

UNIVERSITE de LIMOGES
Faculté de Pharmacie



ANNEE 1996

THESE N° 313/1

**ETUDE DE L'ACTIVITE
ANTIBACTERIENNE DU MIEL**

THESE

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 3 Avril 1996

par

Nadine GUILLON

née le 30 Octobre 1970 à Argenton-sur-Creuse (Indre)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur A. CHULIA, <i>Professeur</i>	PRESIDENT
Madame D. ALLAIS, <i>Maître de Conférences</i>	JUGE
Madame C. BOSGIRAUD, <i>Professeur</i>	JUGE
Monsieur B. DESCOTTES, <i>Professeur</i>	JUGE
Madame V. RATSIMBAZAFY, <i>Pharmacien des Hôpitaux</i>	MEMBRE INVITE

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE CHIMIE ORGANIQUE

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS :**

POMMARET Maryse

Je dédie cette thèse :

- à ma famille,
- à Stéphane,
- à mes amis.

Je remercie le Président, Monsieur A. CHULIA ainsi que tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et plus particulièrement :

- Monsieur B. DESCOTTES qui m'a permis de travailler en collaboration avec son équipe,
- Madame D. ALLAIS pour l'aide qu'elle m'a apportée.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

LES ABEILLES ET LES PRODUITS DE LA RUCHE

LES ABEILLES

- I CLASSIFICATION
- II VIE DES ABEILLES DANS LA RUCHE
- III ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ABEILLE OUVRIERE

LES PRODUITS DE LA RUCHE

- I LES PRODUITS DE LA RUCHE AUTRES QUE LE MIEL
- II LE MIEL

DEUXIEME PARTIE

ETUDE *IN VITRO* DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE DIFFERENTS MIELS

MATERIEL ET METHODES

- I ESSAIS PRELIMINAIRES
- II ETUDE PROPREMENT DITE

RESULTATS

- I ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS EN MILIEU NEUTRE
- II ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU SACCHAROSE ET DU MIEL DE REMPLACEMENT EN MILIEU NEUTRE
- III INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS

DISCUSSION

- I PROPRIETES CICATRISANTE ET ANTIBACTERIENNE DU MIEL
- II CRITIQUES DE NOTRE ETUDE
- III FACTEURS RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU MIEL
- IV LIMITES D'UTILISATION DU MIEL - PRECAUTIONS A PRENDRE

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Issu du mariage du monde animal avec le monde végétal, le miel est connu depuis la nuit des temps comme produit alimentaire. Il est également reconnu comme ayant des propriétés médicinales (stimulante, émolliente, adoucissante des voies laryngo-pharyngées, cicatrisante, antibactérienne, laxative...). Il peut d'ailleurs entrer dans la composition de médicaments appelés alors mellites.

En 1984, à l'initiative du Professeur B. DESCOTTES, le miel est utilisé pour la première fois chez une jeune femme de 20 ans hospitalisée dans le Service de Chirurgie B du C.H.U. de Limoges. Cette jeune femme présentait une plaie opératoire avec abcès de paroi qui ne guérissait pas avec les traitements habituels. Des pansements au miel ont permis une cicatrisation quasiment complète de la plaie en une semaine. Depuis cette première expérience, le miel est couramment utilisé par l'équipe infirmière pour la réfection de différentes plaies. Les résultats, dans leur grande majorité satisfaisants, mettent en évidence le pouvoir cicatrisant du miel.

Pour mieux connaître les propriétés thérapeutiques du miel et donc pour optimiser son utilisation, le Professeur B. DESCOTTES souhaitait que le miel soit étudié dans deux domaines qui sont ceux de la Bactériologie et de la Pharmacologie-Toxicologie. Nous avons alors recherché une activité antibactérienne du miel. Cette étude a été réalisée dans l'Unité d'Hygiène du Service de Bactériologie de l'hôpital.

Avant d'aborder la partie expérimentale, il nous a paru essentiel de présenter le monde des abeilles. Ces insectes organisés en colonies élaborent différents produits qui permettent le bon fonctionnement de la ruche. Parmi ces produits appelés produits de la ruche, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au miel.

La partie expérimentale, deuxième partie de ce travail, est constituée par l'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne du miel. Seront développés dans cette partie, les protocoles utilisés, les résultats obtenus et la discussion des résultats.

Nous terminerons par la conclusion de notre étude.

PREMIERE PARTIE

LES ABEILLES

ET

LES PRODUITS DE LA RUCHE

LES ABEILLES

I - CLASSIFICATION

L'abeille est un insecte appartenant :

- à la Famille des *Apidae*
- au Genre *Apis* qui regroupe des insectes sociaux vivant en colonies et se multipliant par essaimage (division d'une colonie devenue trop nombreuse aboutissant à la formation de deux colonies).

Les abeilles sont des insectes sociaux en ce sens qu'elles sont capables de récolter de la nourriture et de la mettre à la disposition des habitants de la ruche.

L'espèce rencontrée en France est : *Apis mellifera mellifera*

- *Apis mellifera* est l'abeille mellifère ou produisant du miel.
- *Apis mellifera mellifera* est l'abeille noire commune de l'Europe Occidentale également appelée abeille domestique.

II - VIE DES ABEILLES DANS LA RUCHE

A - La colonie

L'étude de l'abeille doit être celle d'un groupe et non celle d'un individu. En effet, les abeilles sont des insectes sociaux qui vivent en colonies comprenant de 40 000 à 100 000 abeilles.

Chaque ruche abrite une colonie qui comprend 3 sortes d'individus :

- la reine (une seule)
- les ouvrières (environ 50 000)
- les mâles ou faux-bourçons (environ 3000).

De plus, elle renferme en son centre le couvain constitué par l'ensemble des oeufs, des larves et des nymphes.

B - Organisation du travail

1 - La reine

C'est la mère de la colonie. Elle a une durée de vie moyenne de 4 ans. La reine est la seule femelle féconde; elle n'a qu'une seule fonction : pondre. Le nombre d'œufs pondus peut atteindre 2000 par 24 heures.

2 - Les ouvrières

Pendant toute leur vie, c'est-à-dire pendant 35 à 70 jours, elles assument les fonctions utiles à la colonie.

Le travail est réparti en fonction de l'âge des ouvrières (1) :

- Pendant les deux jours qui suivent la naissance, la jeune ouvrière nettoie soigneusement les alvéoles de cire qui accueilleront les œufs ou la nourriture.

- A partir du troisième jour, elle devient nourrice, assurant l'élevage du couvain. Ses glandes salivaires qui se développent alors sécrètent la gelée royale dont sont nourries les jeunes larves et la reine.

- Au onzième jour, alors que ses glandes salivaires sont atrophiées, ses glandes cirières deviennent fonctionnelles, ce qui lui permet de fabriquer la cire.

- L'ouvrière a également d'autres fonctions :

. elle est nettoyeuse; elle élimine les déchets qui encombrant la ruche.

. elle devient ventileuse pour renouveler l'air de la ruche et pour maintenir une température de l'ordre de 35°C au centre de l'habitat, quelle que soit la température extérieure.

. elle est ensuite une véritable gardienne, empêchant tout insecte de rentrer dans la ruche; lorsqu'un ennemi arrive à y pénétrer, s'il est trop gros pour être expulsé, les abeilles l'attaquent et l'entourent d'une couche de propolis afin d'éviter la putréfaction.

. elle aide également l'ouvrière butineuse à se débarrasser de sa récolte de pollen et elle concentre le nectar pour élaborer le miel.

- Vers le vingt-et-unième jour, ayant accompli sa mission au sein de la ruche, l'ouvrière sort enfin dans la nature pour devenir butineuse jusqu'à la fin de sa vie.

3 - Les mâles ou faux-bourçons

Ils sont présents au sein de la colonie entre Avril et Septembre pour féconder la reine lors du vol nuptial par un accouplement qui leur enlève la vie.

Ils sont incapables de se nourrir et dépendent donc étroitement des ouvrières.

Leur durée de vie est en moyenne de 4 mois.

C - Communication entre abeilles (2)

Le comportement social de la colonie est organisé par l'échange d'informations interprétées à tout instant par l'ensemble des ouvrières. Elles entraînent une régulation permanente des activités ou déclenchent certains types de réactions.

Nous n'aborderons ici qu'un seul moyen de communication représenté par les phéromones mais il faut savoir que des informations peuvent être transmises par des danses et par des messages auditifs.

Les phéromones sont des substances chimiques odorantes émises et perçues par les abeilles d'une même collectivité. La glande de Nasanoff située au niveau de leur abdomen est un organe olfactif émetteur. Les organes olfactifs récepteurs sont situés dans leurs antennes.

Les phéromones de la reine sont transmises à la colonie grâce aux nourrices qui lui lèchent le corps pour l'entretenir. Les substances sont communiquées aux autres ouvrières par simple contact ou lors d'échanges de nourriture (trophallaxie). Une de ces phéromones empêche le développement des ovaires des ouvrières ce qui les rend stériles.

Dans une situation d'agression, les abeilles sont capables d'émettre des phéromones pour avertir leurs soeurs afin d'assurer la défense de la colonie.

III - ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ABEILLE OUVRIERE

Nous verrons l'organisation générale du corps de l'ouvrière c'est-à-dire la tête, le thorax et l'abdomen qui nous permettent de comprendre comment sont élaborés les différents produits de la ruche.

Nous détaillerons le fonctionnement de l'appareil digestif pour expliquer le mécanisme de formation du miel.

A - Schéma général (Figure 1)

Le corps de l'abeille est formé de trois parties mobiles les unes par rapport aux autres : la tête, le thorax et l'abdomen.

1 - La tête (Figure 2)

Elle présente deux gros yeux latéraux et trois petits yeux ou ocelles à son sommet.

Elle contient des glandes salivaires :

- . les glandes hypopharyngiennes qui chez les jeunes ouvrières sécrètent la gelée royale et
- . les glandes mandibulaires qui interviennent également dans la fabrication de la gelée royale.

Enfin, elle porte une paire d'antennes et les pièces buccales.

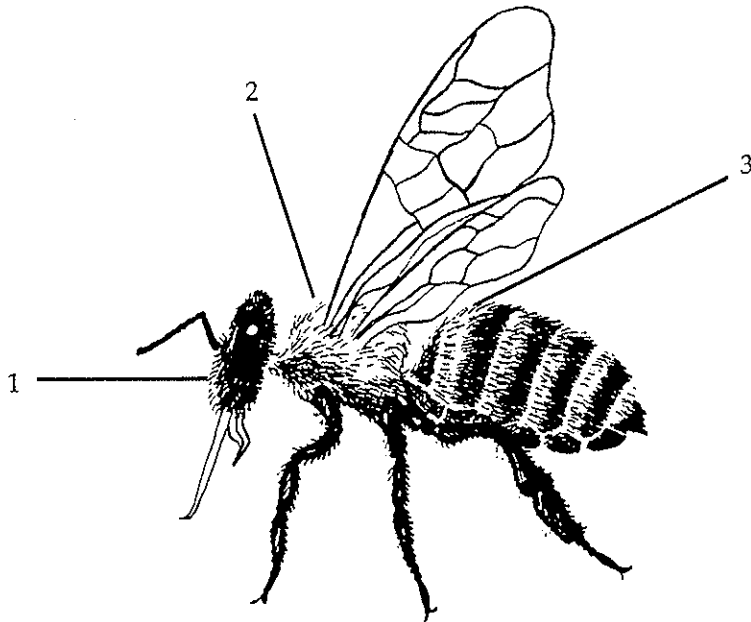


Figure 1 : Schéma général de l'abeille ouvrière (3)
 (1: tête , 2: thorax , 3: abdomen)

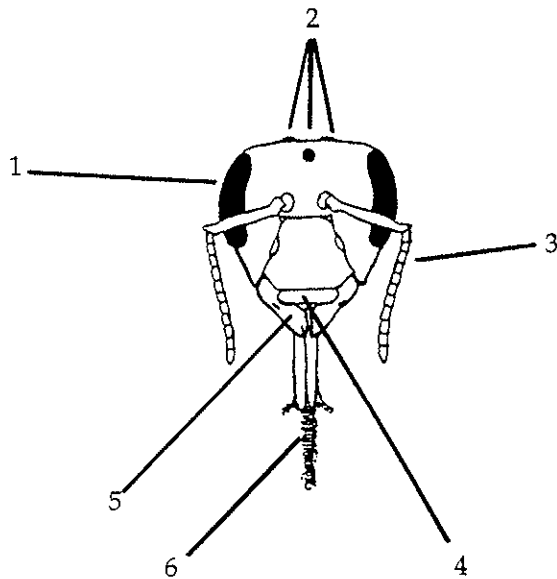


Figure 2 : Tête de l'abeille ouvrière (vue antérieure) (3)
 (1: œil latéral , 2: ocelles , 3: antenne , 4: labre , 5: mandibule , 6: trompe)

2 - Le thorax

Il est formé de trois segments sur lesquels sont fixées deux paires d'ailes et trois paires de pattes.

Pendant le butinage, l'abeille se recouvre de pollen (élément mâle sous la forme de grains microscopiques contenu dans les étamines des fleurs) auquel elle ajoute un peu de nectar et de salive et qu'elle rassemble grâce à ses pattes. C'est au niveau de la troisième paire de pattes munie de brosses à pollen qu'il est maintenu en place (grâce aux poils) sous la forme de pelotes et transporté jusqu'à la ruche.

Les pattes transportent également la propolis recueillie sur les bourgeons de certains arbres comme le peuplier, le pin, le sapin, le bouleau, le saule; il s'agit d'une substance gluante à laquelle l'abeille ajoute un peu de ses sécrétions salivaires et qui est ramenée à la ruche.

3 - L'abdomen

Il se compose de sept anneaux dont l'extrémité du dernier abrite l'appareil vulnérant.

L'appareil vulnérant comprend :

- . deux glandes à venin dont l'une élabore un liquide acide et l'autre un liquide basique
- . un réservoir à venin
- . deux soies barbelées très fines et très aiguës constituant le dard ou aiguillon.

