelques miels d'origine diverse et étude de leurs effets sur quelques micro-organismes [Mémoire]. Alger: U.S.T.H.B.; 2007.
- [95] Doukani K, Tabak S, Derriche A, Hacini Z. Étude physico-chimique et phyto-chimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement*. 2014;10:37-49.
- [96] Geană E-I, Ciucure CT, Costinel D, Ionete RE. Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}\text{C}$ signature. *Food Control*. 2020;109:106919.
- [97] Silva LR, Videira R, Monteiro AP, Valentão P, Andrade PB. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*. 2009;93(1):73-7.
- [98] Selles SMA, Bellik Y, Kouidri M, Belhamiti BT, Amrane AA, Hammoudi SM, et al. Physicochemical and antioxidant properties of algerian honeys and their antibacterial potency against three strains of *E. coli*. *Polish Journal of Natural Sciences*. 2018;33(2).
- [99] Habati M, Gherib A, Bakchiche B, Benmebarek AA. Study On The Physicochemical, Antioxidant Properties And Mineral Content Of Five Honeys Produced In The Central Region Of Algeria. *Scientific Study And Research-Chemistry And Chemical Engineering Biotechnology Food Industry*. 2017;18(2):121-34.
- [100] Amir Y, Yesli A, Bengana M, Sadoudi R, Amrouche T. Physico-chemical and microbiological assessment of honey from Algeria. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*. 2010;9(9).
- [101] Nair S, Maghraoui NB. Physicochemical Properties of Honeys Produced in North-West of Algeria. *Advances in Food Science and Engineering*. 2017;1:123-8.
- [102] Belhaj O, Oumato J, Zrira S. Étude physico-chimique de quelques types de miels marocains. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*. 2015;3(3):71-5.

Références bibliographiques

- [103] Amri A. Contribution à l'étude approfondie de Quelques miels produits en Algérie : Aspect physico-chimique et botanique [Thèse de doctorat]. Annaba: Université Badji Mokhtar; 2016.
- [104] Mendes E, Proença EB, Ferreira I, Ferreira M. Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate polymers*. 1998;37(3):219-23.
- [105] Rebiai A, Lanez T. Comparative study of honey collected from different flora of Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 2014;6(1):48-55.
- [106] Draiaia R, Dainese N, Borin A, Manzinello C, Gallina A, Mutinelli F. Physicochemical parameters and antibiotics residuals in Algerian honey. *African Journal of Biotechnology*. 2015;14(14):1242-51.
- [107] Makhloufi C, Kerkvliet JD, D'albore GR, Choukri A, Samar R. Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. *Apidologie*. 2010;41(5):509-21.
- [108] Haouam L, Tahar A, Dailly H, Lahrichi A, Chaqroune A, Abdenour C. Physicochemical properties and major elements contents of Algerian honeys from semi-arid regions. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2016:107-15.
- [109] Chefrour C, Draiaia R, Tahar A, Kaki YA, Bennadja S, Battesti M. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 2009;9(5).
- [110] Mouhoubi-Tafinine Z, Ouchemoukh S, Louaileche H, Tamendjari A. Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. *International food research journal*. 2018;25(3).
- [111] Descottes B. Cicatrisation par le miel, l'expérience de 25 années. *Phytothérapie*. 2009;7(2):112-6.
- [112] Efem S. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British journal of Surgery*. 1988;75(7):679-81.
- [113] Molan PC. The role of honey in the management of wounds. *Journal of wound care*. 1999;8(8):415-8.
- [114] Tur E, Bolton L, Constantine BE. Topical hydrogen peroxide treatment of ischemic ulcers in the guinea pig: blood recruitment in multiple skin sites. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1995;33(2):217-21.
- [115] Couquet Y, Desmouliere A, Rigal M-L. The antibacterial and cicatrising properties of honey. *ACTUALITES PHARMACEUTIQUES*. 2013;52(531):22-5.
- [116] Hamdy M, El-Banby M, Khakifa K, Gad E, Hassanein E, editors. antimicrobial effect of honey in the management of septic wounds. *Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo, Egypt, 6-10 November 1988/hosted by*

Références bibliographiques

the government of Egypt; convened by the International Bee Research Association; 1989 : London: International Bee Research Association, 1989.

[117] Gupta S, Singh H, Varshney A, Prakash P. Therapeutic efficacy of honey in infected wounds in buffaloes. *Indian Journal of Animal Sciences*. 1992;62(6):521-3.