Lors d'une piqûre, seul le dard pénètre dans la peau et le venin est injecté. En partant, l'abeille qui laisse l'aiguillon est mortellement blessée.

L'abdomen possède également huit glandes cirières (quatre paires) situées à la partie ventrale au niveau des quatre derniers anneaux. La cire est sécrétée à partir de réserves grasses puis excrétée sous l'abdomen sous la forme de très fines lamelles qui se solidifient au contact de l'air. L'abeille récupère la cire fabriquée en se raclant le ventre avec les pattes postérieures et y incorpore de la salive pour pouvoir la façonner sous forme d'alvéoles hexagonales.

Entre le sixième et le septième anneaux, à la partie dorsale, apparaît un petit organe appelé glande de Nasanoff qui permet d'émettre des phéromones.

B - Appareil digestif

1 - Les pièces buccales (Figure 2)

La bouche de l'abeille est formée de pièces buccales du type broyeur-lécheur :

- . le labre ou lèvre supérieure
- . une paire de mandibules qui fonctionnent de la même façon qu'une paire de pinces (permettant notamment de façonner la cire)
- . une trompe adaptée à la récolte du nectar, composée de plusieurs pièces entourant la langue, le tout formant des tubes concentriques permettant :

- d'une part, l'absorption de l'eau et des sirops ainsi que, par l'extrémité spongieuse de la langue, l'aspiration du nectar.

- d'autre part, l'expulsion de la salive destinée à dissoudre les sucres.

2 - Le jabot (Figure 3)

L'appareil buccal est relié au jabot par l'intermédiaire de l'œsophage. Le jabot est une poche très mince, extensible, située dans l'abdomen. Il reçoit le nectar aspiré dans les fleurs. Le nectar est sécrété par les nectaires, petites glandes qui existent chez de nombreuses plantes le plus souvent au niveau floral (Figure 4). Une fois absorbé, il se dirige vers l'intestin moyen et constitue alors un aliment énergétique pour l'abeille. Cependant, il peut servir à la fabrication du miel et, dans ce cas au lieu d'être digéré, il est régurgité.

3 - L'intestin moyen

Il s'agit d'une sorte d'estomac qui digère la nourriture de l'abeille.

4 - Annexes du tube digestif

a - Les glandes hypopharyngiennes (dans la tête)

Chez l'abeille ouvrière, elles interviennent dans l'élaboration du miel.

b - Les glandes labiales (dans la tête et dans le thorax)

Elles permettent d'ensaliver les sucres.

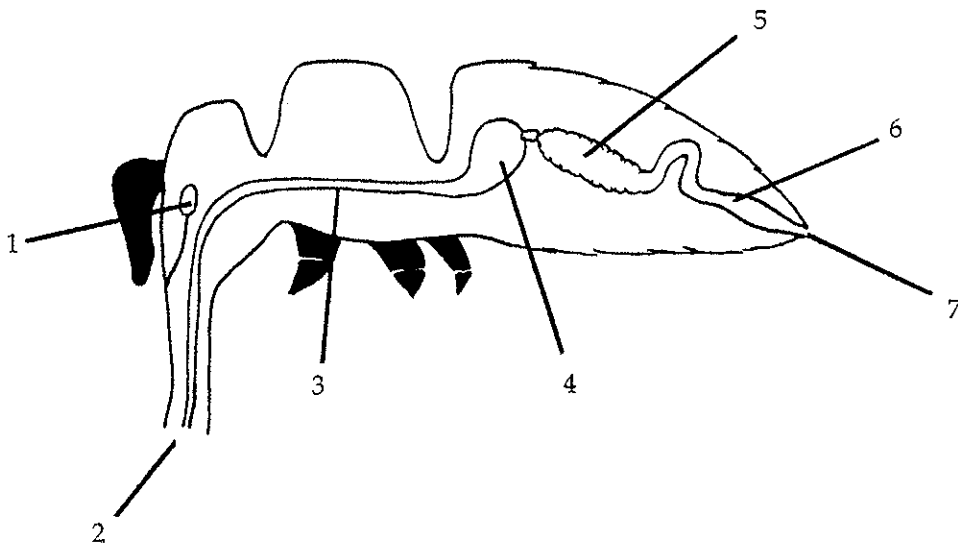


Figure 3 : Coupe schématique de l'appareil digestif (4)

(1: glande hypopharyngienne , 2: trompe , 3: œsophage , 4: jabot , 5: intestin moyen , 6: intestin postérieur , 7: anus)

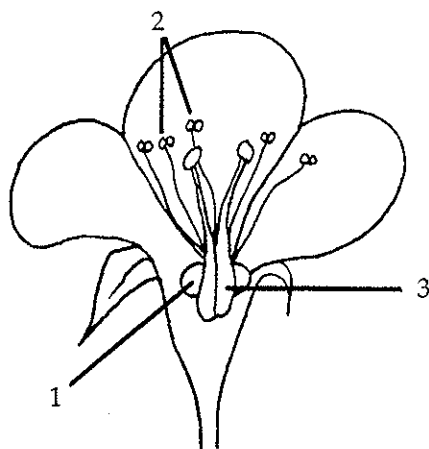


Figure 4 : **Coupe schématique d'une fleur** (5)
 (1: nectaire , 2: étamines , 3: pistil)

C - Mécanisme de formation du miel (5) (6)

Quand la butineuse revient à la ruche, elle régurgite le contenu de son jabot rempli de nectar qui est absorbé par une abeille restant à la ruche, laquelle remplit son jabot et régurgite à son tour sur la langue d'une autre ouvrière et ainsi de suite... Cette circulation de nectar d'abeille en abeille qui s'appelle la trophallaxie concentre peu à peu le nectar.

En même temps, les ouvrières y incorporent un peu de leurs sécrétions salivaires riches en enzymes dont l'invertase qui hydrolysent les polysaccharides du nectar en sucres simples (glucose et fructose); mais ce n'est probablement pas la seule transformation que subit le nectar.

Le système de ventilation installé dans la ruche contribue également à la concentration du nectar qui devient alors miel.

LES PRODUITS DE LA RUCHE

Le pollen, la cire, la gelée royale, la propolis et bien-sûr le miel constituent les produits dits de la ruche récoltés par l'apiculteur. Dans ce chapitre, nous parlerons également du venin d'abeille (utilisé en Homéopathie).

I - LES PRODUITS DE LA RUCHE AUTRES QUE LE MIEL

A - Le pollen

Il ne faut pas confondre le pollen contenu dans les étamines (ou organes mâles) des fleurs du pollen récupéré dans la ruche. Le premier est constitué de grains microscopiques appelés grains de pollen tandis que le second se présente sous la forme de pelotes de deux ou trois millimètres de diamètre fabriquées à partir des grains de pollen auxquels l'abeille incorpore du nectar et de la salive.

La composition du pollen d'abeille varie suivant l'origine florale. Mais nous pouvons dire qu'il constitue une source importante de protéines et de glucides.

Composition moyenne :

- . protéines - acides aminés (25-35%)
- . glucides, dus essentiellement au nectar (30%)
- . eau (10-15%)
- . lipides
- . vitamines
- . éléments minéraux
- . pigments (dont flavonoïdes)

B - La cire

La cire est sécrétée par les glandes cirières situées à la partie ventrale de l'abdomen de l'ouvrière; elle est ensuite excrétée au même niveau de l'abdomen et façonnée par l'abeille au moyen de ses pièces buccales pour fabriquer des cellules hexagonales. La cire qui, au moment de son excrétion est parfaitement blanche et pure, se charge dans la ruche de matières comme la propolis et les pigments du pollen, ce qui modifie sa couleur.

Composition moyenne :

- . esters d'acides gras (70%)
- . acides gras libres (14%)
- . hydrocarbures saturés (12%)
- . eau et divers (3%)

C - La gelée royale

La gelée royale, fabriquée à partir de glandes salivaires situées dans la tête et l'abdomen de l'abeille, est une substance gélatineuse de couleur jaune pâle et de saveur acide.

Composition moyenne en % de matières sèches (la teneur en eau de la gelée royale fraîche est de 60%) :

- . protéines - acides aminés (40-45%)
- . stérols (15%)
- . lipides (10-15%)
- . matières minérales (2,5%)
- . glucides
- . vitamines du groupe B

D - La propolis

La propolis, récoltée par les abeilles au niveau des bourgeons de certains arbres, est une substance de consistance visqueuse et collante, de couleur brun-jaune, d'odeur très prononcée (odeur de miel et de résines). Ses propriétés varient selon sa provenance.

Composition moyenne :

- . substances résineuses (55%)
- . cire (30%)
- . substances diverses - baumes, huiles essentielles - (10%)
- . pollen (5%)

E - Le venin

Le venin est un liquide odorant (ce qui excite l'agressivité des abeilles de la colonie), contenant une forte proportion d'eau, des acides organiques (acide formique, acide chlorhydrique, acide phosphorique) et des enzymes. Il est riche en mellitine, acide aminé dont la dégradation enzymatique produit l'histamine responsable de l'action inflammatoire.

II - LE MIEL

A - Définitions

1 - Le miel (5)

“ Le miel est la substance sucrée produite par les abeilles à partir du nectar, du miellat et autres matières sucrées qu’elles récoltent sur les végétaux, enrichissent de substances provenant de leur corps, transforment dans leur corps, entreposent dans les rayons et font mûrir... C’est une substance visqueuse d’une coloration très variable pouvant aller du jaune le plus clair au brun très foncé, de saveur très sucrée, acide et plus ou moins aromatique “.

2 - Le nectar et le miellat

a - Le nectar

Le nectar est sécrété par les nectaires situés le plus souvent à la base des organes floraux des végétaux. Il est composé d’une majorité d’eau, de sucres et de substances diverses.

b - Le miellat

Ce sont les pucerons et les cochenilles qui produisent le miellat. Leurs pièces buccales permettent de prélever la sève de certains arbres comme le pin, le sapin, le chêne... qui subit, dans leur tube digestif, des transformations dues aux sucs digestifs qui en font le miellat expulsé par l’anus.

Le miellat, déposé le plus souvent sur les feuilles de ces mêmes arbres, est un liquide sucré et visqueux très riche en eau que les abeilles peuvent aisément aspirer avec leur trompe.

Il contient moins de sucres que le nectar mais plus de protéines.

La flore mellifère regroupe les végétaux producteurs de nectar (c'est-à-dire qui possèdent des nectaires floraux ou extra-floraux) et, par extension, les végétaux qui fournissent du miellat par l'intermédiaire des pucerons.

Remarque :

Il existe des arbres qui donnent à la fois du nectar et du miellat.
Exemple : le châtaignier.

B - Les différents types de miel

Il existe deux catégories de miel :

- les miels "monofloraux" ou "unifloraux" encore appelés "miels de cru" qui proviennent de façon prédominante d'une plante déterminée.

- les miels "polyfloraux" communément appelés "miels toutes fleurs" qui proviennent de multiples récoltes par les abeilles et sans dominance nette d'une plante particulière.

C - Propriétés physiques (3)

1 - Couleurs

Selon l'origine florale, la couleur du miel peut aller du blanc-crème au marron foncé.

2 - Turbidité

Le miel contient toujours des particules en suspension d'où une certaine turbidité.

3 - Viscosité

Elle dépend de la température, de la teneur en eau et de la composition chimique.

4 - Densité

Elle est de 1,42 à 20°C.

5 - Chaleur spécifique

La chaleur massique est de 0,54 de celle de l'eau à 20°C quand le miel contient 17% d'eau.

Il faut donc deux fois moins d'énergie pour chauffer du miel que pour chauffer la même quantité d'eau.

6 - Indice de réfraction

Mesuré avec un réfractomètre, il permet de déterminer la teneur en eau du miel qui varie de 17 à 20%.

7 - Acidité

Le pH varie entre 3 et 6.

8 - Conductivité électrique

Elle permet de différencier les miels de miellat des miels de nectar.

Ce sont les miels de miellat qui ont la conductivité électrique la plus élevée car ils sont riches en substances ionisables c'est-à-dire en substances minérales.

D - Composition chimique (Figure 5)1 - Eau

La teneur en eau est variable selon les miels. Elle est en moyenne de 17%.

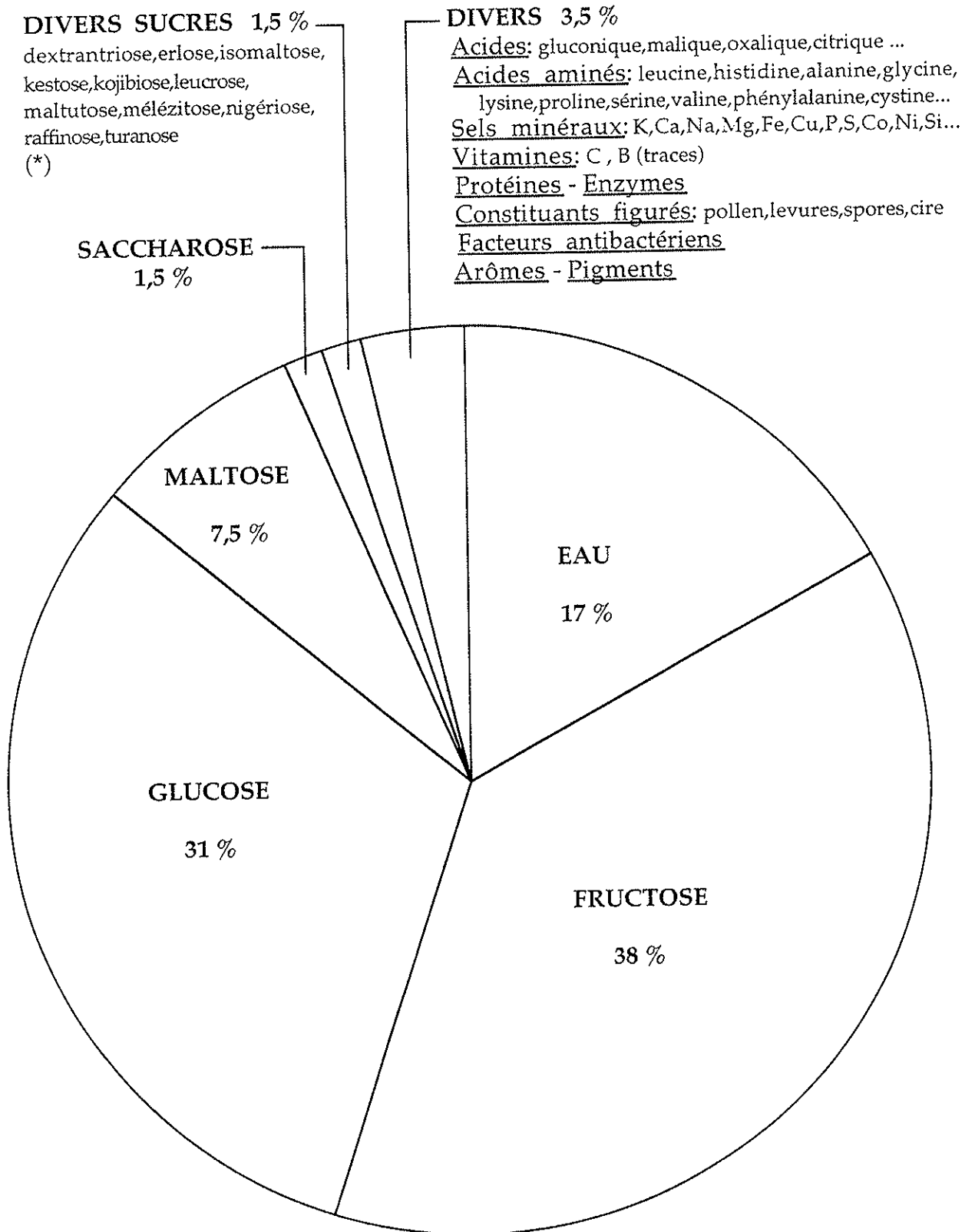


Figure 5 : Composition moyenne du miel (7)

(*) : ces constituants ne sont jamais tous présents dans un même miel.

2 - Glucides (79,5%)a - Monosaccharides

- . glucose (dextrose) : 31%
- . fructose (lévulose) : 38%

b - Disaccharides

- . maltose (2 molécules de glucose) : 7,5%
- . saccharose (glucose et fructose) : 1,5%

c - Divers sucres (1,5%)

Ces sucres sont différents selon l'origine florale.

3 - Acides aminés

Ils proviennent du nectar, des abeilles et du pollen.

4 - Acides organiques

Acides : gluconique
malique
oxalique ...

L'acide gluconique est formé dans le miel à partir du glucose en présence d'oxygène par action d'une enzyme salivaire de l'abeille, la glucose-oxydase.

5 - Enzymes

Elles proviennent, pour la plupart, des sécrétions salivaires des abeilles :

invertase (hydrolyse du saccharose en glucose et fructose)
glucose-oxydase (formation d'acide gluconique)
amylase
catalase
phosphatase

6 - Sels minéraux

C'est essentiellement le potassium qui est présent mais aussi le calcium, le magnésium, le sodium, le fer ...

Les miels foncés sont les plus riches en éléments minéraux.

7 - Vitamines

Les vitamines du groupe B provenant du pollen et la vitamine C provenant du nectar sont présentes à l'état de traces.

Il n'y a aucune vitamine liposoluble.

8 - Pigments

caroténoïdes et flavonoïdes

9 - Arômes

alcools, aldéhydes, cétones ...

10 - Eléments figurés

Le miel contient :

- . du pollen (l'analyse pollinique permet de définir l'origine florale des miels)

- . de la cire

- . des levures

- . des spores de champignons.

E - Vieillessement

1 - Cristallisation

Le miel qui vient d'être extrait par l'apiculteur est toujours liquide. Cependant, étant donné sa forte proportion de sucres, il finit par cristalliser plus ou moins rapidement au cours du temps.

a - Facteurs qui influencent la cristallisation

. la quantité des monosaccharides :

La cristallisation est d'autant plus rapide que le miel contient plus de glucose qui est peu soluble dans l'eau et moins de fructose qui est très soluble dans l'eau (les quantités de glucose et de fructose varient selon l'origine florale des miels).

. la température :

Le miel stocké dans la ruche est conservé à 29°C environ. La diminution de température favorise la cristallisation.

. "les amorces" de cristallisation :

Le miel contient des particules en suspension qui constituent l'amorce du phénomène.

b - Conséquences

Les sucres, qui se présentent alors sous forme de cristaux, emprisonnent l'eau et les substances qui y sont dissoutes. La cristallisation n'altère nullement la qualité du produit. Cependant, si la teneur en eau est supérieure à 18%, la texture du miel cristallisé manque de rigidité, les cristaux se déposent au fond et donc se séparent de la partie liquide ainsi exposée à la fermentation.

2 - Fermentation

Tous les miels contiennent des levures responsables de la fermentation alcoolique. Ces levures se développent à une température de 20-25°C si la teneur en eau dépasse 18%. La fermentation aboutit à une augmentation de l'acidité du miel d'où une diminution du pH.

3 - Autres transformations

- diminution de la quantité d'enzymes

- augmentation de la quantité d'hydroxy-méthyl-furfural (H.M.F.) produit à partir du fructose en milieu acide. La quantité de H.M.F. est pratiquement nulle au moment de la récolte, mais elle augmente avec le temps et surtout après un traitement brutal par la chaleur. Le taux de H.M.F. est le principal témoin du vieillissement du miel.

Les abeilles ouvrières sont les seules travailleuses de la colonie. Les produits de la ruche qu'elles élaborent sont le miel, le pollen, la cire, la gelée royale, la propolis et le venin.

Mais dans la première partie, l'étude du miel a été approfondie afin de mieux connaître l'origine, la composition et les diverses propriétés de ce produit de la ruche que nous avons testé en Bactériologie.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE *IN VITRO*
DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE
DE DIFFERENTS MIELS

Le but du travail était d'observer l'action de différents miels sur le développement des germes.

L'étude de l'activité antibactérienne d'une substance peut être calquée sur les techniques d'étude *in vitro* des antibiotiques.

Il existe principalement :

- la méthode par diffusion en milieu solide
- la méthode par dilution en milieu solide ou liquide.

Nous avons d'abord effectué des essais préliminaires afin de mettre au point une technique qui nous a permis ensuite de réaliser l'étude proprement dite.

MATERIEL ET METHODES

I - ESSAIS PRELIMINAIRES

Le miel est un produit de consistance semi-solide qui est relativement difficile à manipuler *in vitro*.

Technique de diffusion en milieu gélosé :

Cette technique consiste à mettre le produit à étudier à la surface d'un milieu gélosé ensemencé avec une souche bactérienne et à mesurer le diamètre d'inhibition de culture autour du produit.

Cette technique s'est très vite révélée inapplicable au miel car c'est un produit semi-solide difficile à manier et dont les faibles quantités utilisables étaient inefficaces.

Technique de dilution en milieu solide :

Cette technique consiste à inclure dans un milieu de culture des concentrations variables du produit à étudier. L'effet antibactérien est alors recherché en déposant à la surface du milieu un inoculum bactérien.

Nous avons essayé d'appliquer cette technique au miel.

A - Milieu de culture

. Nous avons d'abord choisi la gélose standard P.C.A. qui est un milieu nutritif neutre utilisé pour le dénombrement des germes aérobies dans les eaux et dans les denrées alimentaires.

Composition de la gélose standard P.C.A. en g/l d'eau distillée :

Peptone : 5

Extrait de levure : 2,5

Glucose : 1

Agar : 15

Le pH final de la solution est de 7,0 +/- 0,2.

. Nous avons ensuite utilisé le milieu Mueller-Hinton servant habituellement à l'étude des antibiotiques.

Composition du milieu Mueller-Hinton en g/l d'eau distillée :

Infusion de 300 g de viande de bœuf déshydratée

Hydrolysate acide de caséine : 17,5

Amidon de maïs : 1,5

Agar : 10

Le pH final du milieu est de 7,4.

B - Miel

Le miel utilisé était du miel de châtaignier.

Au cours des essais, il a été inclus dans le milieu de culture aux concentrations suivantes, en g/ml :

- avec le milieu standard P.C.A. :

. 0,005 (0,5%) - 0,01 (1%) - 0,02 (2%)

. 0,10 (10%) - 0,20 (20%) - 0,50 (50%)

. 0,01 (1%) - 0,05 (5%) - 0,10 (10%) - 0,20 (20%) - 0,30 (30%) - 0,40 (40%) - 0,50 (50%).

- avec le milieu Mueller-Hinton :

0,01 (1%) - 0,05 (5%) - 0,10 (10%) - 0,20 (20%) - 0,30 (30%) - 0,40 (40%) - 0,50 (50%).

C - Préparation

Les milieux utilisés pour l'étude de l'activité antibactérienne du miel ont été préparés selon la technique de dilution en milieu solide :

- le miel est pesé directement dans des boîtes de Pétri vides.

- la gélose, maintenue liquide à 40-45°C dans un bain-marie est versée dans les boîtes. Elle a d'abord été pesée et comme nous avons remarqué une équivalence poids-volume à savoir que 20 grammes de gélose correspondaient à une quantité de 20 ml, elle a ensuite été pipetée avec précision.

- le miel est homogénéisé par des mouvements circulaires des boîtes également maintenues à chaud sur une plaque chauffante réglée à 30-35°C (la température du miel au sein de la ruche ne dépasserait pas 35-40°C). Pour les milieux dont la concentration en miel dépasse 0,30g/ml, l'homogénéisation est très difficile à obtenir étant donné la grande quantité de sucres à dissoudre.

- les boîtes ainsi préparées sont laissées au repos à température ambiante pour que l'ensemble miel-gélose se solidifie.

- les milieux sont ensuite mis à sécher dans l'étuve à 37°C pendant 10 minutes.

A chaque manipulation, un milieu témoin contenant uniquement la gélose (P.C.A. ou Mueller-Hinton) a été réalisé.

D - Culture

1 - Essais à inoculum variable

a - Souche utilisée

Pour tester les variations éventuelles liées à l'inoculum, nous avons d'abord utilisé une souche d'*Escherichia coli* à partir de laquelle nous avons préparé une suspension contenant environ 10^8 germes/ml d'eau stérile (suspension mère).

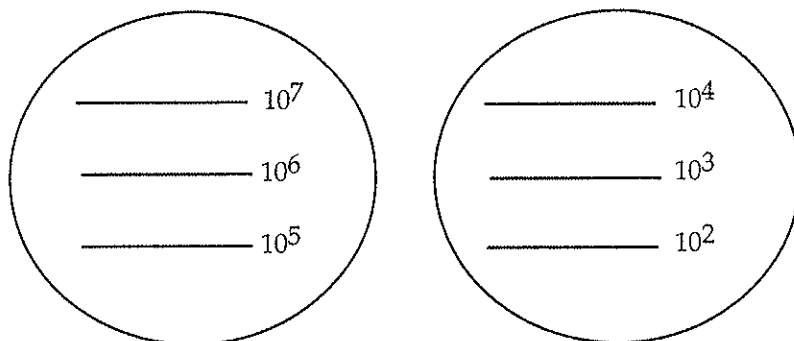
Par des dilutions successives, nous avons obtenu des suspensions contenant environ 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 germes/ml.

b - Ensemencement

Les milieux de culture (gélose P.C.A.) aux différentes concentrations de miel (0,005, 0,01, 0,02 g/ml et 0,10, 0,20, 0,50 g/ml) ont été ensemencés avec les suspensions d'*Escherichia coli* précédentes.

10 μ l de chacune de ses suspensions ont été déposés sur le milieu témoin et sur les différents milieux.

Les dépôts ont été faits à l'aide d'une öse de la façon suivante :



c - Incubation

Les boîtes ensemencées ont été mises dans l'étuve à 37°C pendant 20 heures.

d - Résultats

Les boîtes de Pétri contenant 0,005, 0,01 et 0,02 g/ml de miel présentait de nombreuses colonies d'*Escherichia coli* quelle que soit la concentration du germe au départ : cet essai ne montre pas d'action inhibitrice du miel sur le germe utilisé.

En ce qui concerne l'essai réalisé avec les milieux contenant 0,10, 0,20 et 0,50 g/ml de miel, nous avons remarqué que :

- sur le milieu à 0,10 g/ml de miel, pour l'inoculum à 10^7 germes/ml, le développement d'*Escherichia coli* est identique à celui sur le témoin alors que pour les suspensions à 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 germes/ml, le développement est moindre.

- sur les milieux contenant 0,20 et 0,50 g/ml de miel, la croissance d'*Escherichia coli* est complètement inhibée quel que soit l'inoculum.

A partir d'une certaine concentration, le miel a donc une action inhibitrice sur le développement des germes quel que soit l'inoculum.

2 - Essais à inoculum fixe

a - Souches utilisées

Nous avons mis en suspension différentes bactéries à raison de 10^8 germes/ml d'eau stérile.

Nous avons choisi des germes qui se retrouvent assez couramment au niveau des plaies infectées. Certains ont même été isolés à partir de plaies de malades hospitalisés dans le Service de Chirurgie B.

Les germes utilisés étaient des germes de la flore cutanée, de l'intestin et du milieu extérieur.