[118] Tonks AJ, Cooper R, Jones K, Blair S, Parton J, Tonks A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*. 2003;21(5):242-7.

[119] Lusby P, Coombes A, Wilkinson J. Honey: a potent agent for wound healing? *Journal of WOCN*. 2002;29(6):295-300.

[120] Merah M, Bachagha Bensaci M, Boudherhem A. Etude de l'effet antimicrobien de trois échantillons du miel naturel récoltés du territoire algérien. *Annales des Sciences et Technologie*. 2010;2.

[121] Abd-El Aal A, El-Hadidy M, El-Mashad N, El-Sebaie A. Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Annals of Burns and fire disasters*. 2007;20(2):83.

[122] Irish J, Blair S, Carter DA. The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS one*. 2011;6(3):e18229.

[123] Almasaudi SB, Al-Nahari AA, El Sayed M, Barbour E, Al Muhayawi SM, Al-Jaouni S, et al. Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. *Saudi journal of biological sciences*. 2017;24(6):1255-61.

[124] Anyanwu C. Investigation of in vitro antifungal activity of honey. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6(18):3512-6.

[125] Moussa A, Nouredine D, Mohamed HS, Abdelmelek M, Saad A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2012;5(10):773-6.

[126] Moussa A, Nouredine D, Abdelmelek M, Saad A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against Pathogenic Gram-Negative Bacilli: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012;2(3):211-4.

[127] Tuksitha L, Chen Y-LS, Chen Y-L, Wong K-Y, Peng C-C. Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2018;21(2):563-70.

[128] Ascione F, Zuurro A, Fidaleo M, Lavecchia R, Guido S, Caserta S. Experimental Investigation of Honey as Wound Repair Enhancer by In Vitro Time-Lapse Microscopy. *Chemical Engineering Transactions*. 2016;49:259-64.

[129] Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of medical research*. 2005;36(5):464-7.

Références bibliographiques

- [130] Omafuvbe B, Akanbi O. Microbiological and physico-chemical properties of some commercial Nigerian honey. *African Journal of Microbiology Research*. 2009;3(12):891-6.
- [131] Combarros-Fuertes P, Tornadijo ME, Castro JM, Fresno JM, Estevinho LM, editors. *Actividad antimicrobiana de mieles españolas acogidas a marcas de calidad*. VII Congreso Español Ingeniería Alimentos; 2012.
- [132] Moussa A, Noureddine D, Saad A, Abdelmelek M, Abdelkader B. Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012;2(7):554-7.
- [133] Wahdan H. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*. 1998;26(1):26-31.
- [134] DeMera JH, Angert ER. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidologie*. 2004;35(4):411-7.
- [135] Varpe SS, Juvekar AR, Bidikar MP, Juvekar PR. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Typha angustifolia* pollen grains extracts in experimental animals. *Indian journal of pharmacology*. 2012;44(6):788.
- [136] Haščík P, Elimam I, Garlík J, Kacániová M, Cuboò J, Bobko M, et al. Impact of bee pollen as feed supplements on the body weight of broiler Ross 308. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(89):15596-9.
- [137] Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2001;2(3):171-4.
- [138] Choi EM. Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2007;21(5):471-5.
- [139] Mărghitaş LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobiş O, Popescu O, Bogdanov S, et al. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*. 2009;115(3):878-83.
- [140] Cosmulescu S, Trandafir I, Violeta N. Chemical composition and antioxidant activity of walnut pollen samples. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2015;43(2):361-5.
- [141] Rebiai A, Lanez T. Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from northwest Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 2012;4(2):155-63.
- [142] Kostić AŽ, Milinčić DD, Gašić UM, Nedić N, Stanojević SP, Tešić ŽL, et al. Polyphenolic profile and antioxidant properties of bee-collected pollen from sunflower (*Helianthus annuus* L.) plant. *LWT*. 2019;112:108244.

Références bibliographiques

[143] Mihajlovic L, Radosavljevic J, Burazer L, Smiljanic K, Velickovic TC. Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles. *Phytochemistry*. 2015;109:125-32.

[144] Spulber R, Colta T, Babeanu N, Popa O. Chemical diversity of polyphenols from bee pollen and propolis. *AgroLife Scientific Journal*. 2017;6(2):183-94.