- Germes de la flore cutanée : Staphylocoques

Staphylococcus aureus (2 souches)

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

Staphylococcus à coagulase négative

- Germes intestinaux : Entérobactéries

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella oxytoca

Proteus mirabilis

Enterobacter cloacae

Escherichia coli (2 souches dont une issue de Chirurgie B)

- Germes du milieu extérieur :

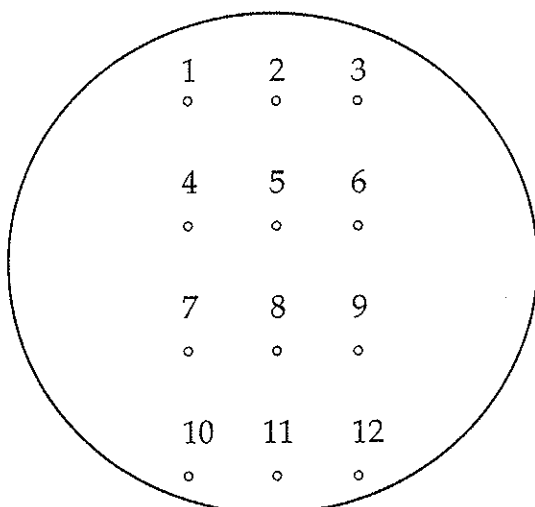
Pseudomonas aeruginosa

Bacillus subtilis ATCC6633 (souche de référence)

b - Ensemencement

Les suspensions des diverses bactéries (à environ 10^8 germes/ml) ont été déposées en spots de $10\mu\text{l}$ sur tous les milieux dont certains contenaient la gélose P.C.A. et d'autres la gélose Mueller-Hinton; le miel était aux concentrations de 0,01 - 0,05 - 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,40 et 0,50 g/ml.

Les dépôts ont été faits à l'aide d'une öse de la façon suivante :



1: *Staphylococcus aureus*, 2: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, 3: *Staphylococcus* à coagulase négative, 4: *Staphylococcus aureus*, 5: *Klebsiella pneumoniae*, 6: *Klebsiella oxytoca*, 7: *Proteus mirabilis*, 8: *Enterobacter cloacae*, 9: *Escherichia coli*, 10: *Pseudomonas aeruginosa*, 11: *Escherichia coli*, 12: *Bacillus subtilis* ATCC6633.

c - Incubation

Les boîtes ensemencées ont été mises dans l'étuve à 37°C pendant 20 heures.

d - Résultats

Les résultats sont les mêmes avec la gélose P.C.A. qu'avec la gélose Mueller-Hinton:

- Toutes les souches poussent sur les milieux témoins
- Aucune souche ne se développe sur les milieux contenant 0,20, 0,30, 0,40 et 0,50 g/ml de miel.

Les essais préliminaires nous ont permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de la croissance de différents germes mis en culture par des suspensions à environ 10^8 germes/ml sur un milieu neutre (milieu P.C.A. ou milieu Mueller-Hinton) contenant une quantité minimale de 0,20 g/ml de miel de châtaignier.

II - ETUDE PROPREMENT DITE

A - Milieu de culture

Le milieu de culture que nous avons utilisé est la gélose neutre Mueller-Hinton (à pH 7).

B - Produits testés

1 - Miels

a - Miels toutes fleurs et miel de châtaignier

Nous avons utilisé un miel polyfloral (toutes fleurs) et un miel de châtaignier produits en Haute-Vienne.

Le miel toutes fleurs est considéré comme le plus général puisqu'issu de la récolte du nectar de différentes fleurs par les abeilles.

Le miel de châtaignier est un miel de nectar contenant probablement un peu de miellat.

Ces deux miels ont été extraits de la cire uniquement par écoulement (sans aucune pression de la cire) et non par centrifugation au cours de laquelle le miel subit des chocs contre les parois de la centrifugeuse.

Au cours de notre étude, alors qu'ils étaient déjà cristallisés, les miels ont été conservés à une température de l'ordre de 14°C et à l'abri de la lumière.

b - Miel utilisé en Chirurgie Viscérale et Transplantations

Nous avons testé le miel toutes fleurs appliqué sur différentes plaies de malades hospitalisés dans le Service de Chirurgie B du Professeur B. DESCOTTES. Ce miel (également produit en Haute-Vienne) qui était à l'état liquide a été conservé à température ambiante et à la lumière du jour.

c - Miel de thym

Le miel de thym que nous avons utilisé est produit dans le Var.

2 - Aromiels

L'alliance d'un miel et d'une huile essentielle constitue un aromel ou aromiel. Les aromiels que nous avons utilisés ont été préparés à partir du miel de thym cité précédemment.

Le thym, plante à huile essentielle, existe sous différents chimiotypes (ou races chimiques) dont le thym à prédominance de thymol et le thym à prédominance de linalol.

Une huile essentielle est un mélange complexe de composés terpéniques (comme le thymol et le linalol), de composés aromatiques et de substances diverses.

Ce sont les huiles essentielles des deux types de thym (à thymol et à linalol) qui ont été incorporées séparément au miel de thym "classique" : 5 gouttes d'huile essentielle ont été mélangées à 50 grammes de miel (préparation extemporanée).

Les aromiels ainsi obtenus ont été appelés aromiel thym-thymol et aromiel thym-linalol.

3 - Saccharose

Nous avons utilisé du sucre cristallisé du commerce.

4 - Miel de remplacement

Nous avons fait préparer du succédané de miel que nous avons conservé dans les mêmes conditions que le miel c'est-à-dire à 14°C et à l'abri de la lumière.

Composition du succédané de miel :

fructose : 38%
 glucose : 31%
 eau : 18%
 maltose : 9,5%
 saccharose : 3,5%

Les différents produits testés ont été inclus dans le milieu gélosé à différentes concentrations soient :

0,01g/ml - 0,05g/ml - 0,10g/ml - 0,15g/ml - 0,20g/ml - 0,25g/ml et 0,30g/ml.

C - Préparation (Tableau I)

La méthode de préparation des milieux de culture contenant le produit testé est celle mise au point lors des essais préliminaires.

Concentrations du produit testé en g/ml (en %) du milieu de culture	0,01 (1)	0,05 (5)	0,10 (10)	0,15 (15)	0,20 (20)	0,25 (25)	0,30 (30)
Quantité du produit testé à peser en g	0,2	1	2	3	4	5	6
Quantité de gélose à pipetter en ml	19,8	19	18	17	16	15	14

Tableau I : Quantités respectives du produit testé et de gélose pour chaque milieu de culture .

D - Culture

1 - Souches utilisées

En plus des douze germes utilisés lors des essais préliminaires, nous avons testé des souches isolées d'un malade de Chirurgie B (deux souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) soient au total 14 germes répertoriés comme suit :

- 1: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)
- 2: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*S. aureus* résistant à la méthicilline)
- 3: *Staphylococcus* à coagulase négative (*S.* à coagulase négative)
- 4: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)
- 5: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)
- 6: *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)
- 7: *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*)
- 8: *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*)
- 9: *Escherichia coli* (*E. coli*)
- 10: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)
- 11: *Escherichia coli* (*E. coli* de Chirurgie B)
- 12: *Bacillus subtilis* ATCC6633 (*B. subtilis* ATCC6633)
- 13: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (de Chirurgie B)
- 14: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (de Chirurgie B).

2 - Ensemencement

L'ensemencement des milieux de culture a été fait en spots de 10 μ l avec un inoculum fixe (à environ 10⁸ germes/ml).

3 - Incubation

Les boîtes ensemencées ont été mises dans l'étuve à 37°C pendant 20 heures.

E - Recherche de l'influence de différents facteurs

1 - Influence du pH

Chaque antiseptique a une zone d'activité optimale pour une certaine gamme de pH. L'action des agents antimicrobiens peut alors être influencée par le pH. Nous avons donc recherché l'influence du pH sur l'action antibactérienne du miel en utilisant d'autres milieux nutritifs.

a - Milieu acide

Nous avons utilisé le milieu YM Agar déshydraté (Laboratoire DIFCO) de composition (en g/l d'eau distillée) suivante :

Extrait de levure : 3

Extrait de malt : 3

Peptone : 5

Dextrose : 10

Agar : 20

Le pH final du milieu étant de 6,2 +/- 0,2, il a été ajusté à 5,5 avec de l'acide chlorhydrique.

b - Milieu basique

Nous avons utilisé le milieu Antibiotic Médium 5 (Laboratoire DIFCO) de composition (en g/l d'eau distillée) suivante :

Extrait de viande : 1,5

Extrait de levure : 3

Peptone : 6

Agar : 15

Le pH final du milieu est de 7,9 +/- 0,1.

2 - Influence du sang

Avant d'appliquer un antiseptique sur une plaie, il est nécessaire de la nettoyer. Mais cette déterision peut entraîner un saignement de la plaie.

Nous avons donc recherché l'influence du sang sur l'activité antibactérienne du miel.

Le sang utilisé était du sang stérile de cheval dont se sert le Service de Bactériologie pour préparer des milieux enrichis.

Il a été ajouté au milieu contenant la gélose Mueller-Hinton et le miel au moment de sa préparation avant qu'il ne soit solidifié afin de pouvoir obtenir un mélange homogène.

Les quantités de sang introduites étaient de 1% (0,2 ml) , 2,5% (0,5 ml) et 5% (1 ml) du milieu de culture.

3 - Influence de la température

a - Température à 41°C

Le miel toutes fleurs a été testé après avoir été mis dans l'étuve à 41°C pendant vingt heures puis pendant sept jours.

b - Température à 85°C

Les miels toutes fleurs et de châtaignier ont été chauffés au bain-marie à 85°C pendant quinze minutes puis ils ont été immédiatement inclus dans les milieux de culture.

4 - Influence du temps

L'activité antibactérienne du miel toutes fleurs et celle du miel de châtaignier ont été testées après deux mois de conservation à 14°C et à l'abri de la lumière.

RESULTATS

I - ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS EN MILIEU NEUTRE

A - Miels toutes fleurs et miel de châtaignier

Les résultats sont rapportés dans le tableau II et dans les figures 6, 7 et 8.

L'activité antibactérienne est variable suivant les miels et suivant les germes.

La concentration minimale inhibitrice varie :

- de 0,10 à 0,25 g/ml pour le miel toutes fleurs
- de 0,15 à 0,25 g/ml pour le miel de châtaignier
- de 0,15 à 0,30 g/ml pour le miel toutes fleurs utilisé en Chirurgie B.

Il n'y a pas de différences significatives entre les résultats du miel toutes fleurs et ceux du miel de châtaignier. Cependant, le miel utilisé en Chirurgie B est inhibiteur de la croissance des germes à des concentrations plus élevées que celles des miels toutes fleurs et de châtaignier.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Miel toutes fleurs	0,15	0,15	0,10	0,20	0,20	0,25	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,20
Miel de châtaignier	0,20	0,15	0,15	0,20	0,20	0,25	0,20	0,15	0,15	0,15	0,20	0,20
Miel toutes fleurs (Chirurgie B)	0,25	0,25	0,15	0,30	0,25	0,30	0,20	0,20	0,20	0,20	0,25	0,25

Tableau II : Concentrations minimales inhibitrices des miels en g/ml en milieu neutre

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633).

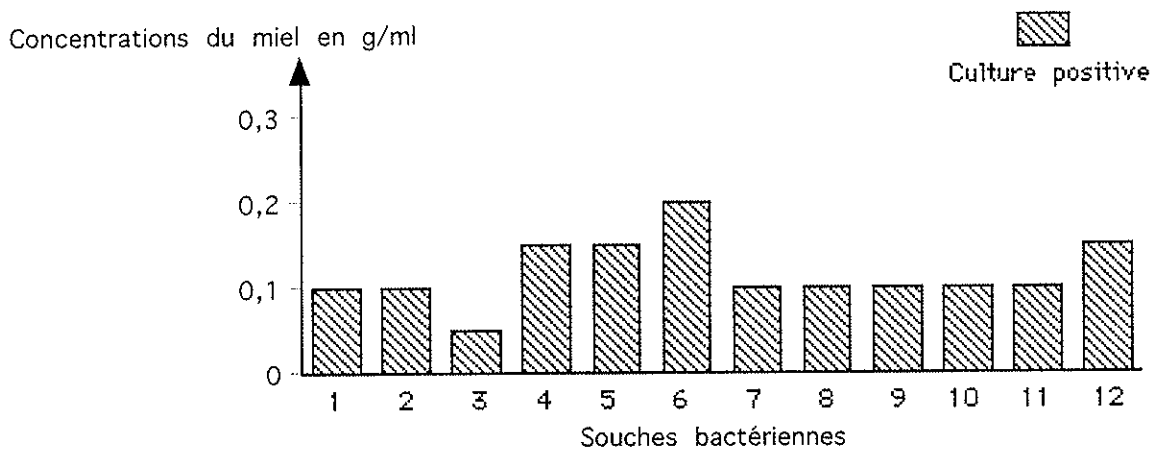


Figure 6 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu en miel toutes fleurs.

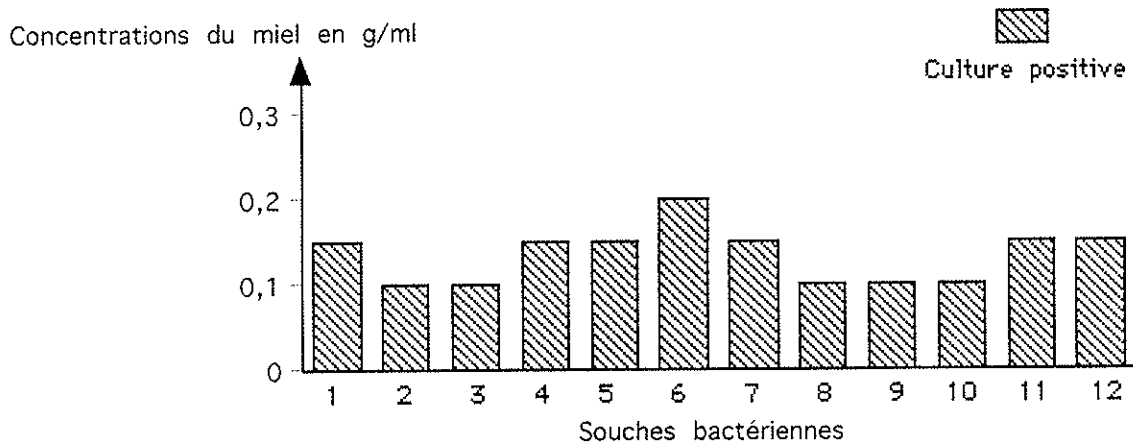


Figure 7 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu en miel de châtaignier.

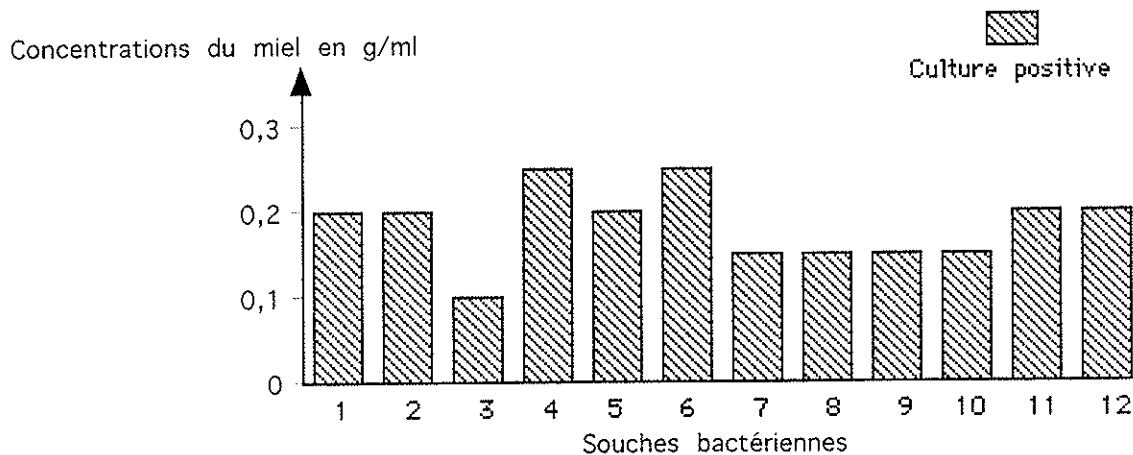


Figure 8 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu en miel toutes fleurs (Chirurgie B).

B - Miel et aromiels de thym

Les résultats sont rapportés dans le tableau III et dans les figures 9, 10 et 11.

- La majorité des germes sont sensibles au miel de thym à partir d'une concentration de 0,10 g/ml (la concentration minimale inhibitrice varie de 0,05 à 0,20 g/ml).

- Toutes les souches bactériennes sont sensibles à l'aromiél thym-thymol à une concentration de 0,10 g/ml (une de ces souches est inhibée à partir de 0,05 g/ml).

- 4 Staphylocoques sur 5 sont sensibles à l'aromiél thym-linalol à une concentration de 0,05 g/ml (la concentration minimale inhibitrice varie de 0,05 à 0,25g/ml).

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Miel de thym	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,05
Aromiel thym-thymol	0,10	0,10	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Aromiel thym-linalol	0,05	0,05	0,05	0,10	0,10	0,25	0,05	0,10	0,10	0,10	0,15	0,10	0,05

Tableau III : Concentrations minimales inhibitrices du miel et des aromiels de thym en g/ml en milieu neutre (1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline (Chirurgie B)).

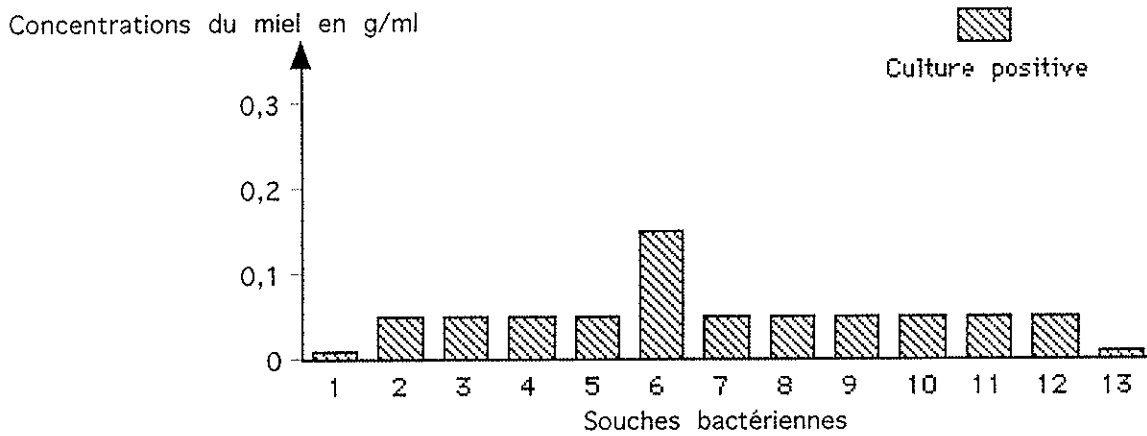


Figure 9 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu en miel de thym.

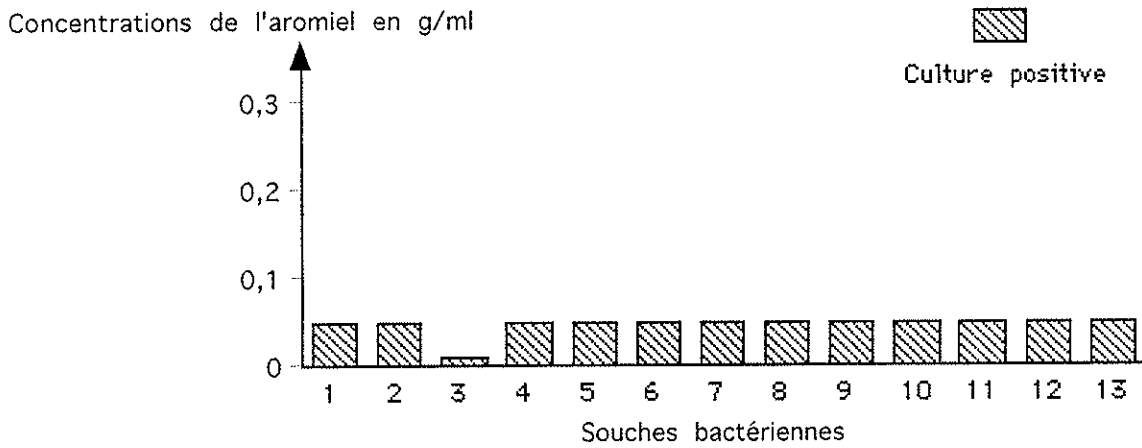


Figure 10 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu en aromiel thym-thymol.

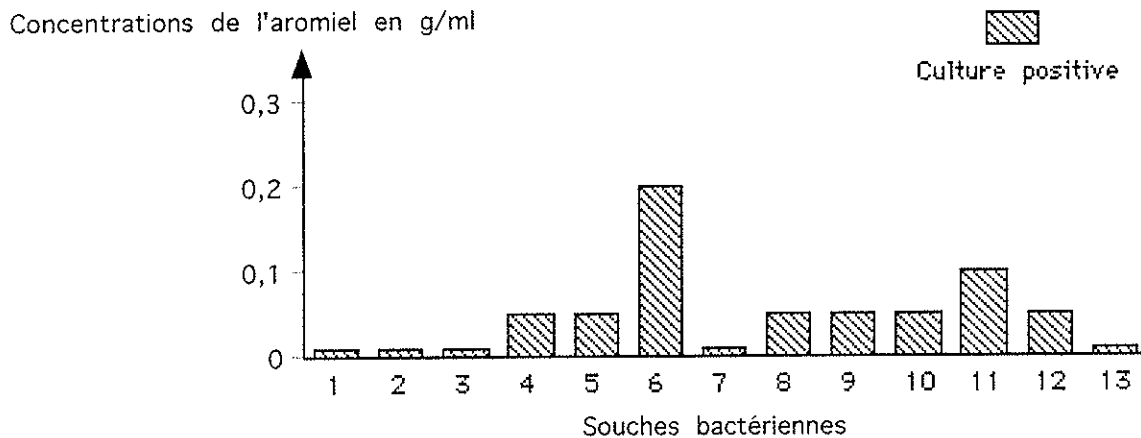


Figure 11 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu en aromiel thym-linalol.

II - ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU SACCHAROSE ET DU MIEL DE REMPLACEMENT EN MILIEU NEUTRE

Les résultats sont rapportés dans le tableau IV.

- Quelle que soit la concentration du milieu en saccharose, il n'y a aucune inhibition de la croissance des germes.

- Quelle que soit la concentration du milieu en miel de remplacement, il n'y a aucune inhibition de la croissance des germes, sauf pour la souche 10 (*Pseudomonas aeruginosa*) qui ne pousse pas à la concentration de 0,30 g/ml.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Saccharose	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30
Miel de remplacement	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	0,30	>0,30	>0,30	>0,30

Tableau IV : Concentrations minimales inhibitrices du saccharose et du miel de remplacement en g/ml en milieu neutre

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)).

III - INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS

A - Influence du pH du milieu

1 - Milieu acide (pH à 5,5)

a - Miels toutes fleurs et miel de châtaignier

Les résultats sont rapportés dans le tableau V et dans les figures 12, 13 et 14.

Les souches bactériennes : 2 (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), 3 (*Staphylococcus* à coagulase négative), 4 (*Staphylococcus aureus*), 7 (*Proteus mirabilis*), 10 (*Pseudomonas aeruginosa*), 12 (*Bacillus subtilis*) et 14 (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) ont été inhibées sur le milieu témoin acide. Nous ne pouvons donc pas interpréter les résultats de la mise en culture de ces souches en milieu acide contenant du miel toutes fleurs. C'est pourquoi, avec les autres miels, nous avons utilisé uniquement les souches 1 (*Staphylococcus aureus*), 5 (*Klebsiella pneumoniae*), 6 (*Klebsiella oxytoca*), 8 (*Enterobacter cloacae*), 9 (*Escherichia coli*), 11 (*Escherichia coli* de Chirurgie B) et 13 (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline de Chirurgie B).

La concentration minimale inhibitrice varie :

- de 0,01 à 0,10 g/ml pour le miel toutes fleurs
- de 0,10 à 0,15 g/ml pour le miel de châtaignier
- de 0,01 à 0,20 g/ml pour le miel toutes fleurs utilisé en Chirurgie B.

Les concentrations minimales inhibitrices sont inférieures à celles obtenues après mise en culture des germes en présence des mêmes miels en milieu neutre.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Miel toutes fleurs	0,05	NI	NI	NI	0,10	0,10	NI	0,05	0,01	NI	0,01	NI	0,01	NI
Miel de châtaignier	0,10	NT	NT	NT	0,15	0,15	NT	0,10	0,10	NT	0,15	NT	0,10	NT
Miel toutes fleurs (Chirurgie B)	0,01	NT	NT	NT	0,20	0,15	NT	0,10	0,15	NT	0,10	NT	0,05	NT

Tableau V : Concentrations minimales inhibitrices des miels en g/ml en milieu acide (pH à 5,5)

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus.*, 5 : *K pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B), 14 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)) - NI : Non Interprétable , NT : Non Testé.

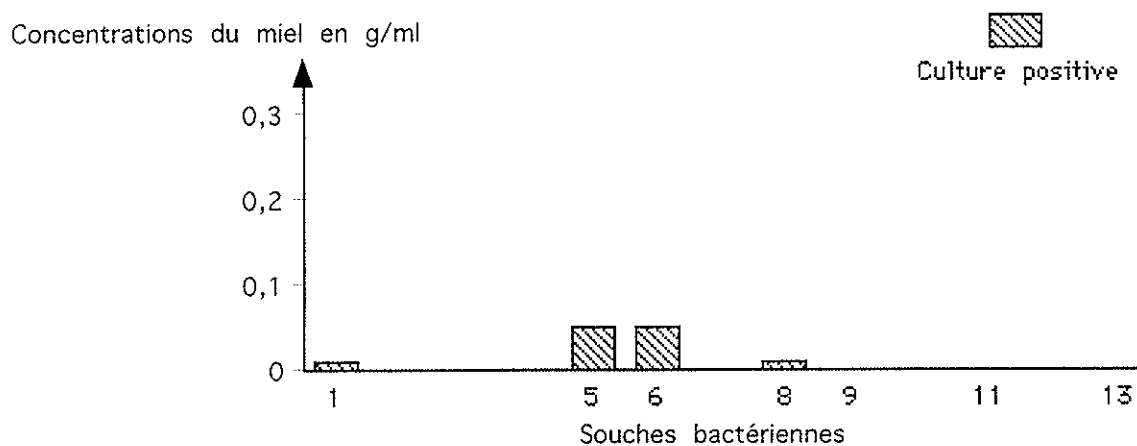


Figure 12 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu acide en miel toutes fleurs.

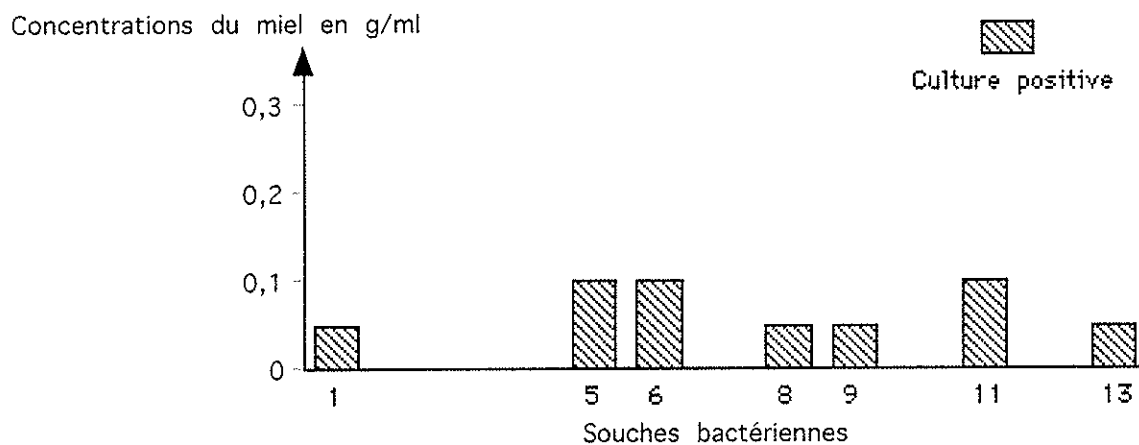


Figure 13 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu acide en miel de châtaignier.