Annexes

Annexes

Annexe I : Données détaillées sur la surface des plaies et les taux de cicatrisation

Test								
Rat	Rat 01	Rat 02	Rat 03	Rat 04	Rat 05	Rat 06	Moyenne (cm ²)	Moyenne du taux de cicatrisation (%)
Jour	Surface de la plaie (cm ²)							
0	11,81	10,22	11,08	10,01	10,98	10,64	10,79	0,00
1	9,36	9,61	9,4	8,04	8,35	8,62	8,90	17,55
2	7,15	7,57	7,06	8,04	6,4	6,6	7,14	33,86
3	5,87	7,62	5,77	7,08	5,8	5,64	6,30	41,64
4	5,61	6,41	5,55	5,34	4,71	4,88	5,42	49,80
5	5,13	5,44	4,83	4,68	4,45	3,94	4,75	56,02
6	5,18	4,44	5,04	4,76	4,07	2,9	4,40	59,24
7	4,46	4,45	3,69	3,77	3,68	2,3	3,73	65,48
8	3,64	3,52	2,81	3,22	3,2	1,83	3,04	71,86
9	3,54	2,78	2,24	2,53	2,78	1,33	2,53	76,52
10	1,78	2,64	1,92	1,67	2,61	1,18	1,97	81,77
11	1,55	2,32	1,9	1,29	1,99	1,16	1,70	84,23
12	1,77	0,91	1,22	0,98	0,95	0,66	1,08	89,98
13	1,57	0,68	1,16	0,91	0,69	0,53	0,92	91,44
14	0,95	0,64	0,93	0,89	0,55	0,56	0,75	93,02
15	0,89	0,51	0,69	0,64	0,51	0,43	0,61	94,33
16	0,63	0,34	0,63	0,4	0,42	0,27	0,45	95,84
17	0,45	0,24	0,46	0,31	0,36	0,24	0,34	96,82
18	0,3	0,19	0,36	0,25	0,28	0,14	0,25	97,65

Annexes

T +								
Rat	Rat 01	Rat 02	Rat 03	Rat 04	Rat 05	Rat 06	Moyenne (cm ²)	Moyenne du taux de cicatrisation (%)
Jour	Surface de la plaie (cm ²)							
0	9,38	8,99	9,64	10,57	9,8	9,92	9,72	0,00
1	8,55	7,72	8,37	10,27	9,66	8,73	8,88	8,58
2	7,52	7,1	8,21	8,58	9,18	8,39	8,16	15,99
3	7,77	7,41	8,46	8,65	7,94	7,83	8,01	17,56
4	5,92	6,79	6,67	6,8	6,52	7,87	6,76	30,41
5	5,7	6,61	6,39	5,54	5,92	6,33	6,08	37,41
6	4,54	6,72	5,32	5,35	5,33	4,96	5,37	44,73
7	4,16	6,1	4,41	4,13	5,34	4,41	4,76	51,03
8	3,34	5,91	4,01	3,49	4,19	3,55	4,08	57,99
9	2,26	5,75	2,39	3,57	3,74	3,77	3,58	63,16
10	2,69	5,57	2,68	3,04	3,28	2,22	3,25	66,59
11	1,48	5,25	2,68	3,36	2,74	2,17	2,95	69,67
12	1,38	4,97	2,21	3,9	2,77	2,24	2,91	70,03
13	1,2	5,02	1,97	4,6	2,24	2,35	2,90	70,19
14	0,87	3,38	2	4,56	2,7	1,99	2,58	73,41
15	0,81	3,64	2,15	4,19	2	1,9	2,45	74,80
16	0,64	3,22	2,02	4,08	1,64	1,59	2,20	77,38
17	0,59	2,93	1,81	3,9	1,02	0,87	1,85	80,93
18	0,59	2,2	1,6	3,69	0,93	1,33	1,72	82,26

Annexes

T -								
Rat	Rat 01	Rat 02	Rat 03	Rat 04	Rat 05	Rat 06	Moyenne (cm ²)	Moyenne du taux de cicatrisation (%)
Jour	Surface de la plaie (cm ²)							
0	11,29	11,92	11,82	9,98	10,06	9,98	10,84	0,00
1	10,2	11,73	10,27	8,98	9,45	9,38	10,00	7,75
2	8,87	11,24	9,86	8,55	9,04	8,89	9,41	13,22
3	8,05	10,14	9,19	7,93	8,3	7,62	8,54	21,25
4	7,81	9,2	8,66	7,8	8,47	7,87	8,30	23,43
5	6,45	9,75	8,71	6,89	8,2	7,25	7,88	27,36
6	5,34	7,49	7,89	6,55	7,98	7,14	7,07	34,83
7	4,54	6,52	6,85	6,38	7,24	6,67	6,37	41,28
8	3,99	6,07	6,44	6,24	6,89	6,22	5,98	44,89
9	3,77	5,91	5,7	6,04	6,25	6,05	5,62	48,16
10	3,53	4,83	5,01	6,1	6,12	5,84	5,24	51,68
11	3,45	4,6	4,89	5,61	5,99	5,45	5,00	53,90
12	3,36	3,85	4,05	5,17	5,65	5,27	4,56	57,96
13	3,13	3,47	3,85	4,57	5,19	5,09	4,22	61,11
14	3,22	3,02	3,56	4,2	5,2	4,65	3,98	63,34
15	2,28	3,06	3,47	4,18	4,95	4,44	3,73	65,60
16	1,93	2,52	3,24	3,63	4,35	4,26	3,32	69,36
17	2,41	2,88	2,89	3,27	4,12	3,73	3,22	70,33
18	2,22	2,42	2,54	3,02	3,78	3,49	2,91	73,14

Annexes

Moyennes des surfaces des plaies (cm²)			
Jour	Miel	Témoïn +	Témoïn -
0	10,79 ±0,65	9,72 ±0,53	10,84 ±0,94
1	8,90 ±0,65	8,88 ±0,92	10,00 ±0,98
2	7,14 ±0,61	8,16 ±0,75	9,41 ±1,00
3	6,3 ±0,84	8,01 ±0,46	8,54 ±0,95
4	5,42 ±0,61	6,76 ±0,63	8,30 ±0,57
5	4,75 ±0,52	6,08 ±0,42	7,88 ±1,24
6	4,40 ±0,84	5,37 ±0,73	7,07 ±0,99
7	3,73 ±0,79	4,76 ±0,79	6,37 ±0,94
8	3,04 ±0,66	4,08 ±0,95	5,98 ±1,01
9	2,53 ±0,73	3,58 ±1,26	5,62 ±0,92
10	1,97 ±0,57	3,25 ±1,19	5,24 ±1,00
11	1,70 ±0,45	2,95 ±1,29	5,00 ±0,91
12	1,08 ±0,38	2,91 ±1,31	5,56 ±0,92
13	0,92 ±0,39	2,90 ±1,54	4,22 ±0,86
14	0,75 ±0,19	2,58 ±1,28	3,98 ±0,86
15	0,61 ±0,17	2,45 ±1,24	3,73 ±0,98
16	0,45 ±0,15	2,20 ±1,24	3,32 ±0,96
17	0,34 ±0,10	1,85 ±1,31	3,22 ±0,63
18	0,25 ±0,08	1,72 ±1,11	2,91 ±0,63

Annexes

Taux de cicatrisation en %					
Jour	Miel (%)	Témoin + (%)	Témoin - (%)	Lié à l'activité du miel (%)	Lié à l'activité du témoin + (%)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	17,55	8,58	7,75	9,80	0,83
2	33,86	15,99	13,22	20,64	2,77
3	41,64	17,56	21,25	20,40	-3,68
4	49,80	30,41	23,43	26,37	6,98
5	56,02	37,41	27,36	28,66	10,05
6	59,24	44,73	34,83	24,40	9,90
7	65,48	51,03	41,28	24,20	9,75
8	71,86	57,99	44,89	26,97	13,10
9	76,52	63,16	48,16	28,36	14,99
10	81,77	66,59	51,68	30,09	14,90
11	84,23	69,67	53,90	30,33	15,78
12	89,98	70,03	57,96	32,02	12,08
13	91,44	70,19	61,11	30,34	9,08
14	93,02	73,41	63,34	29,68	10,08
15	94,33	74,80	65,60	28,74	9,21
16	95,84	77,38	69,36	26,48	8,01
17	96,82	80,93	70,33	26,49	10,60
18	97,65	82,26	73,14	24,51	9,12

Annexes

Annexe III : Données détaillées sur l'évolution du poids des souris lors du test de toxicité aigue