Figure 14 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu acide en miel toutes fleurs (Chirurgie B).

b - Aromiels de thym

Les résultats sont rapportés dans le tableau VI et dans les figures 15 et 16 (seules les souches 1, 5, 6, 8, 9, 11 et 13 ont été utilisées).

La concentration minimale inhibitrice varie :

- de 0,01 à 0,15 g/ml pour l'aromiél thym-thymol
- de 0,05 à 0,15 g/ml pour l'aromiél thym-linalol.

La majorité des concentrations minimales inhibitrices sont supérieures ou égales à celles obtenues après mise en culture des germes en présence des mêmes miels en milieu neutre.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Aromiel thym - thymol	0,05	NT	NT	NT	0,15	0,15	NT	0,15	0,10	NT	0,10	NT	0,01	NT
Aromiel thym - linalol	0,15	NT	NT	NT	0,15	0,15	NT	0,15	0,10	NT	0,10	NT	0,05	NT

Tableau VI : Concentrations minimales inhibitrices des aromiels de thym en g/ml en milieu acide (pH à 5,5)

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxyfoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B), 14 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)) - NT : Non Testé.

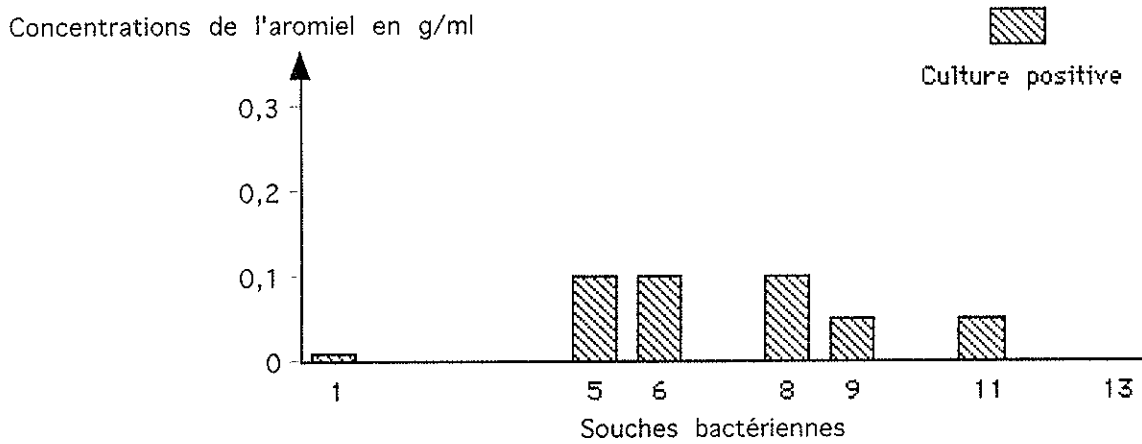


Figure 15 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu acide en aromiel thym-thymol.

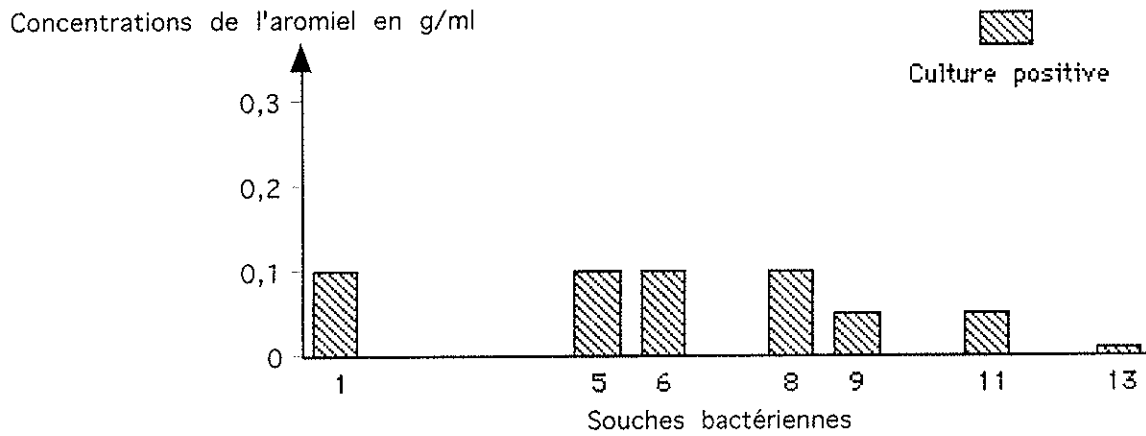


Figure 16 : Représentation schématique de la croissance des germes en fonction de la concentration du milieu acide en aromiel thym-linalol.

2 - Milieu basique (pH à 7,9)

Les résultats sont rapportés dans le tableau VII.

La concentration minimale inhibitrice varie :

- de 0,10 à 0,25 g/ml pour le miel toutes fleurs
- de 0,10 à 0,25 g/ml pour le miel de châtaignier
- de 0,05 à 0,25 g/ml pour le miel de thym.

Les résultats ne sont pas significativement différents de ceux obtenus après mise en culture des germes en présence des mêmes miels en milieu neutre.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Miel toutes fleurs	0,25	0,20	0,10	0,20	0,20	0,20	0,15	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,10	0,10
Miel de châtaignier	0,15	0,15	0,15	0,15	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,20	0,15	0,25	0,10	0,10
Miel de thym	0,10	0,05	0,05	0,10	0,10	0,25	0,10	0,10	0,15	0,10	0,15	0,15	0,05	NT

Tableau VII : Concentrations minimales inhibitrices des miels en g/ml en milieu basique (pH à 7,9)

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B), 14 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)) - NT : Non Testé.

B - Influence du sang

1 - Présence de sang à la concentration de 5%

Les résultats sont rapportés dans le tableau VIII.

La présence de sang dans le milieu de culture diminue l'activité antibactérienne des miels testés.

- Avec le miel toutes fleurs, la croissance des bactéries n'est pas inhibée sauf pour les souches 11 (*Escherichia coli*) et 12 (*Bacillus subtilis*) qui ont leur croissance inhibée aux concentrations respectives de 0,30 et 0,25 g/ml.

- Avec le miel de châtaignier, aucune souche bactérienne n'est inhibée quelle que soit la concentration.

- Avec l'aromiél thym-thymol, seules les souches 7 (*Proteus mirabilis*) et 12 (*Bacillus subtilis*) sont inhibées aux concentrations respectives de 0,30 et 0,20 g/ml.

2 - Présence de sang aux concentrations de 2,5% et 1%

Les résultats sont rapportés dans le tableau IX.

Le sang diminue l'activité antibactérienne du miel toutes fleurs quelle que soit la quantité introduite dans le milieu de culture.

- Seule la souche 10 (*Pseudomonas aeruginosa*) est inhibée avec le miel toutes fleurs à la concentration de 0,30 g/ml en présence de 2,5% de sang. La croissance des autres germes est visible sur les milieux contenant 0,30 g/ml.

- Le miel toutes fleurs n'inhibe aucune souche bactérienne en présence de 1% de sang.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Miel toutes fleurs	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	0,30	0,25	>0,30
Miel de châtaignier	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30
Aromiel thym - thymol	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	0,20	>0,30

Tableau VIII : Concentrations minimales inhibitrices des miels en g/ml en milieu contenant 5% de sang

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)).

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Miel toutes fleurs (2,5% de sang)	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	0,30	>0,30	>0,30	>0,30
Miel toutes fleurs (1% de sang)	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30

Tableau IX : Concentrations minimales inhibitrices du miel en g/ml en milieux contenant 2,5% et 1% de sang

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)).

C - Influence de la température

1 - Température à 41°C

Les résultats sont rapportés dans le tableau X.

a - Pendant 20 heures

La concentration minimale inhibitrice du miel toutes fleurs conservé 20 heures à 41°C varie de 0,15 à 0,25 g/ml.

b - Pendant 7 jours

La concentration minimale inhibitrice du miel toutes fleurs conservé 7 jours à 41°C varie de 0,10 à 0,25 g/ml.

Les résultats ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec le miel toutes fleurs qui n'a pas subi de variation de température.

2 - Température à 85°C

Les résultats sont rapportés dans le tableau XI.

Le chauffage des miels au bain-marie à 85°C pendant 15 minutes diminue leur activité antibactérienne. La majorité des germes se développent à la concentration de 0,30 g/ml.

- Sur le milieu dont la concentration en miel toutes fleurs est de 0,30 g/ml, sont inhibées les souches 3 (*Staphylococcus* à coagulase négative), 9 (*Escherichia coli*), 12 (*Bacillus subtilis*), 13 (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline de Chirurgie B) et 14 (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline de Chirurgie B).

- Sur le milieu dont la concentration en miel de châtaignier est de 0,30 g/ml, sont inhibées les souches 3 (*Staphylococcus* à coagulase négative), 8 (*Enterobacter cloacae*), 9 (*Escherichia coli*) et 10 (*Pseudomonas aeruginosa*).

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Miel toutes fleurs (après 20 h. à 41°C)	0,20	0,15	0,15	0,20	0,20	0,20	0,25	0,15	0,20	0,15	0,20	0,20	0,15
Miel toutes fleurs (après 7 j. à 41°C)	0,15	0,10	0,15	0,25	0,15	0,25	0,15	0,10	0,10	0,15	0,15	0,25	0,15

Tableau X : Concentrations minimales inhibitrices du miel en g/ml après conservation à 41°C

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)).

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Miel toutes fleurs	>0,30	>0,30	0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	NT	0,30	>0,30	>0,30	0,30	0,30	0,30
Miel de châtaignier	>0,30	>0,30	0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30	0,30	0,30	0,30	>0,30	>0,30	>0,30	>0,30

Tableau XI : Concentrations minimales inhibitrices des miels en g/ml après chauffage 15 minutes à 85°C
 (1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S. à* coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*,
 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à
 la méthicilline(Chirurgie B), 14 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)) - NT : Non Testé.

D - Influence du temps

Les résultats sont rapportés dans le tableau XII.

Les résultats obtenus avec les miels conservés deux mois à 14°C et à l'abri de la lumière ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec les mêmes miels au début de l'étude.

La concentration minimale inhibitrice varie :

- de 0,10 à 0,15 g/ml pour le miel toutes fleurs
- de 0,15 à 0,20 g/ml pour le miel de châtaignier.

Souches	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Miel toutes fleurs	0,15	0,15	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,15	0,15	0,15	0,15	0,10	0,15
Miel de châtaignier	0,20	0,20	0,15	0,15	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,20	0,15	0,15	0,15

Tableau XII : Concentrations minimales inhibitrices des miels en g/ml après conservation 2 mois à 14°C et à

l'abri de la lumière

(1 : *S. aureus*, 2 : *S. aureus* résistant à la méthicilline, 3 : *S.* à coagulase négative, 4 : *S. aureus*, 5 : *K. pneumoniae*, 6 : *K. oxytoca*, 7 : *P. mirabilis*, 8 : *E. cloacae*, 9 : *E. coli*, 10 : *P. aeruginosa*, 11 : *E. coli*(Chirurgie B), 12 : *B. subtilis* ATCC6633, 13 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B), 14 : *S. aureus* résistant à la méthicilline(Chirurgie B)).

Notre étude montre que le miel exerce une action inhibitrice sur la croissance des bactéries. Cette inhibition est variable suivant les miels et suivant les germes.

La concentration minimale inhibitrice des miels testés en milieu neutre varie :

- de 0,10 à 0,25 g/ml (de 10 à 25% m/v) pour le miel toutes fleurs
- de 0,15 à 0,25 g/ml (de 15 à 25% m/v) pour le miel de châtaignier
- de 0,15 à 0,30 g/ml (de 15 à 30% m/v) pour le miel toutes fleurs utilisé en Chirurgie B
- de 0,05 à 0,20 g/ml (de 5 à 20% m/v) pour le miel de thym
- de 0,05 à 0,10 g/ml (de 5 à 10% m/v) pour l'aromiél thym-thymol
- de 0,05 à 0,25 g/ml (de 5 à 25% m/v) pour l'aromiél thym-linalol.

Les Staphylocoques semblent les plus sensibles à l'aromiél thym-linalol. Les germes les plus résistants à l'action antibactérienne des miels sont les Klebsielles.

L'action inhibitrice de la croissance des bactéries n'est pas retrouvée avec le saccharose ni avec le miel de remplacement.

L'activité antibactérienne des miels n'a pas été influencée par le pH du milieu sauf celle des miels toutes fleurs et celle du miel de châtaignier qui ont des concentrations minimales inhibitrices en milieu acide (pH à 5,5) inférieures à celles observées en milieu neutre.

L'action antibactérienne du miel toutes fleurs n'a pas été modifiée après conservation quelques heures et quelques jours à 41°C.

Cependant, deux facteurs ont diminué l'activité antibactérienne des miels :

- . le sang, ajouté au milieu de culture et
- . le traitement des miels par la chaleur à 85°C pendant quinze minutes.

Enfin, après deux mois de conservation à 14°C et à l'abri de la lumière, le miel conserve son activité antibactérienne.

DISCUSSION

I - PROPRIETES CICATRISANTE ET ANTIBACTERIENNE DU MIEL

Les Egyptiens connaissaient parfaitement le miel dont ils se servaient mélangé à de la propolis pour embaumer leurs morts et les empêcher de se putréfier. Ils l'utilisaient aussi pour le pansement des blessures et pour le soin des yeux.

Dans toute l'Afrique, le miel a joué et joue un grand rôle. Il est employé pour soigner les brûlures, les morsures de serpent et les plaies infectées.

Une étude de l'activité antimicrobienne de plusieurs miels réalisée au Togo (8) montre que le miel inhibe la croissance de différents germes dont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* de façon proportionnelle à la dose.

Cette étude a été réalisée *in vitro* par une méthode différente de la nôtre qui est la méthode de dilution en milieu liquide couplée à l'étalement sur milieux gélosés solides. 10^3 germes ont été incubés dans les tubes contenant 0,9 ml du milieu de culture et 4 ml de chaque miel (soit une concentration de miel de 80% v/v). Le miel a été remplacé par de l'eau dans les milieux témoins. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, 0,1 ml de chaque tube ont été prélevés et étalés sur milieux gélosés. Après incubation à 37°C pendant 24 à 72 heures, les colonies ont été dénombrées.

Les auteurs ont donné les % d'inhibition de la croissance des germes après dénombrement des colonies sur les milieux gélosés en comparaison avec les milieux témoins où il n'y a pas d'inhibition.

Les quatre miels testés dont l'origine florale n'a pas été précisée ont complètement inhibé les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et les souches d'*Escherichia coli*. Les souches de *Staphylococcus aureus* ont été inhibées à des % variant de 99,94 à 100%.

Un des miels a ensuite été dilué et testé avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa* et une souche de *Staphylococcus aureus* :

- La dilution au 1/16 (5% v/v) n'a eu aucune influence sur la croissance des germes.

- La dilution au 1/8 (10% v/v) a inhibé *Pseudomonas aeruginosa* à 90% et *Staphylococcus aureus* à 85%.

- La dilution au 1/4 (20% v/v) a complètement inhibé *Pseudomonas aeruginosa*.

- La dilution au 1/2 (40% v/v) a complètement inhibé *Staphylococcus aureus*.

Les auteurs pensent que l'efficacité du miel dans le traitement des plaies chroniques ou infectées est liée à son action directe sur les germes.

Au cours de notre étude, nous avons relevé les concentrations minimales de miel qui permettaient l'inhibition complète de la croissance des germes. Nous n'avons donc pas montré que le miel agissait de façon proportionnelle à la dose comme le montre l'étude décrite précédemment. Cependant, l'inoculum utilisé était à 10^6 germes environ (10 μ l de la suspension à 10^8 germes/ml) alors qu'il était à 10^3 germes pour l'étude précédente; de plus, les concentrations minimales inhibitrices pour les *Staphylococcus aureus* et pour *Pseudomonas aeruginosa* relevées au cours de notre étude sont inférieures à celles obtenues au cours de l'étude réalisée au Togo :

- la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est inhibée :

. par les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier à une concentration variant de 15 à 20% m/v (0,15 à 0,20 g/ml)

. par le miel et les aromiels de thym à une concentration de 10% m/v (0,10 g/ml)

- la croissance des *Staphylococcus aureus* est inhibée:

. par les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier à une concentration variant de 15 à 30% m/v (0,15 à 0,30 g/ml)

. par le miel et les aromiels de thym à une concentration variant de 5 à 10% m/v (0,05 à 0,10 g/ml).

Une autre étude réalisée *in vivo* (9) met en évidence à la fois l'activité cicatrisante et l'activité antimicrobienne du miel.

Au cours de cette étude, le miel a été appliqué sur des plaies d'étiologies diverses : chirurgicale, accidentelle, infectieuse et sur des brûlures essentiellement du deuxième degré. La moitié des patients qui ont participé à l'étude avaient déjà été traités par un antiseptique local (le tulle gras) qui n'avait donné aucun résultat positif. Le miel a permis une cicatrisation dans 88% des cas et le nombre de prélèvements bactériologiques positifs a diminué au cours de l'évolution.

Les essais réalisés dans le Service du Professeur B. DESCOTTES (6) montrent que le miel appliqué sur une plaie accélère le processus de cicatrisation. Afin de pouvoir effectuer une étude comparative, les infirmières ont également utilisé de la biogaze. L'étude de la vitesse de cicatrisation moyenne par jour a montré que la cicatrisation était plus rapide avec le miel qu'avec la biogaze. D'après ces essais, les pansements au miel réalisés sur une plaie même infectée permettent d'obtenir des résultats satisfaisants.

Selon ces études, le miel utilisé *in vivo* présenterait donc un intérêt clinique en favorisant la cicatrisation des plaies et un intérêt bactériologique en diminuant la colonisation des plaies par les germes.

II - CRITIQUES DE NOTRE ETUDE

A - Difficultés techniques

Au total, 14 souches bactériennes ont été sélectionnées. Cependant, les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline issus d'un malade de Chirurgie Viscérale et Transplantations (souches 13 et 14) n'étaient pas encore isolées quand l'étude a commencé. C'est pourquoi, lors de certaines manipulations, nous n'avons pas pu mettre en culture tous les germes.

L'étude de l'activité antibactérienne du miel de thym en milieu acide et celle en présence de sang n'ont pas pu être réalisées car nous ne disposions pas encore de ce miel.

B - Interprétation des résultats

Les différences d'activité antibactérienne d'un miel à un autre doivent être relativisées et les conclusions que nous pouvons faire sont limitées étant donné le petit nombre d'expériences réalisées avec chaque miel.

De plus l'activité antibactérienne des miels pourrait également être testée sur d'autres germes que ceux sélectionnés pour l'étude comme des Streptocoques, des Levures voire *Helicobacter pylori* qui joue un rôle dans la survenue des gastrites et des ulcères (gastriques et duodénaux).

III - FACTEURS RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU MIEL

Selon certaines études, l'action antibactérienne du miel pourrait être attribuée à des facteurs végétaux (10) (11).

Mais des auteurs pensent que les propriétés antibactériennes du miel sont dues à son faible pH, à sa forte teneur en glucides et à la présence d'un facteur antibactérien appelé inhibine (12).

A - Facteurs végétaux

LAVIE (10) a découvert une substance antibactérienne non encore identifiée, extractible par l'éther à froid et volatile à 95°C. Des substances similaires ont d'ailleurs été extraites à partir du nectar des fleurs.

Une étude réalisée *in vitro* sur l'activité antibactérienne du miel (11) (par une méthode de dilution en milieu solide) montre que l'origine florale des miels a une influence sur leur action antibactérienne. Différents miels (miel de tilleul, miel d'arbres fruitiers et miel d'acacia) ont été testés aux concentrations suivantes : 20%, 16%, 12%, 8% et 4% m/m. Plusieurs germes ont été utilisés dont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

- Le miel de tilleul s'est révélé le plus actif : une concentration de 8% m/m inhibe complètement la croissance des germes.

- Le miel d'acacia inhibe la croissance :
 - . d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* à 12% m/m
 - . de *Staphylococcus aureus* à 8% m/m.
- Le miel d'arbres fruitiers inhibe la croissance :
 - . d'*Escherichia coli* à 20% m/m
 - . de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* à 16% m/m.

Les auteurs de cette étude n'expliquent pas les différences d'action d'un miel à un autre. Ils pensent que l'activité antibactérienne du miel est due à un facteur appelé inhibine présent dans le miel.

Comparaison des résultats de cette étude avec ceux que nous avons obtenus :

Le miel de tilleul est plus actif que les différents miels que nous avons testés (sur les souches de *S. aureus*, d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*).

Il y a peu de différences entre la concentration minimale inhibitrice du miel d'acacia qui varie de 8 à 12% m/m et celle du miel et des aromiels de thym qui est le plus souvent de 10% m/v.

De la même façon, il y a peu de différences entre la concentration minimale inhibitrice du miel d'arbres fruitiers qui varie de 16 à 20% m/m et celle du miel toutes fleurs et du miel de châtaignier qui varie de 15 à 20% m/v.

Au cours de notre étude, nous avons remarqué que le miel de thym avait l'activité antibactérienne la plus importante ce qui était prévisible puisque le thym (*Thymus vulgaris* L. Lamiacées) est une plante dont l'huile essentielle riche en phénols (thymol et carvacrol) est douée de propriétés antibactériennes et antifongiques (13). L'huile essentielle de thym appartient au groupe des essences majeures (14). Le terme d'essences majeures est attribué à un groupe d'huiles essentielles dont l'action antiseptique est forte et constante. L'indice aromatique des essences de ce groupe varie entre 0,45 et 1. Il s'agit d'un paramètre qui permet d'apprécier le pouvoir bactéricide d'une essence pour un germe donné. Il est compris entre 0 et 1, et plus il est proche de 1, plus le pouvoir germicide de l'huile essentielle pour un germe donné est élevé.

L'indice aromatique moyen de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. est de 0,71.

Nous nous attendions à des résultats plus satisfaisants avec les aromiels de thym qui contiennent de l'huile essentielle de thym. Or, toutes les souches bactériennes sont inhibées sur les milieux contenant 0,10 g/ml de miel de thym et d'aromiel thym-thymol sauf la souche 6 (*Klebsiella oxytoca*) qui pousse jusqu'à une concentration de 0,15 g/ml de miel de thym. Seul l'aromiel thym-linalol semble particulièrement actif sur les Staphylocoques. La quantité d'huile essentielle ajoutée au miel (5 gouttes pour 50 grammes de miel) est-elle suffisante pour obtenir une plus grande activité antibactérienne? Il serait intéressant de poursuivre l'étude des aromiels avec d'autres huiles essentielles à propriétés bactéricides comme l'huile essentielle de lavande reconnue comme étant à la fois cicatrisante et antibactérienne (14), l'huile essentielle de clou de girofle, l'huile essentielle de cannelle...

B - Glucides

Le miel contient 79,5% de glucides : 38% de fructose, 31% de glucose, 7,5% de maltose, 1,5% de saccharose et 1,5% de sucres divers.

Le saccharose aurait une action antibactérienne par son pouvoir d'abaissement de l'activité de l'eau. L'activité de l'eau (ou activité hydrique) exprime le degré de disponibilité de l'eau dans un milieu ou un produit donné. Le saccharose ajouté en forte concentration à un milieu se lierait à l'eau la rendant indisponible aux bactéries. Il abaisserait ainsi l'activité hydrique (15) (16). Or, les bactéries ne peuvent croître que dans ou sur des matières contenant suffisamment d'eau libre (disponible). Au cours de leur croissance, les substances nutritives et les déchets pénètrent et quittent respectivement la cellule bactérienne sous forme de solutions (17). Si la quantité d'eau disponible du milieu diminue, les bactéries ne peuvent donc pas continuer à vivre. Certains auteurs expliquent l'action antibactérienne du miel par sa forte teneur en glucides qui agiraient de la même façon que le saccharose (12).

Notre étude montre que le saccharose et le miel de remplacement n'exercent pas d'action inhibitrice sur la croissance des germes. Nous ne pouvons donc pas expliquer l'activité antibactérienne du miel par sa forte teneur en glucides comme l'ont montré plusieurs auteurs à partir d'études réalisées *in vivo* sur le traitement des plaies (16) (18).

C - pH

Certains auteurs pensent que la propriété antibactérienne *in vivo* du miel (12) (19) est due à son faible pH (variant de 3 à 6).

En ce qui concerne notre étude, nous avons remarqué que le milieu témoin acide (à pH 5,5) inhibe lui-même la croissance de plusieurs germes.

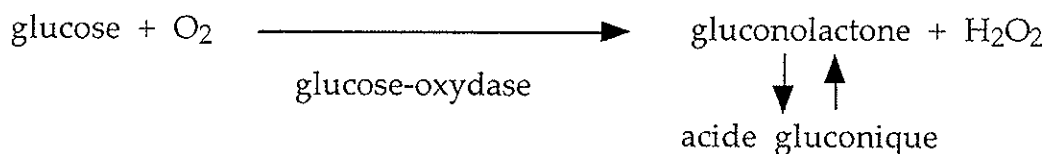
Les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier ont des concentrations minimales inhibitrices en milieu acide (pH à 5,5) qui sont inférieures à celles en milieu neutre. Nous pouvons alors penser que soit les miels ont leur action antibactérienne qui est renforcée en milieu acide soit leur acidité s'ajoute à celle du milieu d'où une meilleure action sur les germes.

Par contre, les aromiels de thym ont des concentrations minimales inhibitrices en milieu acide qui sont identiques ou supérieures à celles en milieu neutre.

Ces résultats ne permettent pas de conclure que l'action antibactérienne du miel est due à son faible pH. Mais il serait intéressant de poursuivre l'étude en mesurant le pH des miels testés.

D - Facteur antibactérien

En 1962, WHITE (20) identifia dans le miel un facteur antibactérien, l'inhibine comme étant l'eau oxygénée H_2O_2 , substance thermolabile et photolabile. Cette inhibine est produite par l'action sur le glucose d'une enzyme, la glucose-oxydase sécrétée par les glandes hypopharyngiennes des abeilles et présente dans le miel :



La glucose-oxydase serait donc mélangée au nectar par l'abeille lors de l'élaboration du miel. Ainsi, l'inhibine a une origine végétale par le glucose et une origine animale par la glucose-oxydase.

Selon WHITE, qui a testé l'action du miel sur *Staphylococcus aureus*, l'inhibine, présente à l'état de traces dans le miel, exerce une action inhibitrice sur la croissance de ce germe. Les expériences de cet auteur montrent que le miel perd ses qualités antimicrobiennes s'il est testé *in vitro* en présence d'une solution de catalase, enzyme qui détruit l'eau oxygénée.

Ces travaux pourraient nous permettre d'expliquer les résultats que nous avons obtenus au cours de l'étude. L'activité antibactérienne des différents miels testés pourrait être due à la présence d'inhibine (ou eau oxygénée connue comme antiseptique oxydant). L'absence d'activité antibactérienne des miels en présence de sang pourrait s'expliquer par le fait que la catalase, enzyme contenue dans le sang, détruit l'inhibine. Enfin, l'inhibine étant une substance thermolabile, la nette diminution de l'activité antibactérienne des miels qui ont été chauffés quinze minutes à 85°C pourrait être due à la destruction de l'inhibine à cette température.