Souris	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dose (mg/kg)	5	10	50	100	300	500	1000	2000	5000	5000	5000
Jour	Poids (g)										
J0	22,2	22,9	20	20,6	22,6	23,2	21,7	22,3	23	23,5	23,4
J1	22	22,6	19	19,5	21,5	23,5	22,5	22	23,4	23,2	22,8
J2	23,2	22,5	19,1	19,8	22	23,5	22,6	22,5	23,1	23,5	22,7
J3	23	23,7	19,5	20	22,3	23,6	22,9	23,4	23,9	24,4	23,2
J4	23,4	23,2	19,5	19,9	21,9	23,1	22,4	23,2	23,9	23,7	23,2
J5	24	23,3	19,2	19,9	22,9	23,1	23,1	23,1	24,4	23,8	24,2
J6	23,7	23,2	19,2	20,1	21,7	22,7	22,9	23,1	24,2	23,7	24,9
J7	24,1	23,7	19,8	20,2	22,5	22,7	23,4	23,9	24,7	23,7	24,5
J8	23,3	23,8	20	19,6	21,8	22,1	23,4	23,4	23,5	23,4	25
J9	23,1	23,5	20,3	19,5	21,9	22,5	23,4	23,1	24,8	23,3	24,7
J10	23,3	23,8	20,4	19,9	21,9	21,8	23,7	23,4	25	22,6	24,7
J11	23,4	23,6	20,1	20,2	21,9	21,5	23,9	23,3	25	22,9	24,4
J12	23,7	24,1	20,5	20,1	22,2	21,6	24,4	22,9	25,7	23,6	25
J13	23,8	24,1	20,5	19,9	22	21,1	24,2	22,6	26,8	23,1	24,5
J14	23,5	24,4	20,4	20,3	22,2	20,6	24,4	22,6	26,8	22,9	24,7

Annexes

Annexe IV : Données détaillées sur l'évolution du poids des souris lors de l'évaluation de l'apport alimentaire

	Témoin									
Souris	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Moyenne
Jour	Poids (g)									
0	19	16,4	16,2	17,8	20,5	16,7	15	19	19,4	17,78
1	18,7	16,4	17,7	17,2	21,1	16,8	15,1	19,6	19,6	18,02
2	18,9	15,6	17,8	16,2	21,6	16,4	15,1	20,3	19,9	17,98
3	19,2	15,1	18,5	15,4	21,4	16,1	14,7	20	20,1	17,83
4	19,9	15,5	18,9	15,2	21,6	16,6	15	20,7	20,8	18,24
5	21,1	15,6	19,6	15,3	22,4	17,3	15,3	21,3	20,4	18,70
6	20,3	15,1	18	14,4	21,2	16,3	14,2	20,9	19,7	17,79
7	20,6	15,8	19,6	15	22,4	17,3	14,4	21,1	21,2	18,60
8	20,9	15,9	20,5	15,7	22,5	17,7	14,4	21,6	21,4	18,96
9	20,7	15,7	21,1	15,5	23	17,8	14	22	21,6	19,04
10	21	15,9	21,4	16,2	23,2	18	14	22,9	21,5	19,34
11	20,5	16,3	21,3	16,1	23,4	18,1	14,5	22,1	21,6	19,32
12	20,4	16,5	21,6	16	23,5	18,2	14,2	22,6	21,5	19,39
13	20,1	16,5	21,7	15,7	23,7	18,1	14,5	22,6	21	19,32