IV - LIMITES D'UTILISATION DU MIEL - PRECAUTIONS A PRENDRE

Avant toute utilisation du miel dans le domaine médical, il semble indispensable de s'assurer de sa qualité bactériologique c'est-à-dire de l'absence de germes revivifiables. En effet, des spores de *Clostridium botulinum* ont été isolées du miel (21).

Une étude bactériologique a été effectuée sur les miels que nous avons testés (sauf sur les aromiels) : seul le miel de thym était exempt de germes. Les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier contenaient des Bacillus et des Staphylocoques.

Il est fort possible que la contamination se soit faite au cours de la récolte, du conditionnement ou du stockage si un certain nombre de conditions d'hygiène n'ont pas été respectées. Il faut préciser que cette étude bactériologique a été faite après notre étude sur l'activité antibactérienne des miels. En tout cas, cette contamination n'a pas gêné l'action *in vitro* des miels sur les germes. Aurions-nous des résultats différents si les miels testés étaient exempts de germes?

Cependant, une étude bactériologique des miels est absolument nécessaire si ces miels sont destinés à être utilisés *in vivo* (application sur les plaies, les ulcères, les brûlures...).

Enfin, le miel peut également contenir des traces de pesticides que les abeilles récoltent lors du butinage des fleurs ou bien des traces d'antibiotiques utilisés par les apiculteurs en prévention des maladies apicoles. Une analyse toxicologique va donc de paire avec l'analyse bactériologique.

CONCLUSION

Notre étude montre que le miel a une action inhibitrice sur la croissance de plusieurs bactéries (Staphylocoques, Entérobactéries et germes de l'environnement). Le miel a donc une action antibactérienne *in vitro* de type bactériostatique qui est certaine.

Cette activité est différente d'un miel à un autre. C'est avec le miel de thym que les résultats obtenus sont les plus satisfaisants. L'étude avec les aromiels mériterait d'être poursuivie afin de pouvoir déterminer si l'addition d'une huile essentielle à un miel permettrait d'obtenir une plus grande action antibactérienne. L'étude réalisée avec les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier montre que ces miels inhibent la croissance des germes à des concentrations supérieures à celles du miel et des aromiels de thym.

Les germes les plus résistants à l'action des miels testés sont les Klebsielles.

D'après notre étude, nous ne pouvons pas dire s'il existe ou non un pH optimal pour l'action du miel même si les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier ont apparemment une activité antibactérienne *in vitro* supérieure lorsque le pH du milieu est de 5,5. L'activité antibactérienne du miel utilisé *in vivo* serait-elle influencée par le pH de la plaie?

Le sang diminue l'action antibactérienne des miels quelle que soit la quantité ajoutée au milieu de culture. Or, il contient la catalase, enzyme qui pourrait détruire le facteur antibactérien appelé inhibine (ou eau oxygénée) d'origines végétale et animale, présent dans le miel à l'état de traces.

Les miels qui ont subi un traitement par la chaleur (quinze minutes à 85°C) perdent leur propriété antibactérienne. Or, l'inhibine est une substance thermolabile qui pourrait être détruite à cette température. L'hypothèse selon laquelle l'inhibine serait responsable de l'action antibactérienne des miels pourrait alors être confirmée.

Cependant, si l'inhibine exerce une action sur les germes, elle n'est probablement pas la seule responsable de l'activité antibactérienne du miel. En effet, cette activité est variable suivant l'origine florale des miels et des facteurs végétaux pourraient également expliquer en partie le pouvoir antibactérien des miels.

Enfin, le miel n'étant pas un produit stérile, avant toute utilisation dans le domaine médical, il est indispensable de s'assurer de sa qualité bactériologique c'est-à-dire de l'absence de contamination par des germes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 DARRIGOL JL.
Le miel pour votre santé.
Dangles, St-Jean-de-Braye, 1979.

- 2 BERARD L., COLLOMB G., GUIBAL J., JOANNIS C., MARCHENAY P. et SCHWEITZ A.
L'abeille, l'homme, le miel et la cire.
Réunion des musées nationaux, Paris, 1981.

- 3 LOUVEAUX J.
Les abeilles et leur élevage.
Hachette, Paris, 1980.

- 4 IOIRICHE N.
Les abeilles, pharmaciennes ailées.
Mir, Moscou, 1968.

- 5 CHAUVIN R. X
La ruche et l'homme.
Almann-Lévy, Poitiers, 1987.

- 6 PAUTARD G. et BOUTANG-TREBIER C.
De la ruche à l'hôpital ou l'utilisation du miel dans les unités de soins.
Recherche en soins infirmiers, 1990, 21, 35-46.

- 7 ORENGO C.
Le miel utilisé dans les préparations pharmaceutiques.
Th. Univ. Pharm., Montpellier, 1985.

- 8 DE SOUZA C., KOEVI K., JAMES K., KOUMAGLOK K. et GBEASSOR M.
Etude de l'activité antimicrobienne du miel.
Microb. Hyg. Ali., 5, 19-24.

- 9 NDAYISABA G., BAZIRA L., HABONIMANA E. et MUTEGANYA D.
Evolution clinique et bactériologique des plaies traitées par le miel
Analyse d'une série de 40 cas.
Revue de Chirurgie Orthopédique, 1992, **78**, 111-113.
- 10 LAVIE P.
Sur l'identification des substances antibactériennes présentes dans le miel.
C. R. Acad. Sci., Paris, Séance du 18.02.1963, 1858-1860.
- 11 POSTMES T., VAN-DEN-BOGAARD A.E. et HAZEN M.
Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation.
Lancet, 1993, **341**, 756-757.
- 12 EFEM S.E.E.
Clinical observations on the wound healing properties of honey.
Br. J. Surg., 1988, **75**, 679-681.
- 13 BRUNETON J.
Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales.
Technique et Doc Lavoisier, Deuxième édition, Paris, 1993.
- 14 BELAICHE P.
Historique et prescription en aromathérapie.
Encycl. Méd. Nat., Paris, Phytothérapie, Aromathérapie, C-1, **9**, 1991, 20 p.
- 15 HERSZAGE L. et MONTENEGRO J.R.
Traitement des plaies suppurées par application de saccharose.
Gazette médicale, 1984, **91**, 59-62.
- 16 CHIRIFE J., SCARMATO G. et HERSZAGE L.
Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds.
Lancet, 1982, **1**, 560-561.
- 17 SINGLETON P.
Bactériologie.
Masson, Deuxième édition, Paris, 1994.

18 CHIRIFE J. et HERSZAGE L.

Sugar for infected wounds.

Lancet, 1982, 1, 157.

19 SUBRAHMANYAM M.

Topical application of honey in treatment of burns.

Br. J. Surg., 1991, 78, 497-498.

20 WHITE J.W., SUBERS M.H. et SCHEPARTZ A.I.

The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system.

Biochim. Biophys. Acta., 1963, 73, 57-70.

21 MIDURA T.F., SNOWDEN S., WOOD R.M. et AMON S.S.

Isolation of clostridium botulinum from honey.

J. Clin. Microbiol., 1979, 9, 282-283.

TABLE DES MATIERES

PLAN	4
INTRODUCTION	6
<u>PREMIERE PARTIE : LES ABEILLES ET LES PRODUITS DE LA RUCHE</u>	7
<u>LES ABEILLES</u>	8
I-CLASSIFICATION	9
II-VIE DES ABEILLES DANS LA RUCHE	9
A-La colonie	9
B-Organisation du travail	10
1-La reine	10
2-Les ouvrières	10
3-Les mâles ou faux-bourdon	11
C-Communication entre abeilles	11
III-ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ABEILLE OUVRIERE	12
A-Schéma général	12
1-La tête	12
2-Le thorax	14
3-L'abdomen	14
B-Appareil digestif	15
1-Les pièces buccales	15
2-Le jabot	15
3-L'intestin moyen	15
4-Annexes du tube digestif	16
a-Les glandes hypopharyngiennes	16
b-Les glandes labiales	16
C-Mécanisme de formation du miel	17
<u>LES PRODUITS DE LA RUCHE</u>	18
I-LES PRODUITS DE LA RUCHE AUTRES QUE LE MIEL	19

A-Le pollen	19
B-La cire	19
C-La gelée royale	20
D-La propolis	20
E-Le venin	20
II-LE MIEL	21
A-Définitions	21
1-Le miel	21
2-Le nectar et le miellat	21
a-Le nectar	21
b-Le miellat	21
B-Les différents types de miel	22
C-Propriétés physiques	22
1-Couleurs	22
2-Turbidité	22
3-Viscosité	22
4-Densité	23
5-Chaleur spécifique	23
6-Indice de réfraction	23
7-Acidité	23
8-Conductivité électrique	23
D-Composition chimique	23
1-Eau	23
2-Glucides	25
a-Monosaccharides	25
b-Disaccharides	25
c-Divers sucres	25
3-Acides aminés	25
4-Acides organiques	25
5-Enzymes	25
6-Sels minéraux	26
7-Vitamines	26
8-Pigments	26
9-Arômes	26
10-Eléments figurés	26

E-Vieillessement	26
1-Cristallisation	26
a-Facteurs qui influencent la cristallisation	27
b-Conséquences	27
2-Fermentation	27
3-Autres transformations	27

DEUXIEME PARTIE : ETUDE IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE DIFFERENTS MIELS 29

MATERIEL ET METHODES 31

I-ESSAIS PRELIMINAIRES	32
A-Milieu de culture	32
B-Miel	33
C-Préparation	33
D-Culture	34
1-Essais à inoculum variable	34
a-Souche utilisée	34
b-Ensemencement	34
c-Incubation	35
d-Résultats	35
2-Essais à inoculum fixe	36
a-Souches utilisées	36
b-Ensemencement	36
c-Incubation	37
d-Résultats	37
II-ETUDE PROPREMENT DITE	38
A-Milieu de culture	38
B-Produits testés	38
1-Miels	38
a-Miels toutes fleurs et miel de châtaignier	38
b-Miel utilisé en Chirurgie Viscérale et Transplantations	39
c-Miel de thym	39
2-Aromiels	39

3-Saccharose	39
4-Miel de remplacement	40
C-Préparation	40
D-Culture	41
1-Souches utilisées	41
2-Ensemencement	41
3-Incubation	41
E-Recherche de l'influence de différents facteurs	42
1-Influence du pH	42
a-Milieu acide	42
b-Milieu basique	42
2-Influence du sang	43
3-Influence de la température	43
a-Température à 41°C	43
b-Température à 85°C	43
4-Influence du temps	43
<u>RESULTATS</u>	44
I-ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS EN MILIEU NEUTRE	45
A-Miels toutes fleurs et miel de châtaignier	45
B-Miel et aromiels de thym	48
II-ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU SACCHAROSE ET DU MIEL DE REMPLACEMENT EN MILIEU NEUTRE	51
III-INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES MIELS	53
A-Influence du pH du milieu	53
1-Milieu acide (pH à 5,5)	53
a-Miels toutes fleurs et miel de châtaignier	53
b-Aromiels de thym	56
2-Milieu basique (pH à 7,9)	59
B-Influence du sang	61
1-Présence de sang à la concentration de 5%	61
2-Présence de sang aux concentrations de 2,5% et 1%	61
C-Influence de la température	64
1-Température à 41°C	64

a-Pendant 20 heures	64
b-Pendant 7 jours	64
2-Température à 85°C	64
D-Influence du temps	67
<u>DISCUSSION</u>	70
I-PROPRIETES CICATRISANTE ET ANTIBACTERIENNE DU MIEL	71
II-CRITIQUES DE NOTRE ETUDE	73
A-Difficultés techniques	73
B-Interprétation des résultats	74
III-FACTEURS RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU MIEL	74
A-Facteurs végétaux	74
B-Glucides	76
C-pH	77
D-Facteur antibactérien	77
IV-LIMITES D'UTILISATION DU MIEL - PRECAUTIONS A PRENDRE	78
CONCLUSION	80
BIBLIOGRAPHIE	82

BON A IMPRIMER N° 13

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

GUILLON (Nadine). — Etude de l'activité antibactérienne du miel. — 89 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm. (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1996).

RESUME :

Les abeilles, insectes sociaux organisés en colonies, communiquent entre elles par l'intermédiaire de différents messages dont les phéromones.

L'organisation anatomique des abeilles leur permet d'élaborer différents produits dits de la ruche qui sont le miel, le pollen, la cire, la gelée royale, la propolis et le venin.

Seul le miel a été testé *in vitro* en Bactériologie sur plusieurs bactéries fréquemment retrouvées au niveau des plaies : ces bactéries ont été mises en culture sur des milieux adaptés à leur croissance et contenant du miel. Différents miels ont été utilisés : deux miels toutes fleurs, un miel de châtaignier et un miel de thym ; des aromiels de thym ont également été testés. Au cours de cette étude, nous avons constaté que les miels avaient une activité antibactérienne vis-à-vis des germes sélectionnés. Cette activité est variable suivant l'origine florale des miels, la concentration des miels et les germes. La concentration minimale inhibitrice varie :

- de 0,10 à 0,30 g/ml avec les miels toutes fleurs et le miel de châtaignier ;
- de 0,05 à 0,25 g/ml avec le miel et les aromiels de thym.

Deux facteurs ont diminué l'action antibactérienne des miels : le sang, incorporé au milieu de culture et le traitement des miels par la chaleur à 85 °C pendant quinze minutes.

L'activité antibactérienne du miel, également connu pour son activité cicatrisante, pourrait s'expliquer par la présence d'un facteur antibactérien appelé inhibine. Mais ce facteur n'est probablement pas le seul responsable de cette activité.

MOTS-CLES :

- Miel.
- Abeille.
- Activité antibactérienne.
- Etude *in vitro*.

JURY : Président : M. A. CHULIA, Professeur.
Juges : M^{me} D. ALLAIS, Maître de Conférences.
M^{me} C. BOSGIRAUD, Professeur.
M. B. DESCOTTES, Professeur.
Membre invité : M^{me} V. RATSIMBAZAFY, Pharmacien des Hôpitaux.