Annexes

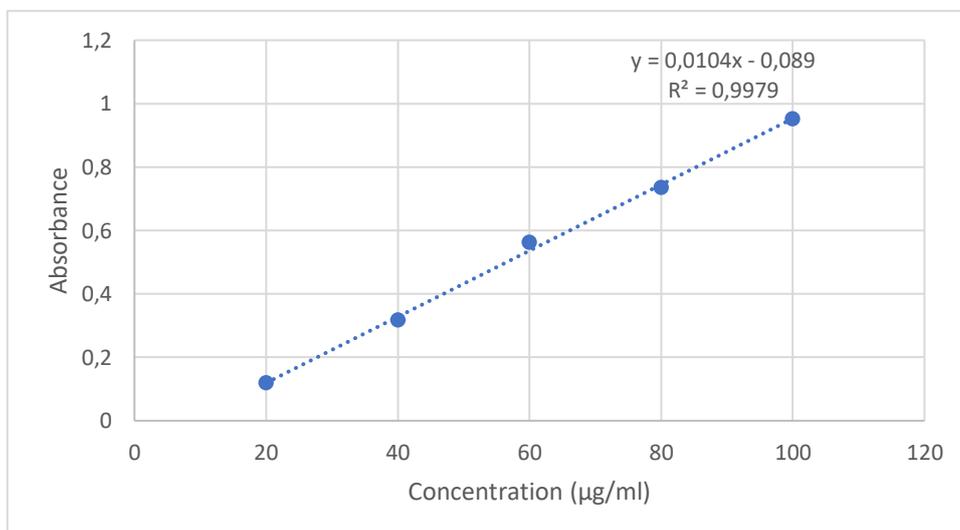
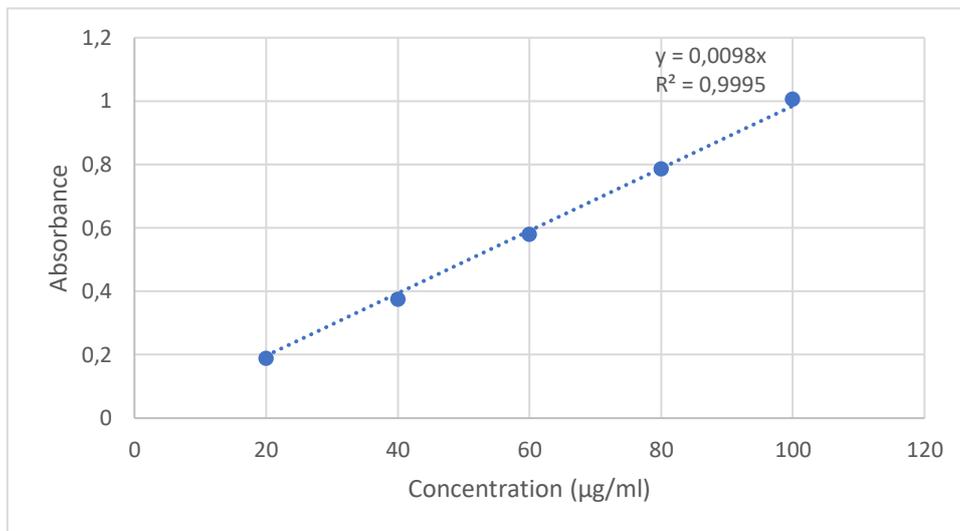
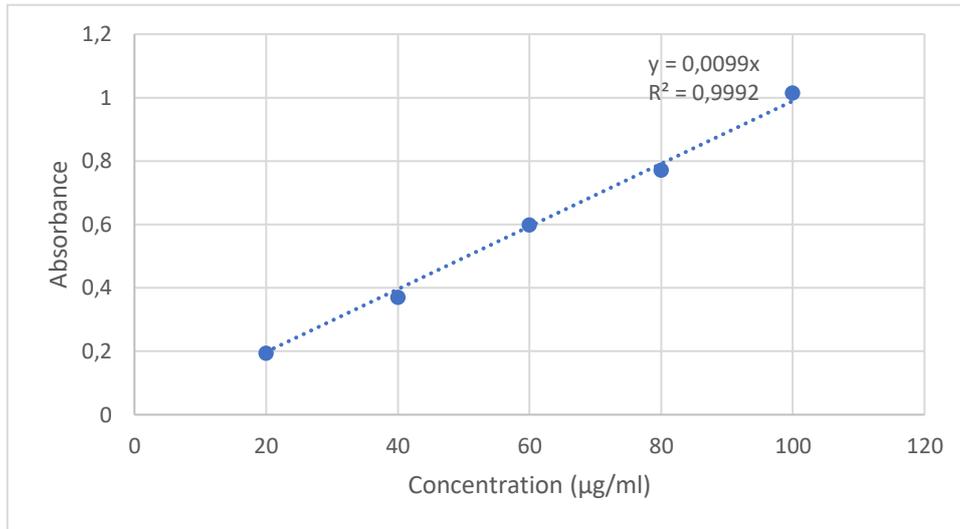
	Test									
Souris	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Moyenne
Jour	Poids (g)									
0	18	16,1	15,3	18,4	19	17,3	21,3	16,8	16,6	17,64
1	18,1	16,4	16	19,4	18,8	17,1	21,3	16,8	16,9	17,87
2	18,3	16,2	16,2	19,5	19,2	17,1	21,2	16,1	17,3	17,90
3	18,3	16	16	19,5	19,1	17,4	21,3	15,6	17,2	17,82
4	18,3	16,3	16,1	18,9	19,1	17,6	20,9	15,4	17,5	17,79
5	19,3	16	16,1	19,3	19,4	18	21,8	15,3	17,6	18,09
6	19	15,9	16	19,4	20	18,4	21,5	15,1	17,7	18,11
7	19,4	16,2	16	18,9	19,9	19,2	21,8	15,1	17,7	18,24
8	19,8	16,6	16,6	18,7	22	19,8	22,7	15,1	17,6	18,77
9	19,7	15,8	16,7	18,5	20,7	20,6	23,4	15	17,5	18,66
10	20,3	15,8	16,8	18,6	20,6	20	23,8	15,1	17,9	18,77
11	20,1	15,4	17,2	18,5	20,2	19,5	24,2	15,3	17,9	18,70
12	20,5	15,6	17,8	18,3	20,3	19,9	24,4	15,5	18,3	18,96
13	21,1	15,5	17,8	18,3	20,5	19,8	24	15,9	18,3	19,02

Annexes

	Moyenne	
	Poids Témoin (g)	Poids Test (g)
J0	17,78	17,64
J1	18,02	17,87
J2	17,98	17,90
J3	17,83	17,82
J4	18,24	17,79
J5	18,70	18,09
J6	17,79	18,11
J7	18,60	18,24
J8	18,96	18,77
J9	19,04	18,66
J10	19,34	18,77
J11	19,32	18,70
J12	19,39	18,96
J13	19,32	19,02
p-valeur	0,83	

Annexes

Annexe V : Courbes d'étalonnage utilisées pour le dosage des polyphénols respectivement pour E1, E2 et E3



Etude physico-chimique et pharmaco-toxicologique des effets du miel et du pollen

Résumé

Le miel et le pollen sont reconnus depuis l'antiquité pour leurs qualités nutritives et thérapeutiques, dont l'activité cicatrisante, antibactérienne et antifongique du miel et l'apport nutritionnel du pollen.

Dans le cadre de l'évaluation de ces différentes activités, notre travail a d'abord comporté une étape de contrôle des paramètres physicochimiques permettant de démontrer la qualité du miel de Kabylie étudié par rapport aux normes internationales. En effet, ce miel possède un effet cicatrisant plus prononcé comparé aux témoins positifs et négatifs respectivement traités avec un médicament de référence Madecassol® et non traités *in vivo* sur un modèle animal, cette activité est accompagnée par une activité antibactérienne sur les souches à Gram + et – étudiées.

Par ailleurs, le pollen n'a montré aucun apport nutritionnel significatif ainsi qu'aucun signe de toxicité aigüe aux plus hautes doses des essais effectués *in vivo*, il a aussi révélé une composition considérable en composés phénoliques.

Les résultats de ce travail démontrent que le miel de Kabylie répond aux normes internationales tout en mettant en exergue son pouvoir antibactérien et cicatrisant laissant envisager et encourager un recours à l'apithérapie. L'étude a aussi révélé la richesse du pollen en composés phénoliques ainsi que son innocuité vis-à-vis de l'organisme.

Mots-clés : Contrôle qualité ; Miel ; Pollen ; Kabylie ; Cicatrisation ; Activité antibactérienne et antifongique ; Apport nutritionnel ; Toxicité aigüe.

Summary

Honey and pollen have been recognized since ancient times for their nutritional and therapeutic qualities, including the healing, antibacterial and antifungal activity of honey and the nutritional contribution of pollen. Within the framework of the evaluation of these various activities, our study initially included a stage of control of the physicochemical parameters making it possible to prove the quality of the Kabyle honey studied compared to international standards. Indeed, this honey has a more pronounced healing effect compared to positive and negative controls respectively treated with a reference drug Madecassol® and not treated ones *in vivo* on an animal model, this activity is accompanied by an antibacterial activity on the Gram + and - strains studied.

In addition, pollen has shown no significant nutritional contribution as well as no sign of an acute toxicity at the highest doses of tests carried out *in vivo*, it has also revealed a considerable composition of phenolic compounds.

The results of this work demonstrate that Kabyle honey meets international standards while highlighting its antibacterial and healing power, allowing us to consider and encourage the use of apitherapy. The study also revealed the richness of pollen in phenolic compounds as well as its harmlessness towards the organism.

Keywords: Quality control; Honey; Pollen, Kabyle; Scarring; Antibacterial and antifungal activity; Nutritional contribution; Acute toxicity.

Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou

Département de Pharmacie